



**HAL**  
open science

# Rôle de la porine OprD et du système d'efflux MexEF-OprN dans la résistance des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques

Charlotte Richardot

► **To cite this version:**

Charlotte Richardot. Rôle de la porine OprD et du système d'efflux MexEF-OprN dans la résistance des souches cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques. Bactériologie. Université de Franche-Comté, 2015. Français. NNT : 2015BESA3010 . tel-01414248

**HAL Id: tel-01414248**

**<https://theses.hal.science/tel-01414248>**

Submitted on 12 Dec 2016

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

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

UNIVERSITE DE FRANCHE COMTE  
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE BESANCON  
ECOLE DOCTORALE « ENVIRONNEMENTS-SANTE »

Thèse en vue de l'obtention du grade de docteur en  
**Sciences de la Vie et de la Santé**

**ROLE DE LA PORINE OPRD ET DU SYSTEME D'EFFLUX MEXEF-OPRN  
DANS LA RESISTANCE DES SOUCHES CLINIQUES  
DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* AUX ANTIBIOTIQUES.**

Présentée et soutenue publiquement par  
Charlotte RICHARDOT  
Le 3 décembre 2015

Sous la co-direction de Mme le Dr Catherine Llanes et de Mr le Pr Patrick Plésiat

Membres du jury :

Dr Thilo Köhler

Dr Romé Voulhoux

Pr Sylvie Chevalier

Dr Catherine Llanes

Pr Patrick Plésiat

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directrice de thèse

Co-directeur de thèse

*A mon père, qui m'a toujours poussée à donner le meilleur de moi-même et grâce à qui j'ai continué mes études.*

## *Remerciements*

Si avant de commencer une thèse, on nous prévient que ce sera difficile, long et qu'il faudra fournir une charge de travail importante, on ne nous prévient pas que ce travail est soutenu, parfois même porté, par tout un laboratoire. Mon projet, comme tout travail de doctorat n'a été possible que grâce à la présence de nombreuses personnes que je tiens ici à remercier chaleureusement.

*Aux membres du jury, qui ont accepté, malgré un emploi du temps chargé d'évaluer ce travail.*

J'adresse mes plus sincères remerciements au Dr Thilo Köhler et au Dr Romé Voulhoux, ainsi qu'au Pr Sylvie Chevalier. C'est un honneur que vous soyez les juges de mon travail.

*A mes directeurs de thèse, Catherine et Patrick*

Chef, malgré un emploi du temps de plus en plus chargé, vous avez toujours pris le temps de répondre à mes nombreuses questions. Que ce soit de manière informelle, ou en réunion recherche vous m'avez toujours fournis de nombreux conseils. Je vous en suis très reconnaissante. Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire, de m'avoir fait confiance et d'avoir partagé avec moi votre savoir. Merci également pour tous les bons moments partagés le midi !

Catherine, c'est avec vous que j'ai le plus échangé. C'est vous qui m'avez donné envie de faire de la bactério lorsque j'étais en M1. Aujourd'hui, ce travail n'aurait jamais été possible sans vous, votre détermination, votre confiance et votre soutien ! Merci de m'avoir donné ma chance, merci de m'avoir fait confiance, merci de m'avoir tant appris et merci d'avoir été « ma maman du labo » ! Que ce soit pour parler boulot ou de ce que j'allais faire le week-end vous avez toujours été de bons conseils ! Merci également pour votre soutien lorsque je devais présenter en congrès, je sais que c'était difficile pour vous de me voir stresser !

*Aux anciens, Cécé et SoF*

Vous m'avez accueillie au labo, appris tout ce que vous saviez et soutenue dans les bons comme les mauvais moments. Si je n'étais pas tombée sur des personnes aussi géniales que vous en M2, je n'aurais probablement pas eu le courage de commencer cette thèse. Vous m'avez donné la confiance et la force de faire de ce rêve de petite fille, une réalité. Merci du fond du cœur pour votre amitié, elle m'est très précieuse.

*A ma complice des débuts, Mallo alias ma coupine*

Celle sans qui je n'aurais probablement pas survécu au départ des anciens... Tu as été là dès mes débuts au labo en M2 et tu es restée à mes côtés tout au long de ce projet. Sans toi les

pauses clopes auraient été bien ennuyeuses... Merci de ton soutien, de ton écoute et de ton amitié.

*A ma collègue et amie, Aurélie*

Je ne sais par où commencer tellement j'ai de choses à te dire. Tu as toujours été là, à vivre les mêmes choses que moi au même moment. C'est l'avantage de commencer une thèse en même temps. On a pu tout partager pendant ces 4 ans. Moi qui pensais me faire des collègues au boulot, je me suis en réalité fait une amie. Même si tu m'as abandonnée pour Paris (2 fois !!) on a toujours pu compter l'une sur l'autre et j'espère que ça perdurera ! Merci pour tout, tes conseils (manip et vie privée), ta bonne humeur, ta joie de vivre, nos moments filles, la soirée shark, la prépa de nos mariages, ton soutien et je dois en oublier tellement la liste est longue...

*A mon « stagiaire » devenu thésard à son tour, Paulo*

A ton tour de devenir l'ancien du labo ! On a fait un beau travail avec ton M2, tu feras une merveilleuse thèse j'en suis sûre. Le chouchou, qu'on se sentait obligés de protéger avec Catherine a grandi et tu deviens aujourd'hui le plus ancien ! Je ne me sens pas inquiète pour la suite, la relève est plus que largement assurée. Saches en tout cas, que ce soit boulot (avec nos théories fumeuses...) ou perso j'ai adoré discuter de tout et de rien avec toi.

*A toutes les personnes du labo de bactério et parasito*

Katy, Caro, Eléni, Isabelle, Damien, Anaïs, les dames de la laverie, Loïs, Marjorie, Emeline, Amélie, Pauline, Steffi, Coralie, Audrey, Béné, Jenny, Alex (aux nombreux surnoms), Adeline, Benoît.

Que ce soit pour partager un repas, un trajet de voiture, une petite pause de 5 minutes de discussions, des conseils manips, nos échanges ont toujours été pour moi un réel plaisir. Merci à tous d'avoir été présents.

*A ceux du « dessous » et d' « à coté »*

Adeline, Adrien, François, Elise, Manue, Anne de la cancéro.

Vous avez toujours été là pour des moments détente ou des conseils manips. Merci les coupains !!!

Fabrice et Amandine du séquençage.

Merci d'avoir toujours facilité ce travail d'analyse de séquence. Votre expertise et vos conseils m'ont été très précieux.

Microtubule et Youssef de dermato, Seb du service technique

Merci pour ces pauses toujours sous le signe de la rigolade !

*Aux gens de passages, stagiaires, CDD etc...*

Anne-Sosso, Marine, Corentin, Meryem, Arnaud (alias Mr Sourire ou depuis peu *Mr Smile*), Mélanoche, Thibaut, Maxime.

Vous êtes venus puis repartis mais toujours en vous intégrant parfaitement à cette équipe, en ajoutant votre touche fantaisie. Une trace de vous restera dans le recueil de nos moments de craquage au labo. Ça a été génial de partager des moments avec vous !

*A toutes les personnes du GDR*

Merci pour ces réunions annuelles, toujours dans une ambiance décontractée ! C'était un plaisir de partager sur « le pyo » avec vous !

*A ma famille, ma belle-famille et mes amis*

Maman, Patrice, Gilles, Léa, mes oncles et tantes, mes cousins-cousines, mes grands parents, Agnès, Pierre, Jean-Luc, Sista et Little sista, Tangeek, Maurice, Violette, les Valin et tous les Saurat...

Vous vous êtes toujours intéressés à mon travail qui pouvait vous paraître très obscur, merci. J'ai toujours pu compter sur vous pour me changer les idées quand ça n'allait pas ! Votre soutien m'a été très précieux ! Je vous aime ! Une mention spéciale à ma grand-mère qui a fait l'effort d'apprendre le titre de ma thèse par cœur !

*A l'homme qui partage ma vie, et qui sait faire un antibiogramme tout seul !*

Ce travail est aussi le tien, vu le nombre de fois où tu es venu avec moi au labo le week-end !

Tu as été au premier plan durant ces 4 ans. Toujours là pour partager mes joies (mon clonage a marché !!!!) comme les moins bons moments (pffff, j'en ai marre, toutes mes manip foirent, je suis nulle...). Tu as toujours essayé de comprendre ce que je faisais, dans quel but et pourquoi ça ne marchait pas. Tu as été merveilleux tout au long de ce parcours ! Merci d'être toi tout simplement, je t'aime !

## Abréviations

° : Degré	CNR : Centre national de référence
°C : Degré Celsius	CT : <i>Cycle threshold</i>
µg : Microgramme	CTX : Céfotaxime
µg/µL : Microgramme par microlitre	DL : Dose létale
µg/mL : Microgramme par millilitre	DMSO : Diméthylsulfoxyde
µL : Microlitre	dNTP : Désoxyribonucléoside tri-phosphate
µM : Micromolaire	DOR : Doripénème
2D : 2 dimensions	E : Efficacité
3D : 3 dimensions	EBP : <i>Enhancer Binding Proteins</i>
Å : Angström	EDTA : Acide éthylène diamine-tétracétique
AA : Acide Aminé	FOX : Céfoxitine
ABC : <i>ATP-binding cassette</i>	FQ : Fluoroquinolones
ABS : <i>Activation binding site</i>	g : Accélération de la pesanteur
ADN : Acide désoxyribonucléique	GEN : Gentamicine
ADNc : ADN complémentaire	GERPA : Groupe d'étude de la résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
AMK : Amikacine	GESPAR : Groupe d'étude de la sensibilité de <i>P. aeruginosa</i> en réanimation
ARN : Acide ribonucléique	h : Heure
ARNm : ARN messenger	H-NS : <i>Histone-like nucleoid structuring protein</i>
ATP : Adénosine tri-phosphate	HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
BCIP : 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate	HHQ : 2-heptyl-4-quinolone
BET : Bromure d'éthidium	HSI : <i>Hcp1 secretion island</i>
BL : β-lactamine	HSL : Homosérine lactone
BLSE : β-lactamase à spectre élargi	HTH : <i>Helix-turn-helix</i>
BM2 : <i>Basal medium 2</i>	<i>Indel</i> : Insertion/délétion de nucléotide
BMR : Bactérie multi-résistante	IPM : Imipénème
BSA : <i>Bovin serum albumin</i>	IS : Séquence d'insertion
CAR : Carbénicilline	kDa : Kilo Dalton
CA-SFM : Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie	LTTR : <i>LysR type transcriptional regulator</i>
CAZ : Ceftazidime	M : Molaire
CBM : Carbapénèmes	MATE : <i>Multidrug and toxic compound extrusion</i>
CF : <i>Cystic fibrosis</i> , mucoviscidose	MC : Macrolides
ChiP : <i>Chromatin immunoprecipitation</i> , immunoprécipitation de chromatine	
CHL : Chloramphénicol	
CHRU : Centre hospitalo-universitaire régional	
CMI : Concentration minimale inhibitrice	

**McF** : McFarland  
**MDR** : *Medium chain dehydrogenases/reductases*  
**MEM** : Méropénème  
**MFS** : *Major facilitator superfamily*  
**mg/mL** : Milligramme par millilitre  
**mg/L** : Milligramme par litre  
**MH** : Mueller-Hinton  
**MHA** : Mueller-Hinton agar  
**MHB** : Bouillon Mueller-Hinton  
**MHc** : Mueller-Hinton calibré  
**min** : Minute  
**mL** : Millilitre  
**MLVA** : *Multiple loci VNTR analysis*  
**mm** : Millimètre  
**mM** : Millimolaire  
**MOPS** : Acide 3-(N-morpholino)propane sulfonique  
**Mpb** : Mégapaire de bases  
**MTA** : *Multidrug Transporter Activators*  
**MβL** : Métallo-β-lactamase  
**NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide  
**NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate  
**NBT** : Bleu de tétrazolium  
**ND** : Non déterminé  
**nfxB** : mutants surproduisant le système d'efflux MexCD-OprJ  
**nfxC** : mutants surproduisant le système d'efflux MexEF-OprN  
**ng** : Nanogramme  
**nm** : Nanomètre  
**NOV** : Novobiocine  
**NS** : Non spécifique  
**OFL** : Ofloxacin  
**p/v** : Poids/volume  
**PAβN** : *Phenyl Arginine β-Naphtylamide*  
**PB** : *Penicillin Binding*  
**pb** : Paire de bases  
**PBS** : *Phosphate buffered saline*  
**PCR** : *Polymerase chain reaction*  
**PIA** : *Pseudomonas isolation agar*

**PLP** : Protéines liant la pénicilline  
**POTRA** : *Polypeptide Translocation associated*  
**PQS** : *Pseudomonas quinolone signal*  
**pS** : Pétaseconde  
**psi** : *Pound per square inch*  
**QRDR** : *Quinolone resistance-determining regions*  
**Qrh** : *Quinone oxydoreductase homologue*  
**QS** : *Quorum sensing*  
**RBS** : *Regulatory binding site*  
**RD** : *Rossmann-like domain*  
**RNAseq** : Séquençage des ARN  
**RND** : *Resistance, nodulation, cell division*  
**rpm** : Rotation par minute  
**RT-qPCR** : PCR quantitative en temps réel  
**SDS-PAGE** : Electrophorèse en gel de polyacrylamide contenant du sodium dodécyl sulfate  
**sec** : Seconde  
**sec/kb** : Seconde par kilobase  
**SFR-FED** : Structure fédérative de recherche  
**SMR** : *Small Multidrug Resistance*  
**SNP** : *Single nucleotide polymorphisms*  
**SYBR** : *Synergy brand*  
**T3SS** : Système de sécrétion de type III  
**T6SS** : Système de sécrétion de type VI  
**TAE** : Tris acétate EDTA  
**TBS** : *Tris buffer saline*  
**TCS** : *Two components system*  
**TET** : Tétracycline  
**TMP** : Triméthoprime  
**UFC** : Unité formant colonie  
**UFC/mL** : Unité formant colonie par millilitre  
**UTR** : *Untranslated region*  
**V** : Volt  
**v/v** : Volume/volume  
**VNTR** : *Variable number of tandem repeats*

# Sommaire

Liste des figures .....	5
Liste des tableaux.....	7
<b>A. Introduction .....</b>	<b>9</b>
<b>B. Synthèse bibliographique.....</b>	<b>15</b>
<b>1 Les carbapénèmes .....</b>	<b>17</b>
1.1 Structure des carbapénèmes .....	17
1.2 Mécanisme d'action des carbapénèmes.....	18
1.2.1 Les porines chez <i>P. aeruginosa</i> , voie d'entrée des antibiotiques .....	19
1.2.2 Les PLP, cibles des carbapénèmes.....	21
1.3 Spectre d'activité des carbapénèmes et utilisation en thérapeutique anti-pyocyanique ....	23
<b>2 Résistance de <i>P. aeruginosa</i> aux carbapénèmes .....</b>	<b>24</b>
2.1 Résistance naturelle par la $\beta$ -lactamase AmpC.....	25
2.2 Résistance acquise par altération des PLP .....	26
2.3 Rôle du système d'efflux actif MexAB-OprM .....	26
2.3.1 Contribution de MexAB-OprM à la résistance naturelle.....	26
2.3.2 Contribution de MexAB-OprM à la résistance acquise .....	27
2.4 Résistance aux carbapénèmes due à la porine OprD.....	29
2.5 Expression simultanée de mécanismes non-enzymatiques de résistance aux carbapénèmes	29
<b>3 Contribution de la porine OprD à la résistance acquise aux carbapénèmes.....</b>	<b>30</b>
3.1 La porine OprD .....	30
3.1.1 Adressage de la porine à la membrane externe .....	31
3.1.2 Présentation générale de la structure de OprD .....	35
3.1.3 Constriction du pore.....	37
3.1.4 Passage des substrats au travers de la porine .....	38
3.2 Mécanismes de résistance liés à la porine OprD.....	40
3.2.1 Altération de la structure 3D de OprD .....	41
3.2.2 Le gène <i>oprD</i> : une régulation complexe.....	43
<b>4 Les systèmes d'efflux chez <i>P. aeruginosa</i> .....</b>	<b>50</b>
4.1 Structure des systèmes d'efflux RND .....	50
4.2 Assemblage des systèmes d'efflux RND.....	52
4.3 Prise en charge des substrats par la pompe.....	53
4.4 Les molécules prises en charge par les systèmes RND.....	54
<b>5 Le système d'efflux MexEF-OprN .....</b>	<b>55</b>
5.1 Les molécules prises en charge par MexEF-OprN .....	56
5.2 Structure de l'opéron d'efflux <i>mexEF-oprN</i> .....	59
5.2.1 La région intergénique <i>mexT-mexE</i> .....	60
5.2.1 La région intergénique <i>mexS-mexT</i> .....	60
<b>6 La régulation locale du système d'efflux MexEF-OprN .....</b>	<b>61</b>
6.1 Les régulateurs de la famille LysR (LTTRs).....	61
6.2 Impact des mutations dans MexT .....	63
6.3 Le rôle de la protéine MexS.....	65
6.4 Hypothèses de régulation par le couple MexS/MexT .....	66
6.5 Les autres régulateurs potentiels de MexEF-OprN .....	67

6.5.1	NmoR .....	69
6.5.2	AmpR .....	69
6.5.3	PA2449.....	70
6.5.4	ParRS.....	71
6.5.5	MxtR .....	71
6.5.6	MvaT .....	72
6.5.7	BrlR .....	72
6.5.8	VqsR.....	73
6.5.9	RsmA.....	74
<b>7</b>	<b>MexEF-OprN : un système inductible.....</b>	<b>74</b>
<b>8</b>	<b>Phénotype des mutants <i>nfxC</i>.....</b>	<b>76</b>
8.1	Phénotype de résistance des mutants <i>nfxC</i> .....	77
8.2	Virulence des mutants <i>nfxC</i> .....	78
8.2.1	La virulence MexEF-OprN dépendante .....	80
8.2.2	La virulence dépendant de MexT et de MexEF-OprN .....	82
8.2.3	Les systèmes de sécrétion de type III et VI dépendant de MexT .....	83
8.3	Modification du métabolisme des mutants <i>nfxC</i> .....	85
<b>9</b>	<b>Les mutants <i>nfxC</i> dans les souches cliniques .....</b>	<b>87</b>
<b>C.</b>	<b>Résultats.....</b>	<b>91</b>
<b>1</b>	<b>Article 1 .....</b>	<b>93</b>
1.1	Résumé .....	95
1.2	Contribution au travail .....	96
1.3	Texte de l'article .....	96
<b>2</b>	<b>Article 2 .....</b>	<b>107</b>
2.1	Résumé .....	109
2.2	Contribution au travail .....	110
2.3	Texte de l'article .....	110
<b>3</b>	<b>Article 3 .....</b>	<b>121</b>
3.1	Résumé .....	123
3.2	Texte de l'article .....	124
<b>4</b>	<b>Résultats complémentaires de l'étude OprD :.....</b>	<b>129</b>
4.1	La résistance aux carbapénèmes peut résulter de la sous-expression du gène <i>oprD</i> .....	129
4.1.1	Impact de mutations dans le promoteur de <i>oprD</i> .....	129
4.1.2	Implication des régulateurs des systèmes d'efflux actif .....	131
4.2	Identification de 7 mutants <i>nfxC</i> dans la collection GERPA-CF .....	132
4.3	Sélection de mutants <i>nfxC in vitro</i> .....	134
4.3.1	Effet des concentrations de ciprofloxacine sur la sélection de mutants <i>nfxC in vitro</i> .....	135
4.3.2	Origine génétique de la surexpression de <i>mexEF-oprN</i> .....	135
<b>5</b>	<b>Article 4 .....</b>	<b>139</b>
5.1	Résumé .....	141
5.2	Texte de l'article .....	142
<b>6</b>	<b>Résultats complémentaires à l'article 4.....</b>	<b>173</b>
6.1	Séquençage à haut débit pour identifier un nouveau régulateur de MexEF-OprN .....	173
6.1.1	Sélection des souches cliniques surproductrices de MexEF-OprN .....	173
6.1.2	Analyse du séquençage à haut débit.....	175
<b>D.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>179</b>
<b>E.</b>	<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>191</b>

<b>1</b>	<b>Techniques microbiologiques .....</b>	<b>193</b>
1.1	Souches bactériennes et plasmides utilisés .....	193
1.2	Milieux de culture.....	196
1.3	Mesure de la croissance bactérienne.....	197
1.4	Détermination de la sensibilité aux antibiotiques .....	197
1.4.1	Antibiogrammes .....	197
1.4.2	Détermination de la CMI des antibiotiques .....	197
1.5	Evaluation de la virulence .....	198
1.5.1	Dosage spectrométrique de l'activité hémolytique .....	198
1.5.2	Dosage spectrométrique de la pyocyanine .....	198
1.5.3	Mise en évidence du <i>swarming</i> .....	199
1.5.4	Activité de l'élastase.....	199
1.5.5	Dosage spectrométrique de la capacité d'attachement à une surface plastique.....	200
1.6	Sélection de mutants résistants à la ciprofloxacine .....	200
<b>2</b>	<b>Techniques de biologie moléculaire .....</b>	<b>201</b>
2.1	Extraction d'acides nucléiques .....	201
2.1.1	Extraction d'ADN génomique .....	201
2.1.2	Extraction d'ADN plasmidique.....	201
2.2	Amplification d'ADN par PCR .....	201
2.2.1	Hydrolyse de l'ADN par les endonucléases de restriction .....	204
2.2.2	Electrophorèse en gel d'agarose .....	204
2.1	Techniques de clonage .....	204
2.1.1	Purification des fragments d'ADN .....	205
2.1.2	Ligature des fragments d'ADN .....	205
2.2	Transformation bactérienne .....	205
2.2.1	Transformation par choc thermique de cellules de <i>E. coli</i> rendues compétentes par le chlorure de rubidium.....	205
2.2.2	Conjugaison bactérienne.....	206
2.3	Complémentation chromosomique .....	206
2.4	Séquençage de l'ADN .....	207
2.4.1	Séquençage Sanger .....	207
2.4.2	Séquençage à haut débit, technologie PGM Ion Torrent .....	207
2.5	Quantification des ARNm par PCR en temps réel .....	213
2.5.1	Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADNc .....	213
2.5.2	Amplification des ADNc.....	213
2.5.3	Quantification relative des transcrits des gènes .....	214
<b>3</b>	<b>Western botting de la protéine OprD .....</b>	<b>215</b>
3.1	Extraction des protéines de membrane externe .....	215
3.2	Dosage des protéines .....	215
3.3	Electrophorèse en gel de poly-acrylamide .....	216
<b>F.</b>	<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>217</b>

## Liste des figures

<i>Figure 1 : Modification de la thiénamycine pour la production des carbapénèmes synthétiques (Papp-Wallace et al., 2011; Piddock, 2006).</i> .....	17
<i>Figure 2 : Structure des 4 carbapénèmes commercialisés en France.</i> .....	18
<i>Figure 3 : Voie de passage des carbapénèmes à travers la paroi des bactéries à Gram négatif.</i> .....	18
<i>Figure 4 : Hydrolyse du cycle <math>\beta</math>-lactame par une <math>\beta</math>-lactamase.</i> .....	25
<i>Figure 5 : La régulation de l'opéron mexAB-oprM.</i> .....	28
<i>Figure 6 : Le passage de la pré-protéine à travers la membrane interne via le translocon Sec.</i> .....	32
<i>Figure 7 : Le passage de la pré-protéine à travers le périplasme et son insertion dans la membrane externe.</i> .....	33
<i>Figure 8 : Représentation tridimensionnelle de la porine OprD.</i> .....	35
<i>Figure 9 : Représentation 2D de la structure de la porine OprD présumée et cristallisée.</i> .....	36
<i>Figure 10 : Comparaison de la taille du pore au sein de la porine OprD d'après les modèles cristallins des équipes de Biswas et de Eren.</i> .....	37
<i>Figure 11 : Polymorphisme de OprD.</i> .....	39
<i>Figure 12 : Passage de l'arginine à travers la porine OprD.</i> .....	40
<i>Figure 13 : La région promotrice du gène oprD.</i> .....	43
<i>Figure 14 : La régulation complexe du gène oprD.</i> .....	44
<i>Figure 15 : Les voies de surproduction du système d'efflux MexXY.</i> .....	47
<i>Figure 16 : La régulation conjointe de l'opéron czcCBA et du gène oprD par les systèmes CzcRS et CopRS.</i> .....	48
<i>Figure 17 : Les systèmes d'efflux chez P. aeruginosa.</i> .....	50
<i>Figure 18 : Structure du système d'efflux MexAB-OprM.</i> .....	51
<i>Figure 19 : Représentation schématique du mouvement péristaltique d'une pompe d'efflux de type RND grâce à l'énergie proton-motrice.</i> .....	53
<i>Figure 20 : Voie de synthèse du PQS, molécule clé dans la régulation du quorum sensing et de la virulence chez Pseudomonas aeruginosa.</i> .....	57
<i>Figure 21 : Le système du quorum sensing chez P. aeruginosa.</i> .....	58
<i>Figure 22 : Opéron mexEF-oprN et les régions intergéniques mexS-mexT et mexT-mexE.</i> .....	59
<i>Figure 23 : Structure d'un régulateur de type LysR.</i> .....	61

<i>Figure 24 : Représentation tridimensionnelle d'un quadrimère de LTTR fixé aux domaines RBS et ABS de la double hélice d'ADN.</i>	62
<i>Figure 25 : Régulation par les régulateurs de type LysR.</i>	63
<i>Figure 26 : Mécanismes génétiques liés à MexS/MexT, à l'origine de la surexpression de mexEF-oprN.</i>	66
<i>Figure 27 : Différents régulateurs décrits pour réguler l'opéron mexEF-oprN.</i>	68
<i>Figure 28 : La régulation de mexEF-oprN par NmoR.</i>	69
<i>Figure 29 : Structure du chloramphénicol, du florphénicol et du S-nitrosoglutathion.</i>	75
<i>Figure 30 : Antibiogrammes de la souche de référence PAO1, d'un mutant nfxC et d'un mutant nfxB surproduisant respectivement les systèmes d'efflux MexEF-OprN et MexCD-OprJ.</i>	76
<i>Figure 31 : Phénotype de virulence des mutants nfxC.</i>	79
<i>Figure 32 : Contrôle de la production de facteurs de virulence par les molécules du QS et conséquences de la surproduction de MexEF-OprN chez P. aeruginosa.</i>	81
<i>Figure 33 : la régulation des systèmes de sécrétion de type 3 (T3SS) et de type 6 (T6SS) par MexT.</i>	84
<i>Figure 34 : Le cyanure d'hydrogène (HCN) est synthétisé à partir de la glycine par l'hydrogène cyanide synthase (HCN synthase) codée par l'opéron hcnABC.</i>	87
<i>Figure 35 : Western blotting de la porine OprD dans la membrane externe chez les mutants transcomplémentés dont le promoteur du gène oprD est muté (A<sub>45</sub>C).</i>	130
<i>Figure 36 : Mutants nfxC (n = 62) /non nfxC (n = 17) sélectionnés sur différentes concentrations de ciprofloxacine.</i>	136
<i>Figure 37 : Pourcentage de mutants nfxC sélectionnés au cours du temps, en fonction de la concentration de ciprofloxacine.</i>	137
<i>Figure 38 : Profils électrophorétiques réalisé pour le génotypage des souches des 4 groupes nfxC/WT par PCR MLVA.</i>	174
<i>Figure 39 : Stratégie d'analyse du séquençage à haut débit des souches 109070/2607 (WT/nfxC).</i>	176
<i>Figure 40 : Mise en évidence du swarming.</i>	199
<i>Figure 41 : Mise en évidence de l'activité de l'élastase</i>	199
<i>Figure 42 : Préparation de la banque d'ADN génomique.</i>	209
<i>Figure 43 : Amplification clonale sur billes par PCR en émulsion</i>	210
<i>Figure 44 : Technique de séquençage selon la technologie PGM Ion Torrent.</i>	211

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des porines chez <i>P. aeruginosa</i> .....	20
Tableau 2: Classification des différentes PLP chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	22
Tableau 3 : CMI des carbapénèmes chez PAO1 et ses dérivés. ....	24
Tableau 4 : Evénements génétiques à l'origine de la perte de la porine OprD dans la membrane externe de souches cliniques. ....	42
Tableau 5: Les substrats pris en charge par les différents systèmes RND de <i>P. aeruginosa</i> . ....	55
Tableau 6 : Polymorphisme de MexT décrit dans la littérature. ....	64
Tableau 7 : Impact des régulateurs de mexEF-oprN sur l'expression de l'opéron et sur le phénotype de résistance chez différents mutants dérivés de PAO1 ou PA14. ....	68
Tableau 8 : Etude de la sous-expression de oprD sur la résistance aux carbapénèmes des souches GERPA-CF.....	130
Tableau 9 : Niveaux de transcrits et séquences protéiques des gènes régulateurs de mexEF-oprN et mexXY chez les souches CF sous-exprimant le gène oprD.....	131
Tableau 10 : Niveaux relatifs de transcrits du gène mexE et séquences protéiques de MexS et MexT chez les mutants nfxC de la collection de souches GERPA-CF. ....	133
Tableau 11 : Analyse de 26 mutants nfxC dérivés de PA14 et sélectionnés sur des concentrations sub-inhibitrices de ciprofloxacine. ....	138
Tableau 12 : Caractéristiques des groupes de souches nfxC/WT isolées au CHRU de Besançon. ....	175
Tableau 13 : Résultats du séquençage à haut débit : gènes mutés chez le mutant 2607 et potentiellement impliqués dans la régulation de mexEF-oprN. ....	178
Tableau 14: Liste des souches utilisées dans cette étude.....	193
Tableau 15 : Liste des plasmides utilisés dans ce travail. ....	195
Tableau 16 : Liste des amorces utilisées pour les réactions de séquençage, RT-qPCR, inactivation génique et complémentation. ....	202

## *A. Introduction*

---

Nommé bacille pyocyanique lors de sa découverte en 1882 en raison du pigment bleu qu'il produit, *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie ubiquitaire des milieux humides tels que les lacs et les rivières, les piscines mais également les eaux polluées. Grâce à la grande taille de son génome (de 5,2 à 7 Mpb), ne contenant pas moins de 5600 gènes, ce bacille est capable de coloniser et de s'adapter à toutes sortes d'environnements. Sa versatilité nutritionnelle et métabolique, son aptitude à percevoir les changements de son milieu et sa capacité à produire tout un arsenal de facteurs de virulence lui ont permis de s'imposer comme pathogène opportuniste majeur de l'homme, en étant la 3<sup>ème</sup> cause des infections nosocomiales derrière *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*. Quasiment inoffensif chez l'individu sain, *P. aeruginosa* peut se révéler redoutable chez les personnes immunodéprimées, les grands brûlés ou encore les patients atteints de mucoviscidose (CF, *Cystic Fibrosis*) chez qui ce germe trouve toutes les conditions nécessaires à son développement et sa persistance. L'élément-clé de son succès est une résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques nettement supérieure à celle de la plupart des autres espèces microbiennes. Cette particularité s'explique à la fois par l'existence de mécanismes de résistance intrinsèques, caractéristiques de l'espèce, mais également par le développement de résistances supplémentaires, résultant du transfert d'éléments génétiques mobiles ou plus souvent, de mutations sélectionnées par la pression antibiotique.

Ainsi, la faible perméabilité de la membrane externe de *P. aeruginosa* constitue sa première ligne de défense contre les molécules antibiotiques. Ce microorganisme produit également des enzymes inactivatrices telles que la céphalosporinase AmpC et l'enzyme APH(3')-IIb, le rendant insensible à diverses  $\beta$ -lactamines et plusieurs aminosides. Enfin, la production de deux systèmes d'efflux actif de la famille RND, MexAB-OprM et MexXY/OprM, permet l'export de nombreuses molécules toxiques (dont les antibiotiques) du périplasme vers le milieu extérieur.

La bactérie peut atteindre des niveaux de résistance encore plus élevés suite à (i) la diminution de la perméabilité de la membrane externe lorsque ses porines sont altérées, (ii) la surexpression d'un ou plusieurs de ses systèmes d'efflux, (iii) l'élargissement du spectre de la céphalosporinase naturelle AmpC, ou (iv) la modification de la cible des antibiotiques consécutive à des mutations (Lister *et al.*, 2009).

Au milieu des années 1980, de nouvelles molécules bactéricides font leur apparition dans l'arsenal thérapeutique antipyocyanique : les carbapénèmes. Leur large spectre antibactérien et leur grande stabilité envers les  $\beta$ -lactamases les rendent particulièrement intéressants dans le traitement des infections nosocomiales. Toutefois, leur passage à travers la membrane externe de *P. aeruginosa* s'effectuant principalement par la porine spécifique OprD, les premiers cas de résistance due à des altérations membranaires ne tardent pas à faire leur apparition (Masuda *et al.*, 1995). De plus, le système d'efflux MexAB-OprM s'avère capable de transporter certaines de ces molécules et donc de réduire leur efficacité lorsque la pompe est surproduite (Köhler *et al.*, 1999b). Chez *P. aeruginosa*, l'accumulation de mutations conduisant à la coexistence de ces deux phénomènes n'est pas rare, notamment chez les souches CF (Tomás *et al.*, 2010).

L'analyse des mécanismes de résistance aux carbapénèmes chez les souches cliniques a montré que l'absence de porine OprD dans la membrane externe pouvait résulter de mutations inactivant le gène *oprD* ou entraînant la répression de ce dernier (Castanheira *et al.*, 2014a; Giske *et al.*, 2008; Quale *et al.*, 2006; Riera *et al.*, 2011; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009) (partie C. Résultats). Ainsi, certains régulateurs de systèmes d'efflux ont un effet négatif sur la transcription du gène *oprD*. Par exemple, la porine est inversement co-régulée avec le système MexEF-OprN, ce qui conduit à une résistance conjointe aux fluoroquinolones, triméthoprim, chloramphénicol

(substrats de MexEF-OprN) et aux carbapénèmes (substrats de OprD). Exprimée à un niveau basal très faible chez les souches sauvages, cette pompe d'efflux est fortement surproduite chez les mutants appelés *nfxC* (*norfloxacin resistant mutants*). Le phénotype NfxC survient principalement en raison de mutations inactivant l'oxydoréductase MexS (mutants *mexS*). Bien décrits parmi les souches de laboratoire, ces mutants restent toutefois mal caractérisés parmi les isolats cliniques.

Dans les deux premières parties de ce manuscrit, nous ferons la synthèse des données de la littérature sur la résistance aux carbapénèmes chez *P. aeruginosa*, puis nous présenterons les objectifs de notre étude portant sur le rôle de la porine OprD et de la pompe d'efflux MexEF-OprN dans la résistance aux antibiotiques. Un troisième chapitre sera consacré aux résultats obtenus au cours de notre travail de thèse. Nous discuterons ces résultats dans une quatrième partie et enfin, dans le dernier volet, nous décrirons le matériel et les méthodes utilisés pour réaliser ce projet.

## *B. Synthèse bibliographique*

---

# 1 LES CARBAPÉNÈMES

Les carbapénèmes sont des agents antibactériens de la famille des  $\beta$ -lactamines. La première molécule de cette sous-famille, l'acide olivanique, a été découverte en 1976 chez *Streptomyces clavuligerus* et représente la première  $\beta$ -lactamine à large spectre (Brown *et al.*, 1976; Piddock, 2006). Mais, en raison de son instabilité et de sa mauvaise diffusion à travers la paroi bactérienne, c'est la thiénamycine, isolée peu de temps après chez *Streptomyces cattleya*, qui devient le modèle pour le *design* des carbapénèmes utilisés aujourd'hui en thérapeutique (Kahan *et al.*, 1979). Cette molécule, en plus de son activité  $\beta$ -lactamine, est également un inhibiteur de  $\beta$ -lactamase (Toda *et al.*, 1980).

## 1.1 STRUCTURE DES CARBAPÉNÈMES

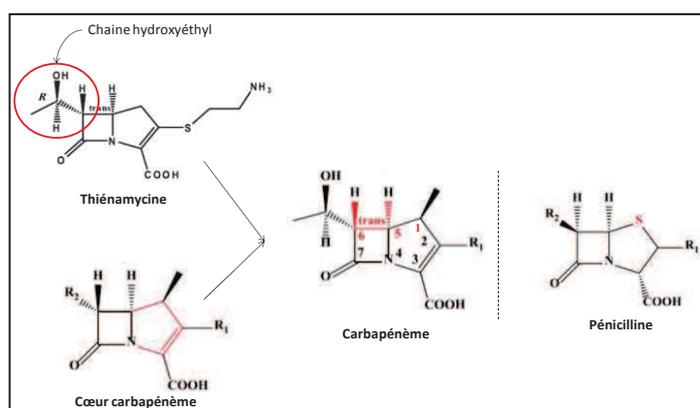
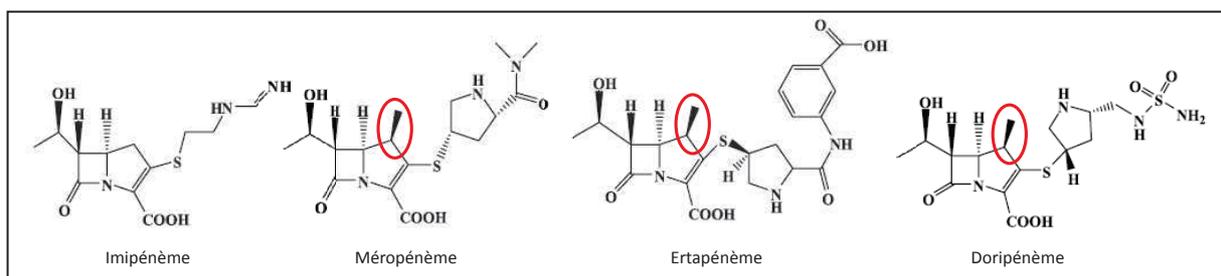


Figure 1 : Modification de la thiénamycine pour la production des carbapénèmes synthétiques (Papp-Wallace *et al.*, 2011; Piddock, 2006). La chaîne hydroxyéthyl et les carbones C1, C5-C6, caractéristiques des carbapénèmes, sont indiqués en rouge.

Les molécules de carbapénèmes sont caractérisées par une double liaison C2-C3 (Figure 1). La présence de la chaîne hydroxyéthyl de la thiénamycine de même que la configuration *trans* des carbones C5 et C6 confère à cette molécule une stabilité face aux  $\beta$ -lactamases. Le carbone C1 qui remplace le

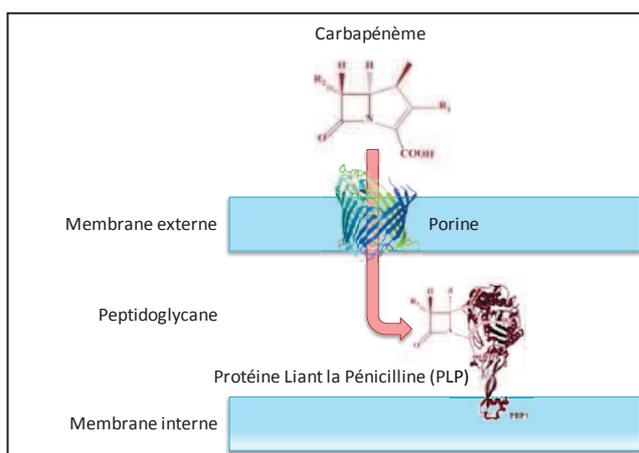
soufre, commun à tous les antibiotiques de la famille des pénicillines, joue un rôle majeur en permettant d'agrandir le spectre d'activité de la molécule (Papp-Wallace *et al.*, 2011). L'imipénème est le premier carbapénème de synthèse produit directement à partir de la structure de la thiénamycine : il est à la fois plus stable et moins sensible

à l'hydrolyse par les  $\beta$ -lactamases. En revanche, cet antibiotique est inactivé par la déshydropeptidase I produite par les cellules rénales humaines (Hikida *et al.*, 1992). Son utilisation en thérapeutique se fait donc en complément d'un inhibiteur de déshydropeptidase I : la cilastatine ou le  $\beta$ -mirpon (Norrby, 1985). Depuis, un groupement méthyl en position C1 $\beta$  a été ajouté sur les carbapénèmes de nouvelle génération (méro pénème, biapénème, ertapénème et doripénème : *Figure 2*) (Papp-Wallace *et al.*, 2011) afin de les protéger de l'action de cette peptidase (Fukasawa *et al.*, 1992).



*Figure 2 : Structure des 4 carbapénèmes commercialisés en France (adapté de (Papp-Wallace et al., 2011; Piddock, 2006)). Les cercles rouges désignent le groupement méthyl ajouté en C1 sur les carbapénèmes de nouvelle génération.*

## 1.2 MÉCANISME D'ACTION DES CARBAPÉNÈMES



*Figure 3 : Voie de passage des carbapénèmes à travers la paroi des bactéries à Gram négatif. Les carbapénèmes rejoignent l'espace périplasmique en traversant la membrane externe grâce à des porines. Ils se lient à leurs cibles cellulaires, les PLP.*

Les carbapénèmes diffusent difficilement à travers la bicouche lipidique qui forme le *continuum* de la membrane externe chez les bactéries à Gram négatif. En revanche, ils diffusent facilement à travers les canaux aqueux que constituent les porines (*Figure 3*). Une fois dans le périplasmique, ils s'acylent de manière irréversible aux PLP (Protéines Liant

la Pénicilline) situées sur la face externe de la membrane cytoplasmique (Hashizume *et al.*, 1984).

### 1.2.1 Les porines chez *P. aeruginosa*, voie d'entrée des antibiotiques

Afin d'assurer la diffusion des nutriments, la membrane externe de *P. aeruginosa* est percée de nombreux canaux aqueux appelés porines. Ces canaux, spécifiques ou non, permettent l'entrée de solutés hydrophiles de petite taille (sucres, acides aminés, phosphates, cations divalents...) dans l'espace périplasmique (*Tableau 1*). A ce jour, 64 protéines canalaire ont été recensées chez *P. aeruginosa*. Elles sont classées en 4 familles : (i) les pores d'efflux/sécrétion de type OprM, (ii) les porines TonB-dépendantes de type OprC, (iii) les porines spécifiques de type OprD et (iv) les porines non spécifiques de type OprF, la porine majoritaire chez *P. aeruginosa* (Hancock & Brinkman, 2002; Lister *et al.*, 2009). Plusieurs de ces porines, spécifiques ou non, sont empruntées par les antibiotiques pour pénétrer à l'intérieur de la cellule (*Tableau 1*). Les carbapénèmes utilisent préférentiellement une porine spécifique appelée OprD pour franchir la barrière de la membrane externe. Toutefois, une étude récente vient de montrer qu'une porine de la même famille, OccD3 (précédemment appelée OpdP), est perméable au méropénème (Isabella *et al.*, 2015). En effet, la délétion du gène codant pour cette porine augmente de 2 à 8 fois la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) du méropénème selon que le gène *oprD* est fonctionnel ou inactivé. OccD3 pourrait être aussi impliquée dans le passage de l'imipénème et du doripénème. En effet, sa délétion n'affecte pas la CMI de ces deux antibiotiques, mais associée à la délétion de OprD, elle l'augmente 2 fois en comparaison à une souche délétée du gène *oprD* seul (Isabella *et al.*, 2015).

**Tableau 1 : Liste des porines chez *P. aeruginosa*.**

Famille <sup>a</sup>	Porine	Nom récent <sup>b</sup>	Substrats		Références
			Non-antibiotique	Antibiotique <sup>c</sup>	
OprD	OprD	OccD1	Acides aminés basiques, gluconate	IPM, MEM	(Tamber <i>et al.</i> , 2006; Trias & Nikaido, 1990a; Trias & Nikaido, 1990b)
	OpdC	OccD2	Histidine	-	(Tamber <i>et al.</i> , 2006)
	OpdP	OccD3	Dipeptides glycine-glutamate	MEM	(Isabella <i>et al.</i> , 2015; Tamber <i>et al.</i> , 2006)
	OpdT	OccD4	Tyrosine	-	(Tamber <i>et al.</i> , 2006)
	OpdI	OccD5	-	-	(Hancock & Brinkman, 2002)
	OpdB	OccD7	Proline	-	(Tamber <i>et al.</i> , 2006)
	OpdJ	OccD8	Acides aminés aromatiques	-	(Hancock & Brinkman, 2002)
	OpdK	OpdK	OccK1	Vanillate	CAR, FOX, TET
OpdF		OccK2	Hexuronates	GEN, CAR, FOX	(Eren <i>et al.</i> , 2012; Hancock & Brinkman, 2002)
OpdO		OccK3	Pyro-glutamate	CTX	(Eren <i>et al.</i> , 2012; Tamber <i>et al.</i> , 2006)
OpdL		OccK4	Phénylacétate	-	(Hancock & Brinkman, 2002)
OpdH		OccK5	Tricarboxylate	CAZ	(Tamber <i>et al.</i> , 2006; Tamber <i>et al.</i> , 2007)
OpdQ		OccK6	Nitrobenzoate	-	(Hancock & Brinkman, 2002)
OpdD		OccK7	Acides gras à chaîne courte ou dicarboxylates	-	(Hancock & Brinkman, 2002)
OprE		OccK8	Arginine ou proline	CAZ	(Yamano <i>et al.</i> , 1993; Yoneyama <i>et al.</i> , 1995)
OpdG		OccK9	Phtalates	-	(Hancock & Brinkman, 2002)
OpdN		OccK10	5- amino-levulinate ou glutamate	-	(Hancock & Brinkman, 2002)
OpdR		OccK11	Phénylacétate	-	(Hancock & Brinkman, 2002)
TonB2	OprC	-	CAZ, CAR, CHL	(Yoneyama <i>et al.</i> , 1995)	
NS	OprF	-	Non spécifique	CHL (Yoneyama <i>et al.</i> , 1995)	

<sup>a</sup> TonB2 : porine dépendante de TonB2, NS : porine non spécifique. <sup>b</sup> Nouvelle nomenclature proposée par (Eren *et al.*, 2012). <sup>c</sup> IPM : imipénème, MEM : méropénème, CAR : carbénicilline, FOX : céfoxitine, TET : tétracycline, GEN : gentamicine, CTX : céfotaxime, CAZ : ceftazidime et CHL : chloramphénicol.

### 1.2.2 Les PLP, cibles des carbapénèmes

Les PLPs sont des enzymes de la famille des “pénicilloyl sérine transférases » impliquées dans la synthèse et le recyclage du peptidoglycane (Farra *et al.*, 2008). Par leur domaine PB (*Penicillin Binding*) comprenant une sérine active, elles catalysent les étapes d’incorporation de nouvelles sous-unités de peptidoglycane (Legaree *et al.*, 2007). Ces enzymes possèdent également un domaine non-PB composé d’une séquence signal non-clivable enchâssée dans la membrane interne. Chez *P. aeruginosa*, on distingue 8 sortes de PLP qui ont chacune un rôle précis dans la synthèse du peptidoglycane. En 1997, Liao et Hancock montrent que les PLP de haut poids moléculaire (1a, 1b et 2) sont des enzymes vitales possédant à la fois une activité transpeptidase et glycosylase alors que les PLP de bas poids moléculaire (3, 3x, 4, 5/6 et 7) sont des carboxypeptidases non-essentiels à la survie cellulaire (Liao & Hancock, 1997). De fait, les PLP de haut poids moléculaire sont des cibles privilégiées pour les molécules à visée thérapeutique (*Tableau 2*). Ainsi, chez *P. aeruginosa*, tous les carbapénèmes possèdent une forte affinité pour la PLP2 (Papp-Wallace *et al.*, 2011). La délétion du gène *pbpA* codant pour cette enzyme entraîne l’apparition de bactéries de forme sphérique confirmant son rôle structurant pour la paroi bactérienne (Legaree *et al.*, 2007). L’imipénème possède également une forte affinité pour les PLP 4 et 5 alors que le méropénème, le doripénème et l’ertapénème se lient plus facilement à la PLP 3 (Davies *et al.*, 2008; Giske *et al.*, 2008; Hashizume *et al.*, 1984; Odenholt, 2001; Sakyo *et al.*, 2006).

Tableau 2: Classification des différentes PLP chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Classification	PLP	Gène	Antibiotiques fixés	Homologue chez <i>E. coli</i>	Référence
Haut poids moléculaire	1a	<i>ponA</i>	Ampicilline, cloxacilline, pipéracilline, +/- <b>imipénème*</b>	1a	(Liao & Hancock, 1997)
	1b	<i>ponB</i>	Céphalosporines, +/- <b>imipénème*</b>	1b	(Liao & Hancock, 1997)
	2	<i>pbpA</i>	Ampicilline, cloxacilline, pipéracilline, <b>carbapénèmes (imipénème, méropénème, doripénème, ertapénème)</b>	2	(Legaree <i>et al.</i> , 2007; Liao & Hancock, 1997)
Bas poids moléculaire	3	<i>pbpB</i>	Ceftazidime, aztréonam, céfépime, ampicilline, cloxacilline, pipéracilline, <b>méropénème<sup>§</sup>, doripénème, ertapénème</b>	3	(Liao & Hancock, 1997)
	3x	<i>pbpC</i>	Ceftazidime, aztréonam, céfépime	3 <i>homologue</i>	(Liao & Hancock, 1997)
	4	<i>dacB</i>	Céfoxitine, <b>imipénème<sup>§</sup></b>	4	(Hashizume <i>et al.</i> , 1984)
	5/6	<i>dacC</i>	Céfoxitine, cefmétazone, <b>imipénème<sup>§</sup></b>	5	(Farra <i>et al.</i> , 2008)
	7	<i>pbpG</i>	Inconnu	7	(Song <i>et al.</i> , 1998)

\* Faible affinité ; <sup>§</sup> forte affinité.

### 1.3 SPECTRE D'ACTIVITE DES CARBAPENEMES ET UTILISATION EN THERAPEUTIQUE ANTI-PYOCYANIQUE

Dans la famille des  $\beta$ -lactamines, les carbapénèmes ont les spectres d'activité les plus larges en raison de leur stabilité face à la plupart des  $\beta$ -lactamases (Zhanel *et al.*, 2007). Ils possèdent une activité bactéricide envers les bactéries à Gram négatif et Gram positif, excepté *Stenotrophomonas maltophilia* qui exprime naturellement une carbapénémase appelée L1 (Saino *et al.*, 1982). La plupart des bactéries à Gram positif sont très sensibles à l'imipénème et au doripénème alors que de nombreux Gram négatifs sont plus sensibles au méropénème et à l'ertapénème (Papp-Wallace *et al.*, 2011). L'imipénème et le méropénème, qui possèdent le spectre d'activité le plus étendu parmi les carbapénèmes, ont montré une très bonne efficacité dans le cas d'infections nosocomiales et d'infections polymicrobiennes (Bradley *et al.*, 1999).

Parmi les 4 carbapénèmes disponibles en France (imipénème, méropénème, doripénème et ertapénème), seul l'ertapénème n'est pas actif contre *P. aeruginosa* (Zhanel *et al.*, 2007). Les trois autres ont une activité comparable avec des CMI variant de 1 à 4 fois (Goulenok *et al.*, 2011; Jones *et al.*, 2004; Pillar *et al.*, 2008). L'utilisation des carbapénèmes est généralement restreinte aux patients avec des souches de *P. aeruginosa* multi-résistantes, responsables d'infections intra-abdominales compliquées, d'infections de la peau ou des tissus mous, du tractus urinaire, de pneumopathies et de méningites nosocomiales. Dans le cas de pneumonies nosocomiales à *P. aeruginosa*, l'imipénème est généralement associé à un aminoside. Le doripénème reste moins utilisé dans ce type d'infections, même s'il semble plus efficace que l'imipénème et sélectionne moins facilement des mutants résistants (Sakyo *et al.*, 2006). Enfin, chez les patients CF, le méropénème est la molécule de choix en cas d'exacerbation (Goulenok *et al.*, 2011).

## 2 RESISTANCE DE *P. AERUGINOSA* AUX CARBAPENEMES

La paroi de *P. aeruginosa* est très peu perméable aux antibiotiques (10 à 100 fois moins que celle de *Escherichia coli*) en raison de la porine majoritaire OprF, dont la conformation principale (> 95% des molécules) ne forme pas de pore dans la membrane externe (Sugawara *et al.*, 2006). Toutefois la perméabilité de la paroi n'est pas le seul facteur permettant d'expliquer la capacité de *P. aeruginosa* à développer une résistance aux carbapénèmes. Nous verrons dans les paragraphes suivants que la production de la  $\beta$ -lactamase AmpC et du système d'efflux MexAB-OprM a également un impact sur les CMI de ces antibiotiques (Tableau 3). Dans ce paragraphe, nous ne traiterons que les mécanismes intrinsèques pouvant être utilisés par *P. aeruginosa* et n'aborderons pas la problématique des  $\beta$ -lactamases transférables, dont la diffusion parmi les souches cliniques *via* leurs gènes est actuellement un réel enjeu de santé publique (pour plus de renseignements, se référer aux revues récentes : (Cornaglia *et al.*, 2011; Diene & Rolain, 2014)).

Tableau 3 : CMI des carbapénèmes chez PAO1 et ses dérivés d'après (Köhler *et al.*, 1999b; Riera *et al.*, 2011; Zamorano *et al.*, 2011).

Souche	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Imipénème	Méropénème	Doripénème
PAO1	1	0,5	0,25
PAO1 $\Delta$ oprD	>32	4	1,5
PAO1 AmpC <sup>++</sup>	2	1,5	1
PAO1 $\Delta$ bla <sub>ampC</sub>	0,5	0,25	ND
PAO1 ABM <sup>++</sup>	1	4	0,5
PAO1 $\Delta$ oprM	1	0,125	ND
PAO1 $\Delta$ oprD $\Delta$ mexR <sup>a</sup>	>32	>32	4
PAO1 $\Delta$ oprD $\Delta$ ampD <sup>b</sup>	>32	12	8
PAO1 $\Delta$ mexR <sup>a</sup> $\Delta$ ampD <sup>b</sup>	2	6	1,5

<sup>a</sup> La délétion de MexR conduit à la surexpression de *mexAB-oprM*. <sup>b</sup> La délétion de AmpD conduit à la surproduction de AmpC.

ND : non déterminé. ABM<sup>++</sup> : l'opéron *mexAB-OprM* est surexprimé.

## 2.1 RESISTANCE NATURELLE PAR LA $\beta$ -LACTAMASE AMPC

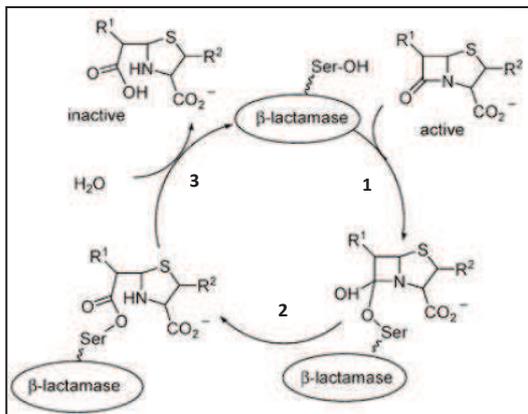


Figure 4 : Hydrolyse du cycle  $\beta$ -lactame par une  $\beta$ -lactamase (Touchet et al., 2011).

AmpC est une  $\beta$ -lactamase de classe C codée par le gène chromosomique *bla*<sub>AmpC</sub> (classification de (Ambler, 1980). Comme toutes les  $\beta$ -lactamases de cette classe, elle hydrolyse ses substrats en plusieurs étapes. Après une association non-covalente et réversible avec l'antibiotique, l'hydroxyle libre de la sérine catalytique attaque le cycle

$\beta$ -lactame du substrat en créant un ester acyle covalent. L'hydrolyse finale de l'ester libère l'enzyme et l'antibiotique rendu inactif par clivage de son cycle  $\beta$ -lactame (Figure 4) (Knott-Hunziker et al., 1982).

L'expression du gène *bla*<sub>AmpC</sub> est faible chez les souches sauvages car elle est contrôlée par un régulateur de la famille LysR, dénommé AmpR, qui agit comme un répresseur en conditions normales de culture. Elle peut toutefois être induite par certaines  $\beta$ -lactamines (céfoxitine, imipénème, ampicilline, acide clavulanique, etc...) car ces molécules interfèrent avec le processus de recyclage du peptidoglycane et permettent à des produits de dégradation de s'accumuler dans le cytoplasme (Zamorano et al., 2011). Les métabolites du peptidoglycane interagissent avec AmpR, le transformant ainsi en activateur transcriptionnel (Livermore, 1995). Toutefois, si la surproduction de AmpC augmente effectivement la CMI de l'imipénème et du mérépénème chez PAO1 (Tableau 3), cet effet résulte plus de la séquestration des carbapénèmes que de l'hydrolyse de leur noyau  $\beta$ -lactame (Zamorano et al., 2011). Chez la souche sauvage PAO1, l'inactivation du gène *bla*<sub>AmpC</sub> augmente la sensibilité aux carbapénèmes, montrant que l'enzyme contribue au niveau basal de résistance à cette famille d'antibiotiques (Masuda et al., 1999; Zamorano et al., 2011).

## 2.2 RESISTANCE ACQUISE PAR ALTERATION DES PLP

Alors que la modification des PLP est le principal mécanisme de résistance aux  $\beta$ -lactamines chez les *cocci* à Gram positif et dans une moindre mesure chez certains Gram négatifs tels que *Haemophilus spp.* et *Neisseria spp.*, ce phénomène semble beaucoup plus rare chez *P. aeruginosa* (Farra *et al.*, 2008; Moyá *et al.*, 2012). Une diminution de la transcription des gènes codant pour la PLP2 et la PLP3 a été observée chez 6 souches de sensibilité diminuée à l'imipénème et au méropénème isolées en Suède et en Norvège (Giske *et al.*, 2008). Depuis, d'autres travaux menés sur des couples isogéniques sensibles/résistants aux  $\beta$ -lactamines ont montré que, en dépit d'une expression génique et de séquences en acides aminés identiques, les PLP 2 et 3 des souches résistantes pouvaient avoir une affinité plus faible pour l'imipénème, suggérant l'existence de modifications post-transcriptionnelles encore non identifiées (Moyá *et al.*, 2012). L'analyse de deux souches cliniques isolées d'un même patient sous traitement par imipénème, l'une pré-thérapie sensible et, l'autre post-thérapie résistante a révélé un défaut de fixation de l'antibiotique marqué au  $^{14}\text{C}$  sur la PLP4 suggérant un défaut d'induction de l'expression de la  $\beta$ -lactamase AmpC (Bellido *et al.*, 1990).

## 2.3 ROLE DU SYSTEME D'EFFLUX ACTIF MEXAB-OPRM

### 2.3.1 Contribution de MexAB-OprM à la résistance naturelle

MexAB-OprM (codé par l'opéron *mexAB-oprM*) est un système d'efflux actif de la famille des transporteurs RND (*Resistance, nodulation, cell division*), dont la présentation sera détaillée dans les paragraphes suivants. Produit constitutivement par *P. aeruginosa*, il permet l'export de molécules substrats du périplasme vers le milieu extérieur (Poole *et al.*, 1993). Parmi ses substrats, on compte les antibiotiques de la famille des carbapénèmes, à l'exception de l'imipénème. En effet, la délétion ou

la surproduction de *oprM* ne modifie pas la CMI de l'imipénème chez PAO1 (Köhler *et al.*, 1999b), alors qu'elle modifie celle du méropénème (*Tableau 3*). Les propriétés physico-chimiques de l'imipénème et du méropénème sont sans doute à l'origine de leur interaction différentielle avec le système d'efflux MexAB-OprM (Köhler *et al.*, 1999b).

### 2.3.2 Contribution de MexAB-OprM à la résistance acquise

L'expression de l'opéron *mexAB-oprM* est contrôlée par un répresseur transcriptionnel de la famille MarR nommé MexR, codé par un gène situé en amont de l'opéron (*Figure 5*) (Poole *et al.*, 1996; Saito *et al.*, 1999; Srikumar *et al.*, 2000). Il se fixe sous forme d'un homodimère sur la région intergénique *mexR-mexA*, réprimant à la fois sa propre transcription et celle de l'opéron (Evans *et al.*, 2001). Son activité est elle-même modulée par le produit d'un gène, *armR*, dont l'expression est réprimée naturellement par un répresseur, NalC, de la famille TetR (*Figure 5*). Lorsqu'elle est produite, la protéine ArmR se fixe sur le dimère de MexR empêchant ainsi sa liaison à la région promotrice de *mexA* et permettant la transcription de l'opéron d'efflux (Cao *et al.*, 2004). Enfin, un troisième répresseur de la famille TetR, NalD, est impliqué dans la régulation de *mexAB-oprM*. Il se fixe en amont de *mexA* sur un promoteur différent de celui contrôlé par MexR (Morita *et al.*, 2006; Sobel *et al.*, 2005a). Finalement, à ce jour, 3 types de mutants surproducteurs de la pompe MexAB-OprM ont été décrits : (i) les mutants *nalB* dont le répresseur MexR est inactif, (ii) les mutants *nalC* surproduisant l'anti-répresseur ArmR suite à l'inactivation du gène *nalC* et (iii) les mutants *nalD* altérés dans le gène *nalD* (*Figure 5*) (Cao *et al.*, 2004; Köhler *et al.*, 1997a; Saito *et al.*, 1999; Srikumar *et al.*, 2000).

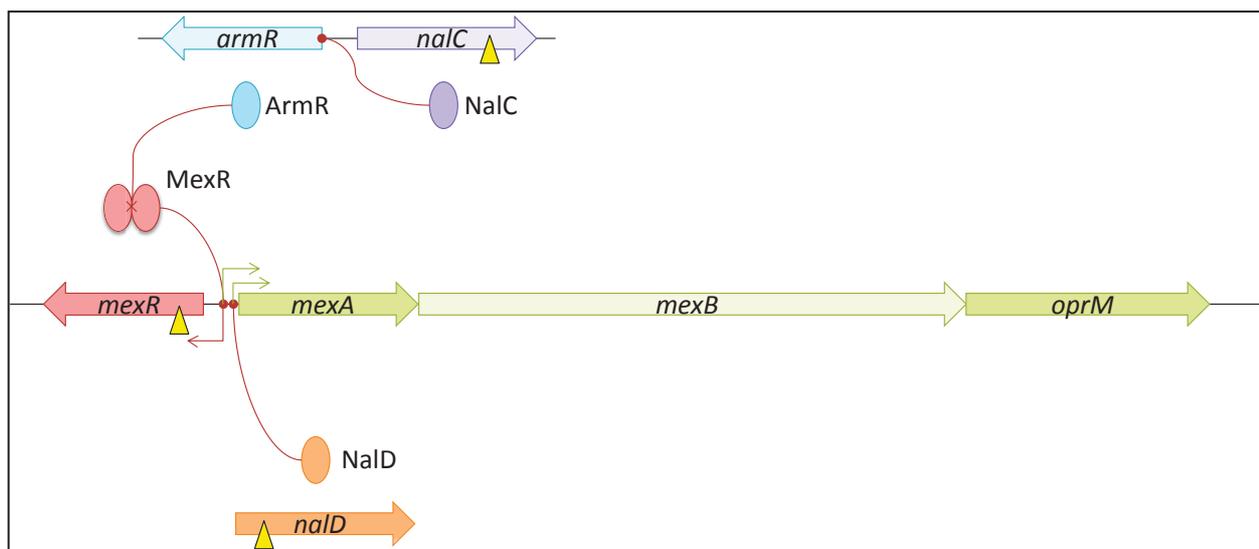


Figure 5 : La régulation de l'opéron *mexAB-oprM*. *MexR* sous forme d'homodimère réprime partiellement sa propre expression et celle de l'opéron *mexAB-oprM*. L'antirépresseur *ArmR*, dont l'expression est contrôlée par le répresseur *NalC*, empêche l'activité de *MexR*. Enfin, *NalD* réprime l'expression de *mexAB-oprM* en se fixant sur un promoteur différent de celui reconnu par *MexR*. Des mutations (triangles jaunes) dans les gènes *mexR*, *nalC* et *nalD* conduisent indépendamment à la surproduction de *MexAB-OprM*.

Dans les souches cliniques, la surexpression de *mexAB-oprM* a été plusieurs fois associée à une augmentation de la CMI du méropénème ou du doripénème. La prévalence de ces mutants surproducteurs est difficile à évaluer et varie de 32 à 70% selon les critères retenus pour la sélection des souches (Castanheira *et al.*, 2014a; Davies *et al.*, 2011; Giske *et al.*, 2008). Ainsi, un travail récent a montré que parmi une collection de 120 souches européennes et méditerranéennes sélectionnées en raison de leur résistance aux carbapénèmes, *mexAB-oprM* était surexprimé plus de 5 fois chez 32,5 % des souches, entraînant une augmentation de la CMI du méropénème de 0,25 à 1 µg/mL (Castanheira *et al.*, 2014a). Dans les cas où l'origine génétique de la surexpression de *mexAB-oprM* a été recherchée, il semble que les mutants de type *nalB* soient en moyenne 2 fois plus résistants aux substrats de la pompe que les mutants de type *nalC* ou *nalD* (Srikumar *et al.*, 2000). Plus particulièrement, la substitution V<sub>70</sub>E dans *MexR* engendre des niveaux de résistance au méropénème 2 à 4 fois supérieurs à ceux résultant de la perte de *OprD* seule (Pai *et al.*, 2001). L'impact des mutations *nalB*, *nalC* et *nalD* ne semble toutefois pas univoque et pourrait varier

en fonction du fond génétique des souches cliniques (Llanes *et al.*, 2004). Enfin, chez les souches CF, il a été montré que la surexpression de la pompe d'efflux pouvait être très importante en raison de mutations conjointes dans 2, voire même 3 des gènes régulateurs de MexAB-OprM (Tomás *et al.*, 2010).

## 2.4 RESISTANCE AUX CARBAPENEMES DUE A LA PORINE OPRD

L'altération qualitative ou quantitative de la porine OprD est la cause principale de la résistance de *P. aeruginosa* aux carbapénèmes (Castanheira *et al.*, 2014b; Pai *et al.*, 2001) (partie C. Résultats). Les phénomènes pouvant conduire à la disparition ou à la moindre production de OprD dans la membrane externe seront détaillés dans les paragraphes suivants.

## 2.5 EXPRESSION SIMULTANEE DE MECANISMES NON-ENZYMATIQUES DE RESISTANCE AUX CARBAPENEMES

Chez la souche de référence PAO1, l'expression simultanée de plusieurs mécanismes de résistance aux carbapénèmes a non seulement un effet additif sur les niveaux de résistance (imipénème > 32 µg/mL, méropénème > 32 µg/mL et doripénème 8 µg/mL), mais elle modifie également les rapports de CMI habituellement observés (chez PAO1 : CMI imipénème = 2x CMI méropénème = 2x CMI doripénème) (Tableau 3) (Ikonomidis *et al.*, 2008; Pai *et al.*, 2001). Conformément à ces observations, l'étude d'une collection de souches cliniques cumulant la surproduction de MexAB-OprM et la perte de OprD a montré que les CMI de l'imipénème et du méropénème pouvaient atteindre des valeurs supérieures à 32 µg/mL (Riera *et al.*, 2011) ; dans ce cas, la CMI du méropénème peut alors égaler celle de l'imipénème (Castanheira *et al.*, 2014b; Hammami *et al.*, 2009; Riera *et al.*, 2011). Toutefois, la co-existence de ces deux mécanismes de résistance semble peu fréquente (de 5 à 15%) parmi les souches cliniques lorsque celles-ci sont sélectionnées en raison de leur non-sensibilité à un

carbapénème au moins (CMI de l'imipénème de 0,5 à 16 µg/mL et du méropénème de 0,25 à 16 µg/mL) (Castanheira *et al.*, 2014b; Pai *et al.*, 2001; Riera *et al.*, 2011). A l'inverse, parmi les souches cliniques hautement résistantes aux carbapénèmes (CMI de l'imipénème et du méropénème > 16 µg/mL) et dépourvues de métallo-β-lactamase, ces deux mécanismes sont fréquemment associés (Hammami *et al.*, 2009), en particulier chez les souches CF où près de 50% des isolats combinent la perte de la porine avec la surexpression de *mexAB-oprM* (Tomás *et al.*, 2010).

### 3 CONTRIBUTION DE LA PORINE OPRD A LA RESISTANCE ACQUISE AUX CARBAPENEMES

#### 3.1 LA PORINE OPRD

Anciennement nommée D2, la porine OprD est une protéine de 45,9 kDa constituant la principale voie de passage des carbapénèmes à travers la membrane externe de *P. aeruginosa*. La délétion du gène *oprD* codant pour cette protéine entraîne une augmentation des CMI de l'imipénème et du méropénème de 4 et 16 fois respectivement par rapport à la souche parentale (*Tableau 3*) (Köhler *et al.*, 1999b). La croissance en milieu minimum de souches ayant un gène *oprD* inactivé ou surexprimant ce gène a montré que OprD est une porine à diffusion lente et saturable, spécialisée dans le transport d'acides aminés basiques (comme la lysine et l'arginine) et du gluconate (Huang & Hancock, 1993; Ochs *et al.*, 1999b; Trias & Nikaido, 1990a; Trias & Nikaido, 1990b). De plus, l'ajout de L-lysine jusqu'à 100 mM dans le milieu de culture, augmente de 2 à 8 fois la CMI de l'imipénème, indiquant une compétition entre les deux molécules pour les sites d'interaction de la porine et par conséquent une réduction de leur entrée au sein de la bactérie (Fukuoka *et al.*, 1991; Huang & Hancock, 1993).

### 3.1.1 Adressage de la porine à la membrane externe

La porine OprD est synthétisée par le ribosome dans le cytoplasme bactérien sous la forme d'une pré-protéine. Comme toutes les protéines de membrane externe, elle est ensuite guidée successivement par deux systèmes protéiques qui lui permettent d'atteindre la membrane externe : (i) le translocon Sec lui fait traverser la membrane interne, puis (ii) le complexe protéique Bam lui permet de se replier et de s'insérer dans la membrane externe (Solov'eva *et al.*, 2012). Son adressage est possible grâce à une séquence signal composée (de l'extrémité N-ter vers le cœur de la séquence) : (i) d'un domaine chargé positivement, (ii) un domaine hydrophobe de 10 à 15 acides aminés et (iii) un domaine polaire qui contient le site de reconnaissance d'une peptidase périplasmique spécifique permettant son clivage (Solov'eva *et al.*, 2012).

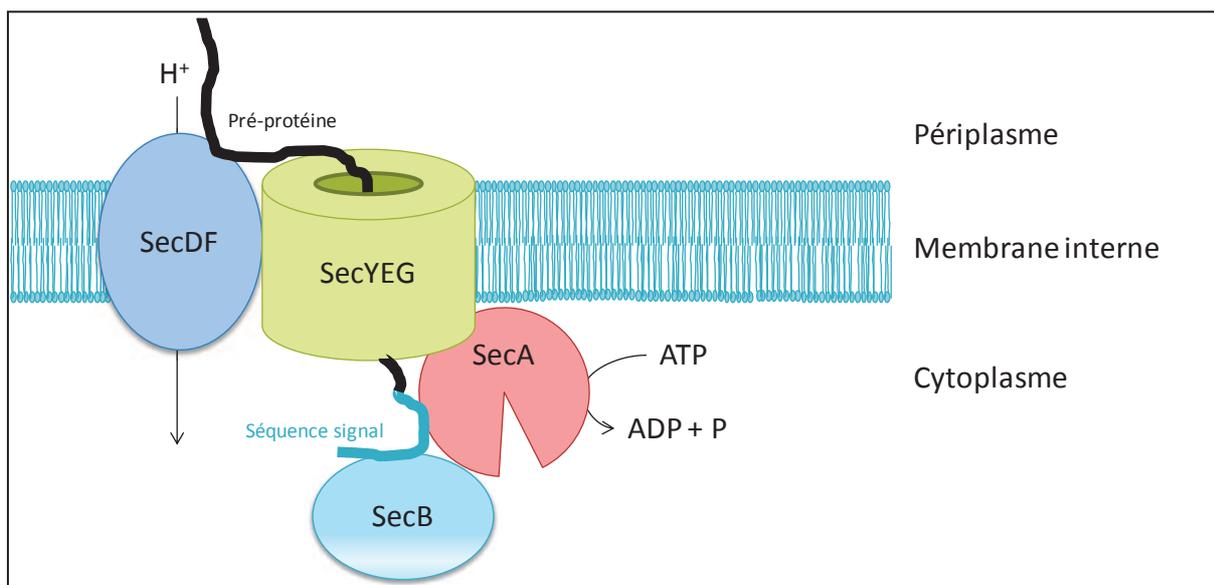
#### **1. Passage à travers la membrane interne : le translocon Sec**

Pour passer la membrane interne, les protéines de membrane externe doivent être non-repliées. Elles sont conduites depuis le cytoplasme par la protéine chaperonne, SecB (*Figure 6*). Cette dernière est active sous la forme d'un homotétramère de 69 kDa ; SecB se fixe sur un site spécifique de la protéine à adresser à condition qu'elle soit dépliée, ce site étant masqué par les repliements de la protéine. En plus de son rôle de chaperonne, SecB possède également un rôle dans l'orientation du peptide, permettant sa reconnaissance par le composant catalytique du translocon, l'ATPase SecA. Une fois la pré-protéine liée à SecB, SecA interagit avec SecB et prend en charge à son tour la pré-protéine, probablement en se liant à sa séquence signal.

SecA est active sous la forme d'homodimère et peut être localisée alternativement dans le cytosol ou dans la membrane interne. En effet, en présence d'ATP, SecA s'insère dans la membrane interne, et « pousse » la pré-protéine à travers le pore formé par le complexe protéique SecYEG (20-25 Å pour sa partie la plus large et 5-8

À pour sa partie la plus resserrée). Il a été montré que l'activité ATPase de SecA fournissait l'énergie nécessaire au passage du peptide par segments d'environ 30 acides aminés (Deitermann *et al.*, 2005) à travers la membrane interne *via* SecYEG (Solov'eva *et al.*, 2012). L'hydrolyse de l'ATP relargue SecA dans le cytosol. Une nouvelle sous-unité de SecA peut alors se fixer à la pré-protéine. Ainsi, la pré-protéine est transloquée à travers SecYEG par répétition de l'hydrolyse d'ATP par SecA (Economou & Wickner, 1994).

Pour sortir du translocon SecYEG, la pré-protéine est finalement prise en charge par le complexe protéique SecDF enchâssé dans la membrane interne, et qui semble « tirer » le peptide vers le périplasma en utilisant l'énergie proton motrice (*Figure 6*).



*Figure 6 : Le passage de la pré-protéine à travers la membrane interne via le translocon Sec. Le peptide à adresser est pris en charge par SecB qui le transfère à l'ATPase SecA. L'hydrolyse de l'ATP par SecA permet le passage du peptide à travers le pore SecYEG. La sortie du peptide dans le périplasma est réalisée par les chaperonnes SecDF, grâce à la force proton motrice.*

## **2. Passage à travers le périplasma**

Lorsque la pré-protéine est expulsée dans le périplasma, elle a perdu sa séquence signal et va être transportée par trois protéines chaperonnes (Skp, DegP et SurA) vers la membrane externe (*Figure 7*) (Leyton *et al.*, 2012).

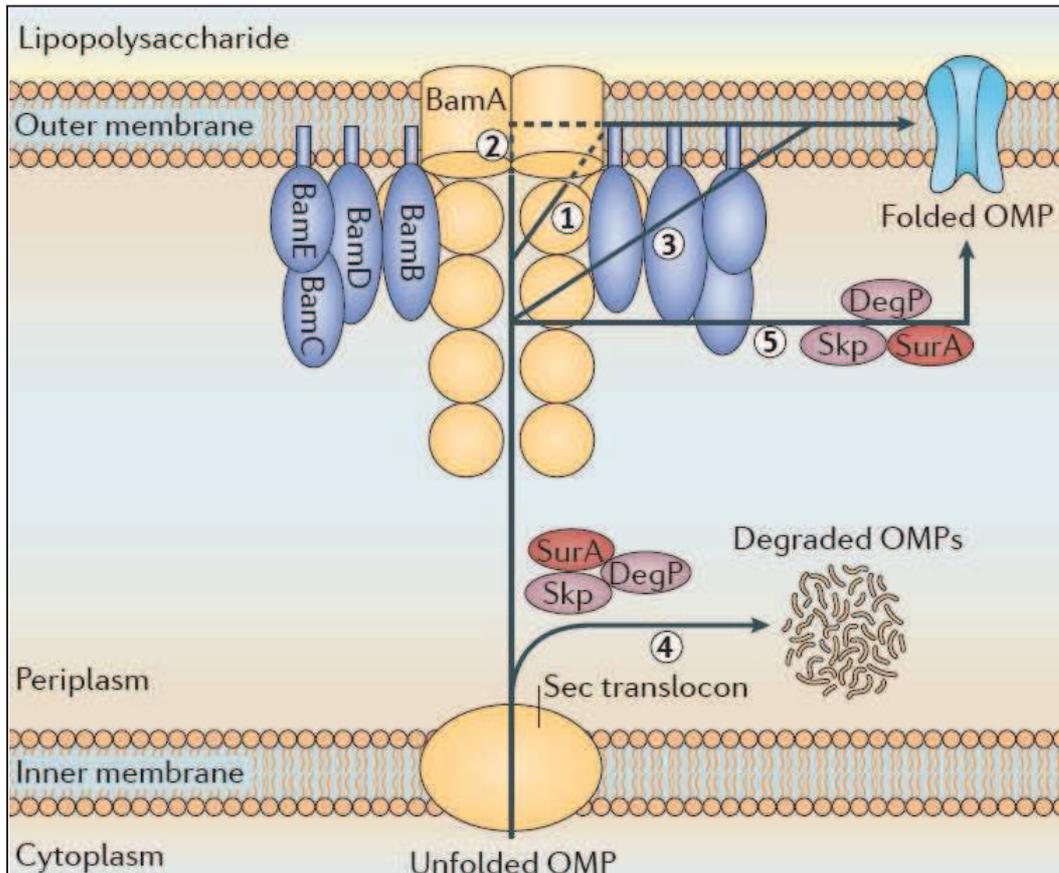


Figure 7 : Le passage de la pré-protéine à travers le périplasm et son insertion dans la membrane externe. Après avoir traversé la membrane interne via le translocon Sec, la pré-protéine est prise en charge par 3 chaperonnes : Skp, DegP et SurA. Si la pré-protéine est mal repliée, elle sera dégradée par la protéase DegP (4). Afin de s'insérer dans la membrane externe la pré-protéine est prise en charge par le complexe protéique Bam. Les modalités de son insertion sont mal connues mais elles pourraient faire intervenir les chaperonne Skp, DegP et SurA (5), les protéines BamB/C/D (3), les domaines POTRA de BamA (1) ou encore la protéine BamA directement (2) (Leyton et al., 2012).

La protéine Skp, active sous forme d'homodimère, se lie spécifiquement aux protéines non-repliées qui sont encore en contact avec le translocon Sec. Elle possède un rôle dans le maintien de ces pré-protéines sous forme non-repliée et pourrait faciliter leur relargage de la machinerie Sec. La protéine chaperonne SurA interagit avec les mêmes domaines que Skp et pourrait, après interaction avec BamA, délivrer les pré-protéines au complexe Bam, responsable de leur insertion dans la membrane externe. Chez *Escherichia coli*, les deux protéines Skp et SurA sont également impliquées dans les premières étapes de repliement et dans la formation des tonneaux

(feuillet  $\beta$ ), caractéristiques des protéines de membrane externe (Lazar *et al.*, 1998; Sklar *et al.*, 2007).

Paradoxalement, la protéase périplasmique DegP est la seule à assurer en plus de son rôle de chaperonne, celui d'une protéase (*Figure 7*). Ainsi, elle contrôle la qualité des protéines à destination de la membrane externe et dégrade celles qui sont agrégées ou mal repliées (Ge *et al.*, 2014).

### **3. Insertion dans la membrane externe : le système Bam**

L'insertion de la pré-protéine dans la membrane externe est facilitée par un complexe multi-protéique de 5 partenaires : la protéine intégrale BamA et 4 lipoprotéines périphériques BamB, BamC, BamD et BamE (*Figure 7*). La protéine BamA est composée d'une extrémité C-terminale formant un tonneau  $\beta$  dans la membrane externe et d'une extrémité N-terminale périplasmique formée de 5 domaines répétés, nommés domaines POTRA (*P*OLypeptide *T*Ranslocation *A*ssociated) (Knowles *et al.*, 2009). BamA est essentielle au repliement final des pré-protéines car chez un mutant  $\Delta bamA$  on constate l'accumulation d'aggrégats peptidiques non-repliés au sein du périplasme (Solov'eva *et al.*, 2012). Il semblerait que la protéine correctement repliée liée aux chaperonnes de l'espace périplasmique interagisse tout d'abord avec le domaine périplasmique POTRA 1 de BamA (*Figure 7*). Par contre, les étapes finales de l'insertion des protéines au sein de la membrane externe, de même que le rôle exact des autres protéines du complexe sont mal connus. Puisque la plupart des protéines de membrane externe telles que OprD agissent sous la forme de trimères, se pose également la question de la formation de ces complexes (Ricci & Silhavy, 2012).

### 3.1.2 Présentation générale de la structure de OprD

La porine OprD est une protéine de 443 acides aminés composée de 18 feuillets  $\beta$  enchâssés dans la membrane externe, reliés par 9 boucles extracellulaires et 8 périplasmiques (Figure 8A et Figure 9B). L'existence de deux feuillets (S5 et S6) plus courts (Figure 8A et Figure 9B) correspondant à un domaine possible de trimérisation suggère que la porine est fonctionnelle sous forme de trimère (Biswas *et al.*, 2007). Cette structure est stabilisée dans la membrane externe grâce à des liaisons hydrogène et des interactions électrostatiques entre les phospholipides membranaires et certains acides aminés des feuillets  $\beta$  (S<sub>168</sub>, K<sub>167</sub>, Y<sub>415</sub>, H<sub>421</sub> et E<sub>159</sub>) et de la boucle L2 (K<sub>79</sub>). Les interactions des feuillets  $\beta$  S5 à S8 avec la membrane externe induisent une dépression, rendant la membrane moins épaisse au site de localisation de la porine (Parkin & Khalid, 2014).

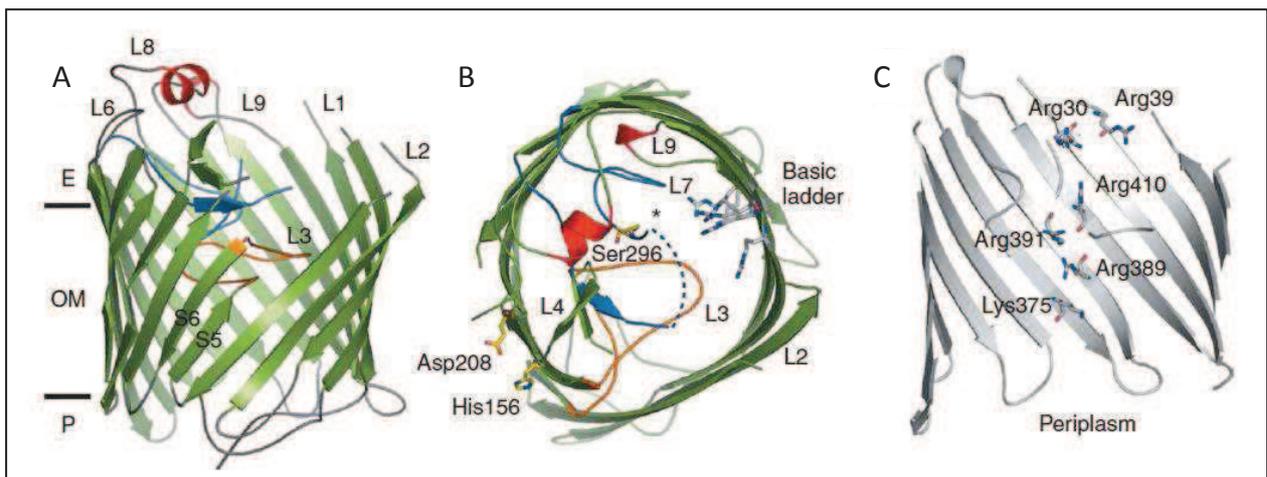


Figure 8 : Représentation tridimensionnelle de la porine OprD. (A) Vue latérale, (B), vue depuis l'espace extracellulaire et (C) vue du rail d'acides aminés chargés positivement (Biswas *et al.*, 2007).

L'intérieur du pore est principalement chargé négativement, à l'exception de 5 résidus arginine et d'une lysine (Figure 9B). Ces résidus forment un rail chargé positivement guidant les substrats à travers le pore à la manière d'une voie électrophorétique (Biswas *et al.*, 2007).

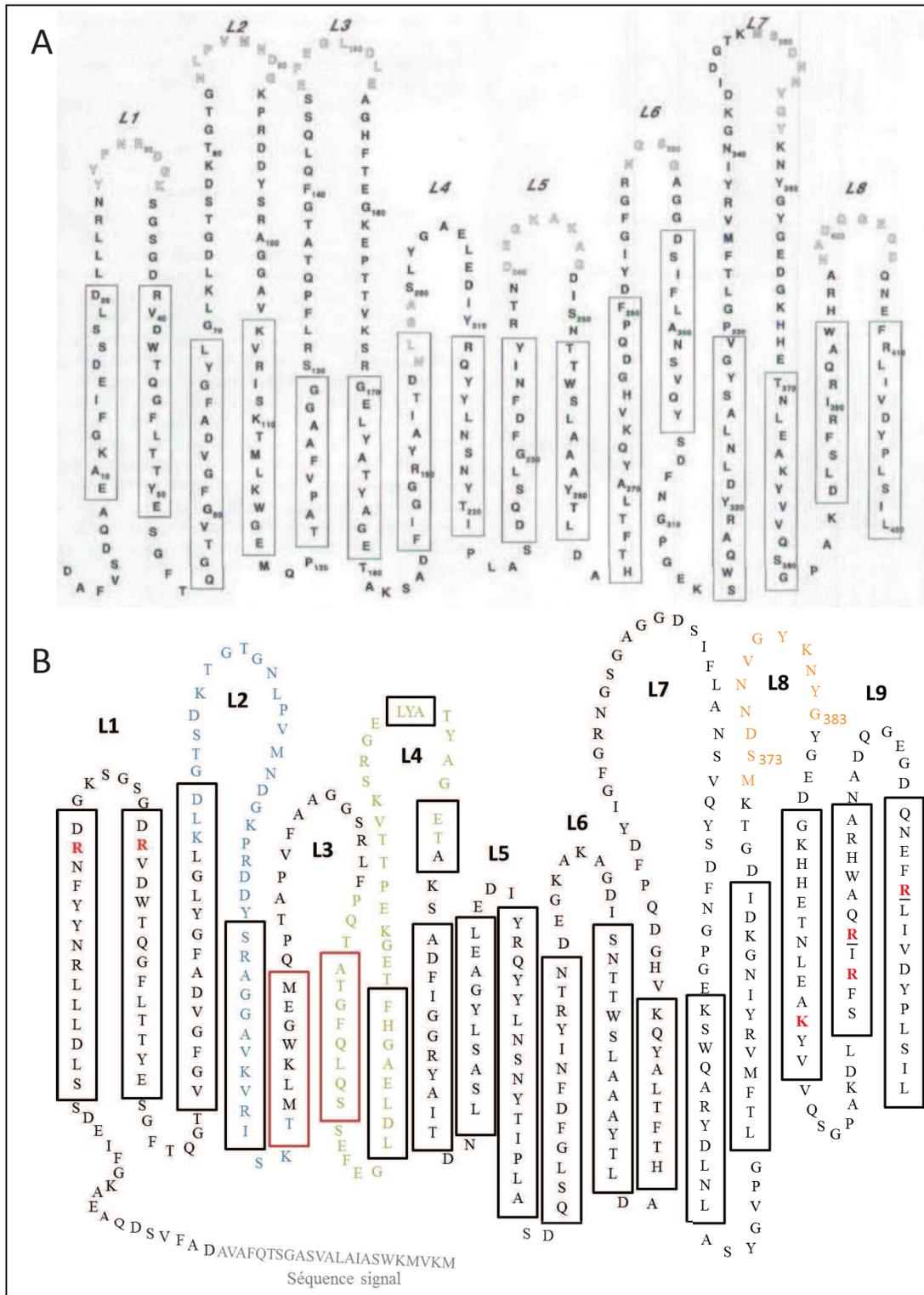
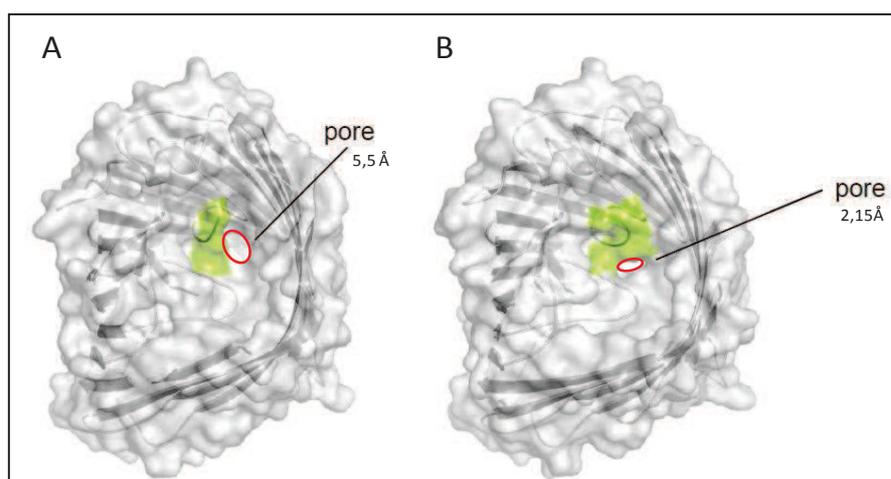


Figure 9 : Représentation 2D de la structure de la porine OprD présumée (Huang et al., 1995) (A) et cristallisée (Biswas et al., 2007) (B). (A) Les feuillettes  $\beta$  sont encadrés. Les acides aminés en gris sur les boucles L5, L7 et L8, sont impliqués dans la constriction du pore. (B) La séquence signal est indiquée en gris. Les acides aminés en rouge représentent le rail électrophorétique suivi par les substrats à travers le pore. Les acides aminés en bleu et en vert représentent respectivement les boucles 2 et 3 telles qu'elles avaient été localisées sur la structure présumée de la porine, avant cristallisation. Les acides aminés en orange sont différents dans le motif LESB58. Les feuillettes encadrés en rouge (S5 et S6) représentent le site putatif de trimérisation.

### 3.1.3 Constriction du pore

Avant que la structure cristalline de la porine OprD ne soit résolue (Biswas *et al.*, 2007), des études antérieures ont essayé de déterminer les domaines impliqués dans la constriction du pore et le passage des substrats à partir d'une prédiction bioinformatique (Epp *et al.*, 2001; Huang & Hancock, 1996; Ochs *et al.*, 2000) (*Figure 9B*). Nous parlerons donc, dans cette partie, de boucles présumées lorsque nous citerons les travaux réalisés avant 2007. Ces boucles sont celles figurant sur la structure prédite par l'équipe de Hancock, présentée en *Figure 9A* (Huang & Hancock, 1996). La *Figure 9B* représente quant à elle, la structure de la porine déterminée par cristallographie (Biswas *et al.*, 2007).

Les premières analyses structurales de la porine OprD impliquaient les boucles présumées L5, L7 et L8 dans la constriction du pore (*Figure 9A*). En effet, la délétion de chacune de ces boucles ne modifiait pas la CMI des carbapénèmes mais sensibilisait la souche à d'autres antibiotiques (cefpirome, cefotaxime, aztréonam, ciprofloxacine, chloramphénicol et tétracycline) (Huang & Hancock, 1996). Depuis, il est apparu que l'intérieur du pore est en réalité fermé par 2 boucles (L3 et L7) formant une constriction circulaire d'environ 5,5 Å (*Figure 10A*) (Biswas *et al.*, 2007).



*Figure 10 : Comparaison de la taille du pore au sein de la porine OprD d'après les modèles cristallins des équipes de Biswas (A) et de Eren (B) (Eren et al., 2012). Les cercles rouges délimitent les contours de la constriction du pore.*

Très récemment, une nouvelle cristallisation de la porine, à plus haute définition, a démontré que l'insertion des acides aminés 287 à 294 de la L7 à l'intérieur du tonneau forme une constriction plus petite (2,15 Å) que celle initialement prévue (*Figure 10*) (Eren *et al.*, 2012). La conductance de la porine sous cette conformation est faible ( $21 \pm 3$  pS), probablement en raison de l'insertion de la boucle L3 à l'intérieur du tonneau. Cependant, la structure de la porine étant flexible, le pore peut s'ouvrir et atteindre des pics de conductance de  $889 \pm 102$  pS (Liu *et al.*, 2012). Certaines souches, plus sensibles au méropénème que PAO1, montrent dans la boucle 7 présumée un motif particulier caractérisé par : la délétion de 2 acides aminés (S<sub>373</sub> et G<sub>383</sub>) et la modification des 12 acides aminés contigus (motif LESB58 : de M<sub>372</sub> à G<sub>383</sub> *Figure 9*). Des tests de compétition avec la L-lysine ont montré le rôle de ce motif dans la constriction du pore, permettant à de grosses molécules comme le méropénème de pénétrer plus facilement dans la bactérie (Epp *et al.*, 2001). Depuis la résolution de la structure cristalline de OprD, ce motif protéique qui s'avère localisé dans la boucle périplasmique 8, a été retrouvé chez de nombreuses souches de référence (*Figure 11*).

### 3.1.4 Passage des substrats au travers de la porine

Des études antérieures à la cristallisation de la porine ont montré que les boucles L2 et L3 présumées semblent être toutes deux impliquées dans la liaison et le passage des substrats puisque la délétion de ces boucles augmente de 8 fois les CMI de l'imipénème et du méropénème, sans altérer l'insertion de la porine dans la membrane externe (*Figure 9A*) (Huang *et al.*, 1995; Ochs *et al.*, 2000). La boucle L2 intervient dans le passage du gluconate car sans elle, la souche est incapable de croître en milieu minimum renfermant du gluconate comme seule source de carbone (Huang & Hancock, 1996). Cette boucle est en réalité très flexible, et ses mouvements bloquent l'accès à l'entrée du pore (Parkin & Khalid, 2014).

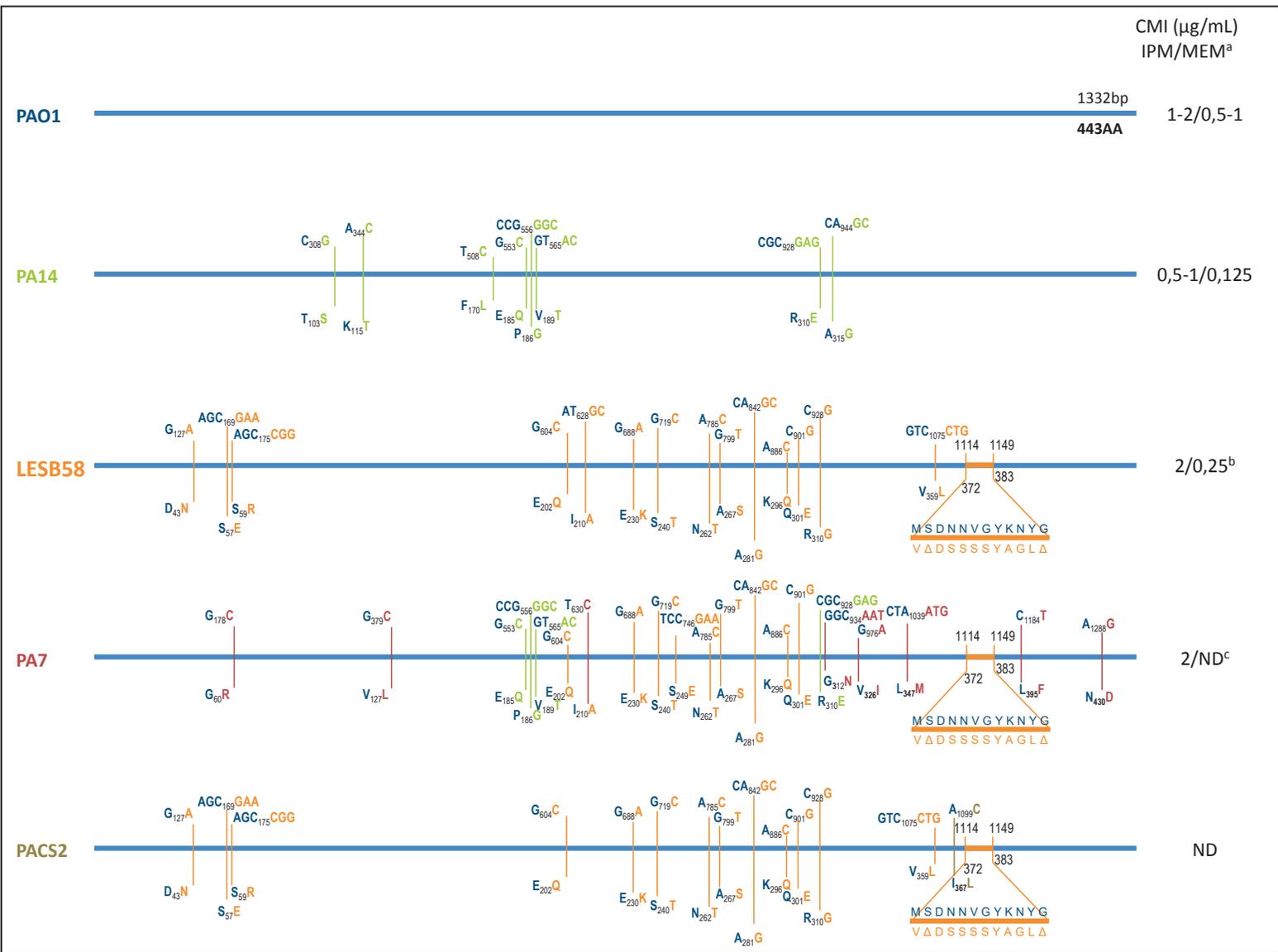
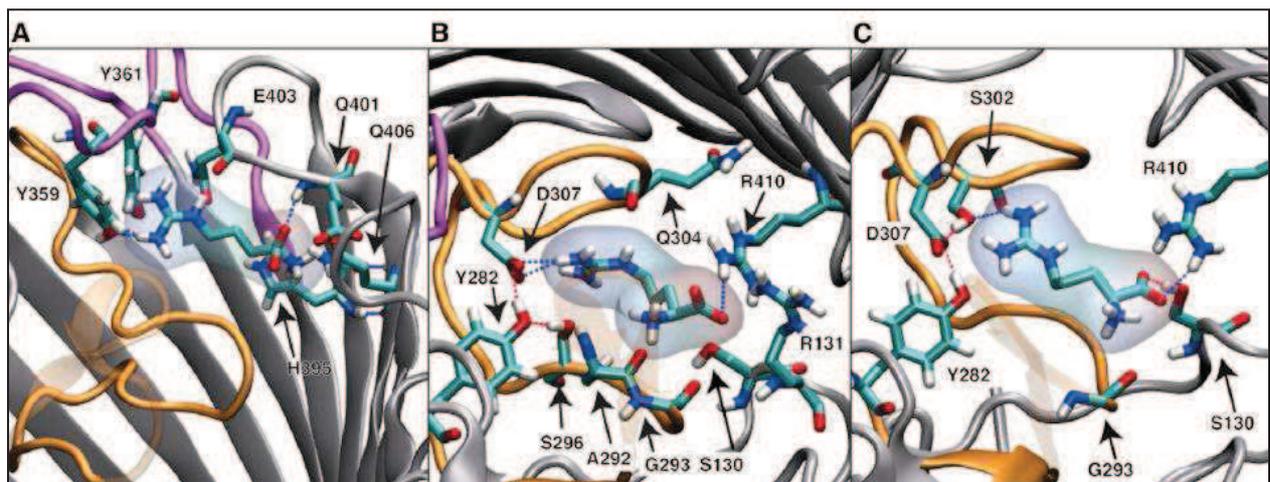


Figure 11 : Polymorphisme de OpfD. La barre bleue représente la forme WT du gène opfD chez PAO1. Les substitutions non silencieuses en vert, orange, rouge et marron sont respectivement retrouvées chez PA14, LESB58, PA7 et PACS2 ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)). Les CMI de l'imipénème et du méropénème sont indiquées pour chaque souche lorsqu'elles sont connues. <sup>a</sup> Selon les études, les CMI de l'imipénème et du méropénème peuvent varier d'une dilution (Alvarez-Ortega et al., 2010; Epp et al., 2001; Llanes et al., 2011; Morita et al., 2015; Nicastro et al., 2014). <sup>b</sup> Le motif protéique LESB58 (en orange) a été identifié chez une souche clinique PA7-like comme responsable d'une plus grande sensibilité au méropénème qu'à l'imipénème (CMI IPM/MEM de 8/1 µg/mL) (Epp et al., 2001).

Le passage des substrats à travers le pore a été récemment étudié avec l'arginine (Parkin & Khalid, 2014). Il se déroule en 3 étapes. Dans un premier temps, l'arginine se présente à l'interface des boucles L7, L8 et L9 (*Figure 12A*). Puis, son squelette carboné entre en interaction avec l'arginine 410 (R<sub>410</sub>) du rail électrophorétique et sa chaîne latérale interagit avec l'acide aspartique 307 (D<sub>307</sub>) et la lysine 282 (Y<sub>282</sub>) (*Figure 12B*). Pour pouvoir passer à travers le pore, l'arginine doit ensuite changer d'orientation. Sa chaîne latérale s'associe alors avec la sérine 302 (S<sub>302</sub>) et son squelette carboné avec la sérine 130 (S<sub>130</sub>) (*Figure 12C*). Cette étape fait office de point de contrôle. Si le substrat ne s'oriente pas de la bonne manière, il sera éjecté vers le milieu extérieur. Enfin, le passage à travers le pore s'effectue par interactions successives avec les acides aminés du rail électrophorétique (Parkin & Khalid, 2014).



*Figure 12 : Passage de l'arginine à travers la porine OprD. (A) Liaison de l'arginine à l'interface des boucles L7 (orange), L8 (rose) et L9 (gris). (B) Pour pouvoir entrer dans le pore, le squelette carboné du substrat se lie à l'arginine 410 (R<sub>410</sub>) et sa chaîne latérale se lie à l'acide aspartique 307 (D<sub>307</sub>). (C) Le substrat change d'orientation afin de pouvoir passer à travers le pore : son squelette carboné se lie à la sérine 302 (S<sub>302</sub>) et sa chaîne latérale à la sérine 130 (S<sub>130</sub>) (Parkin & Khalid, 2014).*

### 3.2 MECANISMES DE RESISTANCE LIES A LA PORINE OPRD

Dans les souches cliniques, la résistance aux carbapénèmes est le plus généralement associée à la perte de la porine OprD. L'analyse des protéines de membrane externe

de 159 souches de sensibilité diminuée à l'imipénème et au méropénème (CMI médianes de 8 et 4 µg/mL respectivement) a montré que la porine n'était pas ou peu visible sur les membranes de *Western blott* dans plus de 80 % des cas (Castanheira *et al.*, 2014a; Pai *et al.*, 2001). Ce constat est plus discutable pour des souches résistantes au doripénème (CMI > 2 µg/mL) puisque sur une collection de 452 isolats, seules 10% produisaient moins de porine dans la membrane externe (Davies *et al.*, 2011).

L'absence de porine peut être le résultat d'une répression du gène *oprD* (Giske *et al.*, 2008; Ikonomidis *et al.*, 2008; Quale *et al.*, 2006; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009) ou de son inactivation (Giske *et al.*, 2008; Riera *et al.*, 2011; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009). Ces deux événements ne sont d'ailleurs pas exclusifs : de faibles niveaux de transcription du gène *oprD* ont été mesurés chez des souches cliniques dont la porine était inactivée (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009) (partie C. Résultats).

### 3.2.1 Altération de la structure 3D de OprD

L'absence de porine dans la membrane externe résulte le plus souvent de la production d'un peptide aberrant, causé par : (i) l'insertion ou la délétion (*indel*) de nucléotides, (ii) des mutations qui entraînent l'apparition d'un codon stop prématuré (mutation faux-sens) ou (iii) l'insertion d'une séquence d'insertion (IS) (*Tableau 4*) (Fang *et al.*, 2014; Ocampo-Sosa *et al.*, 2012; Rojo-Bezares *et al.*, 2014; Sanbongi *et al.*, 2009; Tsai *et al.*, 2014; Wolter *et al.*, 2004a).

**Tableau 4 : Evénements génétiques à l'origine de la perte de la porine OprD dans la membrane externe de souches cliniques.**

Critères de sélection des souches de l'étude (nombre de souches)	Nombre de souches présentant des altérations dans la porine OprD <sup>a</sup>						Référence
	ID	IS	Stop	ND	$\Delta_{ATG}$	AA	
IPM > 4 $\mu$ g/mL (56)	39	4	7	6	0	0	(Fang <i>et al.</i> , 2014)
Résistance CBM et FQ (7)	0	5	2	0	0	0	(Wolter <i>et al.</i> , 2004a)
Résistance CBM (87)	73	2	0	0	12	0	(Rojo-Bezares <i>et al.</i> , 2014)
Absence de M $\beta$ L <sup>b</sup> (99)	13	6	0	0	0	80	(Sanbongi <i>et al.</i> , 2009)

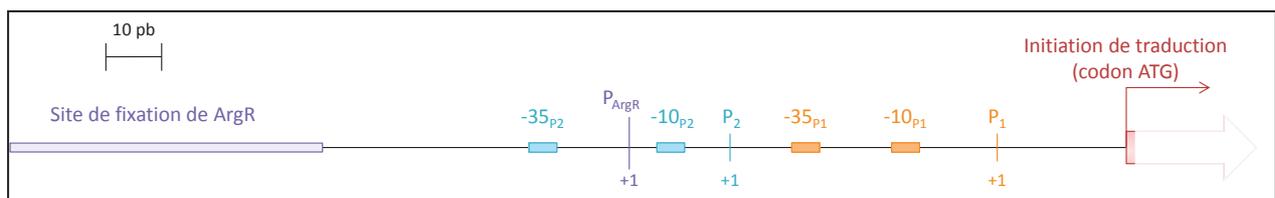
<sup>a</sup>ID : indel, IS : séquence d'insertion, Stop : mutation entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré, ND : inconnu,  $\Delta_{ATG}$  : inactivation du codon ATG et AA : substitutions d'acides aminés. <sup>b</sup>Les souches ont été collectées de 34 hôpitaux japonais entre 1998 et 2001 sans critère de résistance. Seules les souches non-clonales ont été conservées. IPM : imipénème, CBM : carbapénèmes, FQ : fluoroquinolones, M $\beta$ L : métallo- $\beta$ -lactamase.

En analysant la séquence peptidique de la porine OprD chez 99 isolats cliniques, une étude a montré que les substitutions d'acides aminés étaient fréquentes (dans 80/93 isolats) par rapport à la séquence de PAO1 (Sanbongi *et al.*, 2009). Parmi ces substitutions, l'une d'entre elles (G<sub>314</sub>D) avait été détectée dans une souche sélectionnée *in vitro* pour sa résistance aux carbapénèmes et semblait significative (Sanbongi *et al.*, 2009). La substitution par un aspartate pourrait modifier l'acidité de la boucle L6 et altérer la conformation de la porine. Même si les autres substitutions n'ont pas été étudiées, la majorité d'entre elles semble n'avoir aucun impact sur la résistance puisqu'elles ont été retrouvées dans des souches sensibles aux carbapénèmes (Ocampo-Sosa *et al.*, 2012). Parmi les souches de référence, on trouve également de nombreuses substitutions d'acides aminés par rapport à la séquence de PAO1 (Figure 11) : c'est le cas de PA14 et de LESB58, plus sensibles au méropénème que PAO1 (Figure 11) (Alvarez-Ortega *et al.*, 2010). Chez la souche PA7, la porine présente un profil protéique hybride entre celui de PA14 et de LESB58 (Figure 11), suggérant des événements de recombinaison génétique au sein du gène *oprD*. Cette souche est d'ailleurs deux fois plus résistante à l'imipénème que PAO1 (Morita *et al.*,

2015). Le polymorphisme observé chez les souches de référence a été confirmé sur un échantillon plus large de 328 souches CF, non-CF ou environnementales, et pour lesquelles 20,7 % des nucléotides du gène *oprD* apparaissent comme variables, la plupart conduisant à des modifications des boucles périplasmiques (Pirnay *et al.*, 2009).

### 3.2.2 Le gène *oprD* : une régulation complexe

La sous-expression du gène *oprD* est un mécanisme fréquent de résistance aux carbapénèmes (Fang *et al.*, 2014; Wolter *et al.*, 2004a) (partie C. Résultats). L'expression de ce gène est le résultat d'une régulation complexe liée à des sites d'initiation de la transcription qui peuvent varier selon des conditions de culture (Figure 13) (Lister *et al.*, 2009).



**Figure 13** : La région promotrice du gène *oprD*. Les régions en bleu et en orange sont les promoteurs principaux du gène *oprD* (Lister *et al.*, 2009). La transcription de *oprD* s'initie indifféremment à l'un ou à l'autre de ces deux promoteurs si les conditions de culture sont identiques. En violet sont indiqués les éléments promoteurs dépendant de ArgR.

L'amplification de la région 5'-UTR des ADNc obtenus à partir des transcrits *oprD* a permis de mettre en évidence deux sites d'initiation de transcription en amont de ce gène. Ces deux sites sont une thymine (P<sub>1</sub>) et une adénine (P<sub>2</sub>), localisées respectivement 23 et 71 nucléotides en amont du codon ATG, et délimitant des régions promotrices -10 et -35 bien distinctes (Figure 13) (Lister *et al.*, 2009). Un troisième site d'initiation (P<sub>ArgR</sub>) dépendant du régulateur ArgR (Figure 13) est également utilisé en réponse à la présence d'acides aminés basiques tels que l'arginine dans le milieu de culture (Ochs *et al.*, 1999a).

L'expression du gène *oprD* est activée par la présence d'acides aminés basiques dans le milieu intracellulaire et inhibée par le salicylate ou selon un processus de co-régulation inverse avec différents systèmes d'efflux actif (Figure 14) (Lister *et al.*, 2009). Dans ce dernier cas de figure, la bactérie réduit sa perméabilité membranaire pour favoriser l'efflux de substrats nocifs dans le cadre d'une réponse physiologique coordonnée.

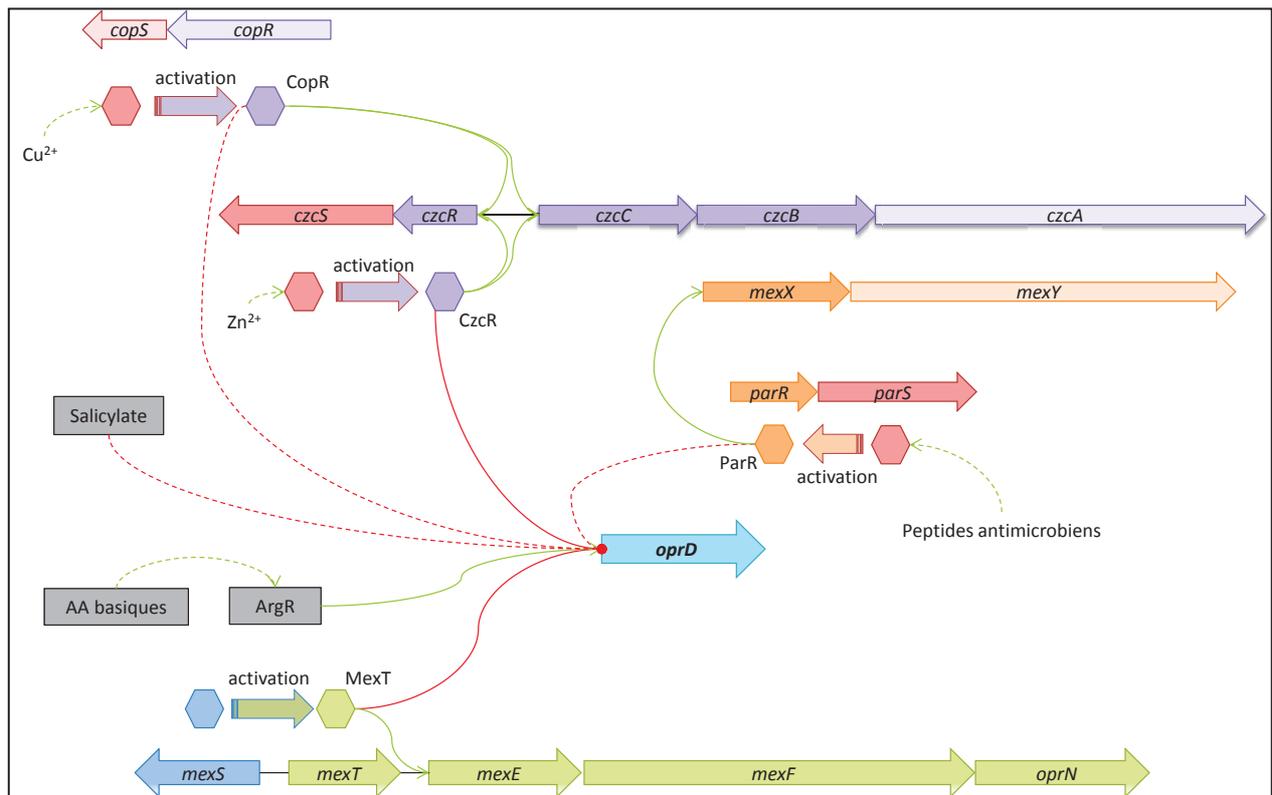


Figure 14 : La régulation complexe du gène *oprD*. La présence d'acides aminés (AA) basiques dans le milieu de culture active la transcription de *oprD* via l'activateur transcriptionnel ArgR. A l'inverse, le gène *oprD* est régulé négativement par la présence de salicylate dans le milieu de culture et par les régulateurs des systèmes d'efflux CzcCBA, MexXY-OprM et MexEF-OprN. Les flèches pleines et en pointillés indiquent respectivement les régulations directes et indirectes.

## **1. Induction par ArgR**

ArgR est un activateur transcriptionnel de la famille AraC/XylS (Park *et al.*, 1997). Il régule la voie catabolique majeure de l'arginine, la voie arginine succinyltransférase. Les gènes codant pour cette voie métabolique sont activés par la présence d'arginine dans le milieu de culture mais le mécanisme par lequel cet acide aminé active ArgR est mal connu (Park *et al.*, 1997).

En recherchant la porine OprD dans la membrane externe d'une souche de PAO1, il a été montré, par *Western blotting*, que sa production augmente lorsque la souche est cultivée en présence d'arginine, d'histidine, d'alanine ou de glutamate. Par ailleurs, des expériences de retard sur gel et de DNase I *footprinting* ont révélé que ArgR possède un site de fixation (TGTCGC-N<sub>8</sub>-AA-N<sub>5</sub>) en amont de *oprD*, rendant le régulateur directement responsable de la surexpression du gène (*Figure 13*). Enfin, la délétion du gène *argR* ne permet plus l'induction de *oprD* par la présence d'arginine dans le milieu de culture (Ochs *et al.*, 1999a).

## **2. Régulation par le salicylate**

La présence de salicylate dans le milieu de culture de la souche PAO1 augmente 16 fois la CMI de l'imipénème suite à la diminution de la quantité de porine OprD présente dans la membrane externe. Ce phénomène n'est plus observable lorsque les souches sont ensuite remises en culture dans du milieu MH, suggérant que la bactérie répond spécifiquement à la présence de composés organiques dans le milieu (Sumita & Fukasawa, 1993). Une fusion *oprD::xylE* a montré que ce phénomène résultait d'une régulation transcriptionnelle du gène *oprD*, bien que le mécanisme de cette régulation reste inconnu (Ochs *et al.*, 1999b).

### 3. La co-régulation avec les systèmes d'efflux RND

#### ➤ MexXY/OprM

Le système d'efflux MexXY/OprM est codé par l'opéron *mexXY* et par le gène *oprM* appartenant à l'opéron *mexAB-oprM*. L'expression de *mexXY* est contrôlée par un répresseur transcriptionnel de la famille TetR, MexZ (Li *et al.*, 2015). Des mutations inactivant *mexZ* conduisent à la surexpression de *mexXY* chez des mutants appelée AgrZ (*Aminoglycoside-resistant mutants dependent on mexZ*) (Li *et al.*, 2015). Récemment, deux nouveaux types de mutants surproducteurs cette pompe ont été décrits : les mutants de type AgrW1 sont altérés dans la synthèse protéique par mutation dans l'ADN ribosomal alors que les mutants de type AgrW2 sont altérés dans un système à deux composants (TCS, *Two Component System*), nommé ParRS (*Peptide-adaptive resistance Regulator and Sensor*) (Figure 15) (Guénard *et al.*, 2014; Muller *et al.*, 2011). ParRS (PA1799-PA1798) est un TCS constitué de deux protéines : ParS, un senseur histidine-kinase inséré dans la membrane cytoplasmique et ParR, un régulateur de réponse cytoplasmique (Fernández *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2011). Ce système participe à la résistance adaptative à plusieurs classes d'antibiotiques lorsque les bactéries sont cultivées en présence de peptides antimicrobiens tels que la colistine ou la polymyxine B (Muller *et al.*, 2011). Sous l'action de ces molécules, la protéine ParS s'autophosphoryle puis transfère son groupement phosphate à ParR (Figure 15). ParR, ainsi activé, régule notamment l'expression de l'opéron *arnBCADTEF-ugd*, impliqué dans la modification du lipopolysaccharide, et celle de l'opéron *mexXY*. L'activation de ParS sous l'influence de la colistine, l'indolicidine et la polymyxine B est accompagnée d'une diminution des taux de transcrits *oprD* de 2 à 6 fois en comparaison à PAO1. Cet effet n'est plus observé lorsque l'opéron *parRS* est délété, suggérant que ParR régule le gène *oprD*. De même, l'activation de ParS ou de ParR par des mutations gain de fonction diminue l'expression du gène *oprD* (de 7 fois), se traduisant par une augmentation de la CMI des carbapénèmes (de 8 fois)

(Muller *et al.*, 2011). Le site de fixation de ParR sur l'ADN n'étant pas connu, on ignore si la régulation de ParR sur *oprD* est directe ou indirecte.

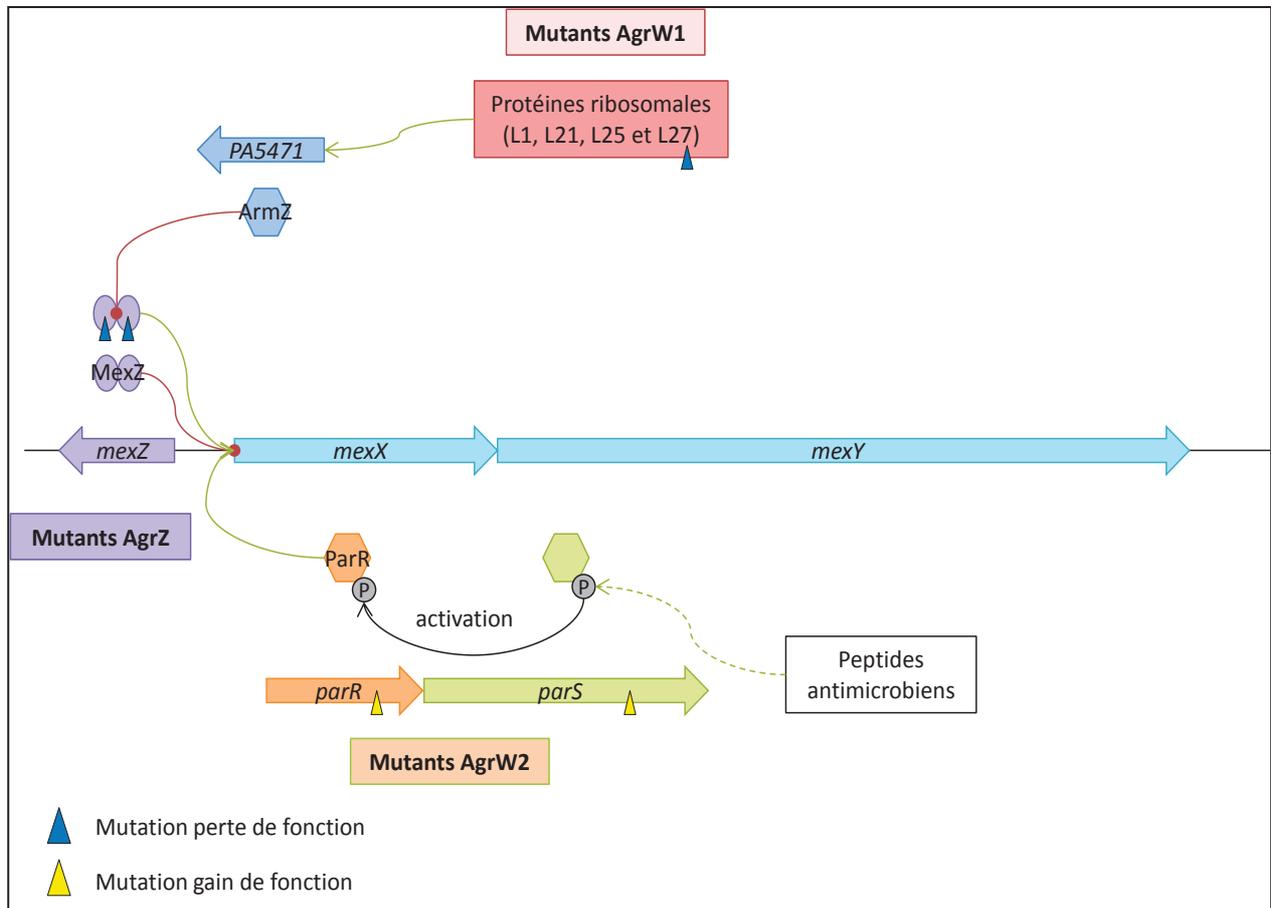


Figure 15 : Les voies de surproduction du système d'efflux MexXY. L'inactivation de MexZ bloque la répression de l'opéron mexXY chez les mutants de type AgrZ. Chez les mutants AgrW1, une altération de la synthèse protéique inactive indirectement le dimère de MexZ par séquestration via la protéine ArmZ codée par le gène PA5471. Chez les mutants AgrW2, des substitutions dans ParR ou ParS, conduisent à une activation de ce système à deux composants (TCS), même en absence de molécule signal (telle que les peptides antimicrobiens).

#### ➤ CzcCBA

Le système d'efflux CzcCBA permet à *P. aeruginosa* de tolérer les métaux lourds tels que le cobalt, le zinc et le cadmium (czc) (Perron *et al.*, 2004). Son expression est contrôlée par deux TCS : CzcRS et CopRS (Figure 16) (Caille *et al.*, 2007; Perron *et al.*, 2004).

La présence de 3  $\mu\text{M}$  de chlorure de zinc dans le milieu de culture de PAO1 induit la surexpression de *czcRS* et des gènes codant pour CzcCBA (Perron *et al.*, 2004). La surexpression de *czcCBA* a été corrélée à une augmentation de la résistance à l'imipénème suggérant la répression conjointe du gène *oprD* (Caille *et al.*, 2007; Perron *et al.*, 2004). En effet, récemment, une immunoprécipitation de chromatine (ChIP) a révélé que CzcR était capable de se fixer sur la région promotrice de *oprD*, réprimant la transcription de ce gène (Dieppois *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'analyse de la séquence de CzcRS chez des souches résistantes à la fois au zinc et à l'imipénème a mis en évidence deux substitutions dans CzcS (V<sub>194</sub>L et G<sub>197</sub>D) entraînant son activation constitutive même en l'absence de molécule inductrice (Figure 16) (Perron *et al.*, 2004).

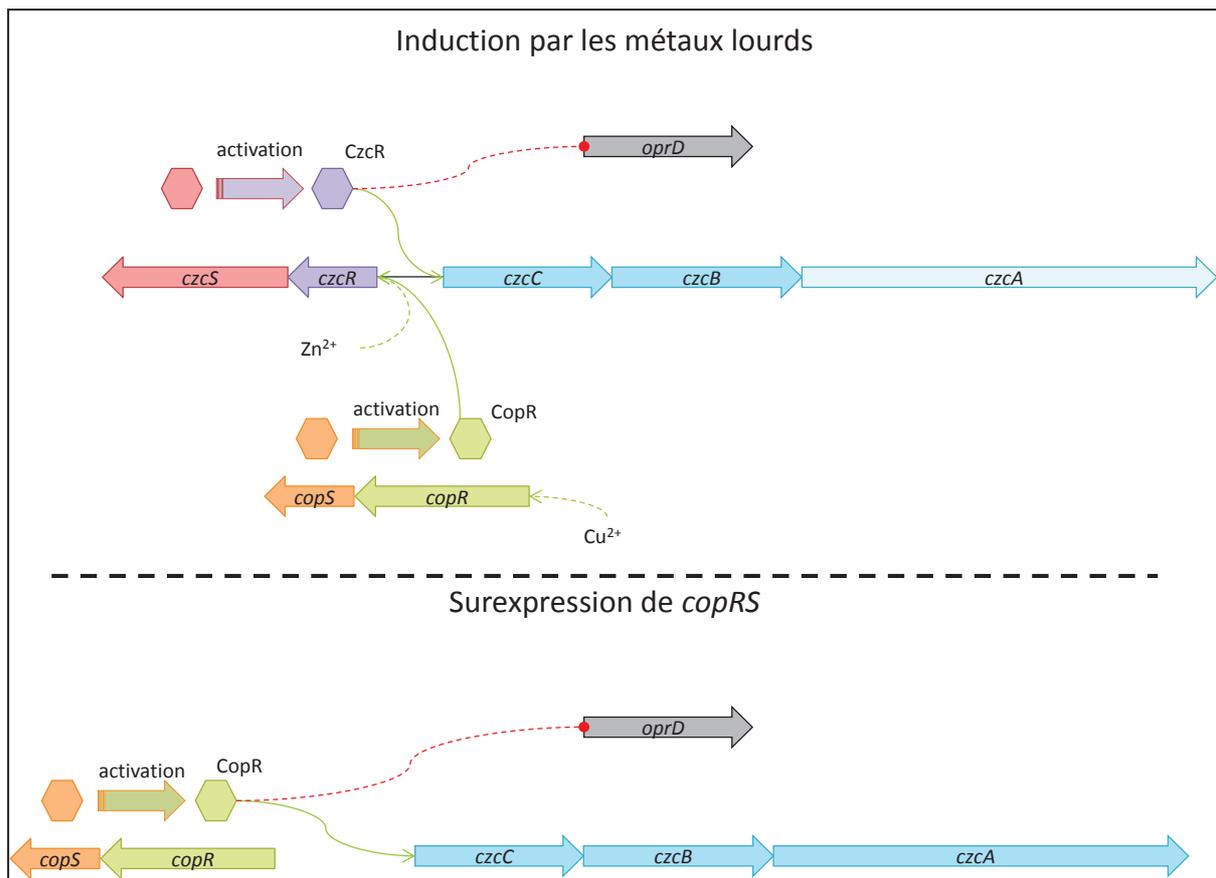


Figure 16 : La régulation conjointe de l'opéron *czcCBA* et du gène *oprD* par les systèmes *CzcRS* et *CopRS*. En présence de cuivre ou de zinc, l'activation de *czcCBA* et la répression de *oprD* se font via *CzcR*. En revanche, la surexpression artificielle de *copRS* conduit à une régulation *CzcRS*-indépendante.

La présence de cuivre dans le milieu de culture engendre également la surexpression de *czcCBA* bien que ce métal ne soit pas un substrat de la pompe. Cette induction implique cette fois-ci le TCS CopRS. Dans ce cas, le régulateur de réponse CopR se lie à une *cop box* située dans la région intergénique *czcR-czcC*, ce qui permet la transcription de *czcCBA* de manière CzcRS-dépendante. L'induction par CopR réprime simultanément *oprD* de manière CzcRS-dépendante puisque la délétion des gènes codant pour ce TCS restaure la sensibilité à l'imipénème (Figure 16).

En revanche la surproduction de CopR dans une complémentation plasmidique sans induction par le cuivre, conduit à la surexpression de *czcCBA* de manière CzcRS-indépendante (Caille *et al.*, 2007). La surexpression de CopR en absence de sa molécule inductrice, même lorsque *czcRS* est délété, est suffisante pour engendrer une résistance à l'imipénème (Figure 16) (Caille *et al.*, 2007).

#### ➤ MexEF-OprN

La surexpression de MexEF-OprN, qui sera détaillée dans les pages suivantes, a été également associée à une résistance aux carbapénèmes, bien que ces molécules ne fassent pas partie des substrats de la pompe. Dans ce cas, la surexpression de l'opéron d'efflux *mexEF-oprN*, sous la dépendance de l'activateur transcriptionnel MexT, est co-régulée avec la répression de *oprD*. C'est donc MexT qui affecte la quantité de porine dans la membrane externe et ce, à un niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (Köhler *et al.*, 1999a; Ochs *et al.*, 1999b).

## 4 LES SYSTEMES D'EFFLUX CHEZ *P. AERUGINOSA*

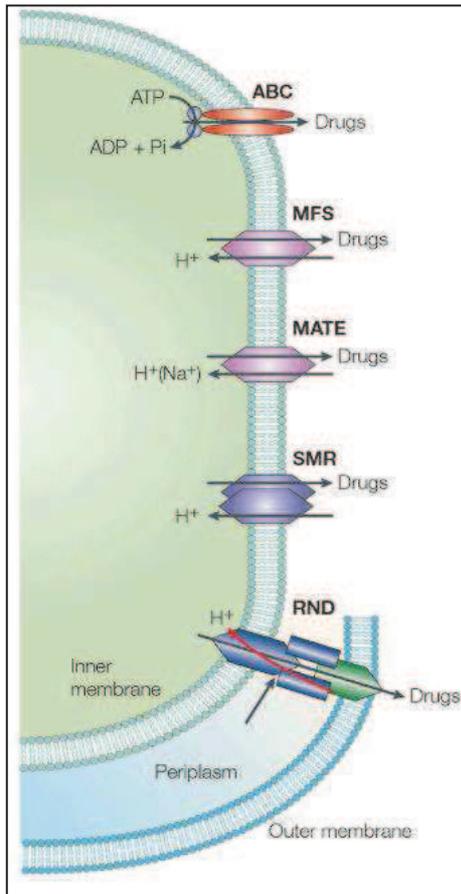


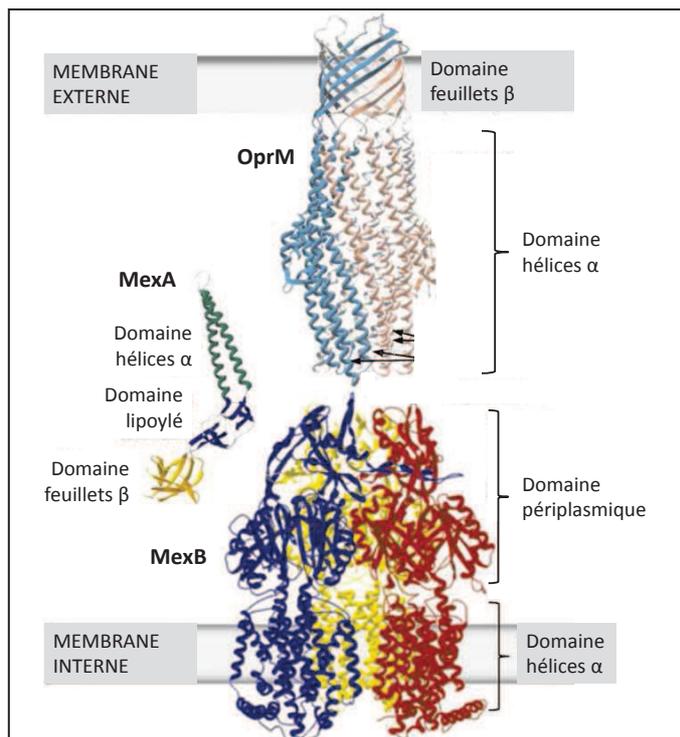
Figure 17 : Les systèmes d'efflux chez *P. aeruginosa* (Krulwich et al., 2005).

Le génome de *P. aeruginosa* contient de nombreux gènes et opérons codant pour des systèmes d'efflux actif dont certains contribuent à la résistance naturelle de la bactérie à de nombreux composés. Ces systèmes sont classés en 6 grandes familles : MFS (*M*ajor *F*acilitator *S*uperfamily), ABC (*A*TP-*B*inding *C*assette), SMR (*S*mall *M*ultidrug *R*esistance), MATE (*M*ultidrug *A*nd *T*oxic compound *E*xtrusion), RND (*R*esistance-*N*odulation-*D*ivision) (Figure 17) et PCE (*P*roteobacterial *C*hlorhexidine *E*fflux) (Hassan et al., 2013). Les transporteurs ABC trouvent l'énergie nécessaire à l'extrusion des molécules substrat dans l'hydrolyse de molécules d'ATP ; les autres familles sont des transporteurs secondaires fonctionnant comme des antiports grâce à l'énergie fournie par un

gradient de protons (ou de sodium pour les transporteurs de la famille MATE). Chez *P. aeruginosa* les transporteurs RND sont les plus significativement impliqués dans la résistance aux antibiotiques (Poole, 2004).

### 4.1 STRUCTURE DES SYSTEMES D'EFFLUX RND

Les pompes d'efflux de la famille RND sont des systèmes complexes traversant les deux membranes bactériennes. Ils se composent d'un transporteur enchâssé dans la membrane interne, d'une protéine adaptatrice périplasmique et d'une protéine de membrane externe qui permet la sortie des substrats (Nikaido, 2011).



**Figure 18 : Structure du système d'efflux MexAB-OprM (adapté de (Misra & Bavro, 2009)). MexB : transporteur, MexA : protéine adaptatrice, OprM : protéine de membrane externe.**

Le pore de membrane externe résulte de l'assemblage d'homotrimères composés chacun (i) d'un domaine formant un tonneau de 12 feuillets  $\beta$ , enchâssé dans la membrane externe et (ii) d'un domaine de 12 hélices  $\alpha$  localisé au sein du périplasma (Figure 18) (Misra & Bavro, 2009).

Le transporteur est formé par l'assemblage de 3 monomères identiques, composés d'un domaine hélices  $\alpha$  enchâssé dans la membrane interne et d'un large

domaine périplasmique (Figure 18) (Misra & Bavro, 2009).

Enfin, le monomère de la protéine adaptatrice est une lipoprotéine ancrée dans la membrane interne (Higgins *et al.*, 2004) composée (i) d'un domaine de 6 feuillets  $\beta$ , (ii) un domaine d'hélices  $\alpha$  formant une structure en épingle à cheveux et (iii) un domaine central lipoylé, lui-même composé de 4 feuillets  $\beta$  séparés par un domaine  $\alpha$  (Figure 18). S'il est clairement admis que la protéine de membrane externe et la pompe fonctionnent sous la forme d'homotrimères, le niveau d'oligomérisation de la protéine adaptatrice reste controversé. En effet, bien que les modèles proposés respectent une symétrie d'ordre 3, les différentes structures cristallographiques semblent montrer que l'on pourrait assembler jusqu'à 9 (Higgins *et al.*, 2004) voire 12 (Akama *et al.*, 2004b) molécules de protéine adaptatrice autour du complexe transporteur-protéine de membrane externe.

## 4.2 ASSEMBLAGE DES SYSTÈMES D'EFFLUX RND

De nombreux travaux ont été publiés sur le mode d'assemblage des systèmes d'efflux. Différentes approches telles que l'isolation du complexe protéique (Husain *et al.*, 2004; Mokhonov *et al.*, 2004; Nehme *et al.*, 2004; Touzé *et al.*, 2004; Zgurskaya & Nikaido, 2000), l'analyse de pompes chimériques (Elkins & Nikaido, 2003; Stegmeier *et al.*, 2006; Vedyappan *et al.*, 2006), la modélisation moléculaire (Fernandez-Recio *et al.*, 2004), la mutagenèse dirigée (Lobedanz *et al.*, 2007) ou encore les études biophysiques (Touzé *et al.*, 2004) ont permis de mieux comprendre comment les 3 oligomères forment une structure fonctionnelle et stable dans les deux membranes de *P. aeruginosa*. Toutefois, les sites d'interaction entre les différents partenaires sont encore mal connus (Misra & Bavro, 2009).

L'interaction entre la protéine de fusion et le pore de la membrane externe pourrait se faire par simple contact des extrémités périplasmiques, chacune formant une roue crantée s'emboîtant parfaitement pour former le système bipartite. Le domaine hélices  $\alpha$  de la protéine de fusion semble indispensable pour l'interaction avec le pore (Nehme *et al.*, 2004).

La liaison avec le transporteur semble, quant à elle, impliquer toute la protéine de fusion puisque des substitutions dans les différents domaines de cette protéine engendrent à chaque fois une perte de la liaison avec le transporteur (Nehme & Poole, 2005). Par exemple, MexA stabilise le complexe MexB-OprM et interviendrait dans l'ouverture du pore *via* des interactions avec l'extrémité de OprM (Ntsogo Enguéné *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2012).

Pour finir, l'interaction porine-transporteur est peu documentée. Même si la proximité de ces deux protéines sous-entend une interaction, cette liaison ne semble pas se maintenir sans la protéine de fusion (Misra & Bavro, 2009).

L'assemblage chimérique des 3 éléments de la pompe dans des mutants de *P. aeruginosa* a montré que le transporteur semble être à l'origine de la spécificité de la pompe (Gotoh *et al.*, 1998b; Maseda *et al.*, 2000b; Srikumar *et al.*, 1997; Yoneyama *et al.*, 1998). En effet, MexB ne peut être remplacé ni par MexD, ni par MexF pour donner un système d'efflux fonctionnel. En revanche, la délétion de la porine OprN puis l'insertion de OprM à sa place restaure la fonctionnalité de la pompe MexEF-OprN (Maseda *et al.*, 2000b). Les mêmes observations sont faites lorsque OprM remplace OprJ dans la pompe MexCD-OprJ (Gotoh *et al.*, 1998a). A l'inverse, ni OprJ, ni OprN ne peuvent rétablir la fonctionnalité de MexAB délété de OprM (Monlezun et Broutin, Thèse de doctorat, 2012).

#### 4.3 PRISE EN CHARGE DES SUBSTRATS PAR LA POMPE

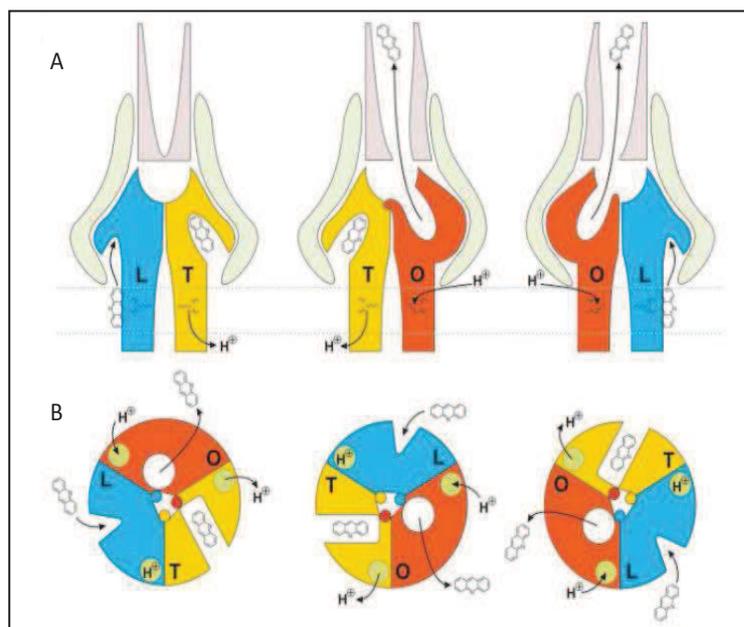


Figure 19 : Représentation schématique du mouvement péristaltique d'une pompe d'efflux de type RND grâce à l'énergie proton-motrice (Seeger *et al.*, 2006). (A) Vue latérale. Les conformations relâchée (L), resserrée (T) et ouverte (O) sont représentées respectivement en bleu, jaune et rouge. Sur le schéma, seuls 2 des 3 monomères sont représentés. (B) Vue transversale. Les sillons latéraux présents au niveau des monomères L et T indiquent les sites de liaison au substrat. Les différentes formes géométriques représentent une faible (triangle), une forte (rectangle) ou aucune (cercle) affinité pour le substrat transporté.

Les trois protéines composant le système d'efflux forment un long canal à travers la paroi bactérienne, qui permet l'export de différents substrats lipophiles ou amphiphiles du périplasme vers le milieu extérieur (Lister *et al.*, 2009).

La cristallisation de la protéine AcrB, homologue de MexB chez *E. coli*, a mis en évidence 3 structures différentes de chaque protomère de AcrB (Figure 19), ce qui permet de

mieux comprendre le mécanisme péristaltique d'extrusion des substrats (Seeger *et al.*, 2006).

Dans une première conformation, une poche de liaison ouverte du côté périplasmique permet de prendre en charge les substrats. Dans cette conformation, le pore permettant la sortie des substrats est fermé (mode « T »). L'extrusion de ces substrats est possible lorsque cette conformation s'inverse (mode « O », avec un pore ouvert et une poche périplasmique fermée). Enfin, une troisième conformation avec le pore fermé et la poche périplasmique resserrée correspondrait à une conformation « au repos » (mode « L »), en attente d'un prochain substrat (Seeger *et al.*, 2006).

#### 4.4 LES MOLECULES PRISES EN CHARGE PAR LES SYSTEMES RND

Les systèmes d'efflux de la famille RND sont des pompes polyspécifiques, capables de transporter des substrats de nature chimique très variée (antibiotiques, biocides, acides gras, sels biliaires, composés aromatiques, détergents, colorants, molécules auto-inductrices...), permettant ainsi à la cellule de maintenir l'homéostasie cellulaire et de s'adapter à des environnements différents (Fernández & Hancock, 2012). Parmi les 12 systèmes d'efflux de type RND, seuls quelques-uns contribuent à la résistance naturelle ou acquise aux antibiotiques (*Tableau 5*).

MexAB-OprM et MexXY/OprM, dont l'expression est constitutive pour l'un et inductible pour l'autre sont les seuls à participer de façon significative à la résistance naturelle aux agents anti-infectieux. A l'inverse, le très faible niveau d'expression de *mexEF-oprN* et de *mexCD-oprJ* rend la production de ces pompes indétectable dans les souches sauvages. Seule la forte surexpression de ces opérons (>100 fois par rapport à PAO1) conduit à une production significative de la pompe et une résistance aux antibiotiques substrats (*Tableau 5*) (Fukuda *et al.*, 1995; Köhler *et al.*, 1997b).

Tableau 5: Les substrats pris en charge par les différents systèmes RND de *P. aeruginosa* (Lister et al., 2009)

Système d'efflux de type RND	Substrats	
	Antibiotiques	Autres composés
MexAB-OprM	FQ, BL, MC, TET, CHL, NOV, TMP	Biocides, détergents, colorants, HSL, hydrocarbures aromatiques
MexXY/OprM	FQ, BL, AG, MC, TET, CHL	-
MexCD-OprJ	FQ, BL, MC, TET, CHL, TMP	Biocides, détergents, colorants, hydrocarbures aromatiques
MexEF-OprN	FQ, CHL, TMP	Biocides, HSL
MexJK/OprM	TET, ERY	Biocides
MexGHI-OpmD	FQ, TET	Vanadium
MexVW/OprM	FQ, TET, CHL, ERY	-
MexPQ-OpmE	FQ, MC, TET, CHL	-
MexMN/OprM	CHL, THP	-
MuxABC-OpmB	ATM, ERY, NOV	-
CzcCBA	-	Cuivre, zinc, cobalt
TriABC-OpmH	-	Triclosan

FQ : fluoroquinolones, BL :  $\beta$ -lactamines, MC : macrolides, AG : aminosides, TET : tétracycline, CHL : chloramphénicol, NOV : novobiocine, TMP : triméthoprime, ERY : érythromycine, THP : thiamphénicol, HSL : homosérine lactones.

## 5 LE SYSTEME D'EFFLUX MEXEF-OPRN

Le système d'efflux actif MexEF-OprN a été décrit chez *P. aeruginosa* pour la première fois en 1997 par Köhler et coll. (Köhler et al., 1997b). L'analyse comparative des génomes a depuis permis d'identifier des orthologues chez d'autres espèces de *Pseudomonas* ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)) : *P. putida*, *P. denitrificans*, *P. entomophila*, *P. syringae*, *P. fluorescens*, très peu d'entre eux faisant l'objet d'études approfondies hormis *P. syringae* (Kawakita et al., 2012) et *P. putida* (Herrera et al., 2010; Roca et al., 2008).

Comme tous les systèmes d'efflux de la famille RND, MexEF-OprN se compose d'un transporteur ancré dans la membrane cytoplasmique (MexF), d'une protéine adaptatrice périplasmique (MexE) et d'une protéine de membrane externe (OprN). Il

s'agit d'un antiporteur substrat-proton tirant son énergie du gradient électrochimique (Lister *et al.*, 2009). Même si le complexe protéique reste à cristalliser, son assemblage ainsi que son fonctionnement peuvent être déduits au moins en partie de ceux de la pompe MexAB-OprM compte tenu des identités de séquences en acides aminés existant entre les deux systèmes (28,9% entre MexE et MexA ; 41,3% entre MexF et MexB ; 28,2% entre OprN et OprM) (Akama *et al.*, 2004a; Akama *et al.*, 2004b; Sennhauser *et al.*, 2009). Ce système, faiblement exprimé chez les souches sauvages cultivées dans des conditions standards de laboratoire est fortement surproduit chez les mutants appelées *nfxC* (Köhler *et al.*, 1997b).

## 5.1 LES MOLECULES PRISES EN CHARGE PAR MEXEF-OPRN

La caractérisation de mutants *nfxC* a permis d'identifier les antibiotiques susceptibles d'être transportés par la pompe MexEF-OprN. Il s'agit des fluoroquinolones, du chloramphénicol et du triméthoprime (Köhler *et al.*, 1997b). Toutefois, la production de MexEF-OprN n'étant pas induite par ces molécules, il semble peu probable que ces dernières soient les substrats naturels de MexEF-OprN (Köhler *et al.*, 1999a). Dans une moindre mesure, MexEF-OprN s'avère capable d'exporter certaines  $\beta$ -lactamines et inhibiteurs de  $\beta$ -lactamase puisque la surexpression de *mexEF-oprN* chez un mutant  $\Delta mexAB-oprM$  augmente de 2 à 4 fois les CMI du céfotaxime, de la carbénicilline, de la cloxacilline ou encore de l'acide clavulanique (Li *et al.*, 1998b).

Dans leur ensemble, les systèmes d'efflux permettent aux bactéries d'échapper à de nombreux stress en rejetant hors de la cellule des molécules toxiques d'origine intrinsèque ou extrinsèque. Ainsi, l'homologue de MexEF-OprN chez *P. putida* (pompe TtgDEF) s'oppose à l'accumulation intracellulaire ou intramembranaire de solvants organiques (Sobel *et al.*, 2005). De même, la surproduction de MexEF-OprN confère à *P. aeruginosa* la capacité de croître en présence 0,08% de p-xylène (Li *et al.*,

1998a). La pompe est également essentielle contre les effets du diamide, un inducteur du stress disulfure, par déplétion du glutathion réduit et perturbation de la balance redox intracellulaire (Fargier *et al.*, 2012). Toutefois, si le diamide peut éventuellement constituer un substrat pour la pompe, on ne peut pas exclure qu'il provoque un stress métabolique conduisant à l'accumulation de composés toxiques, expulsés à leur tour hors des bactéries par MexEF-OprN.

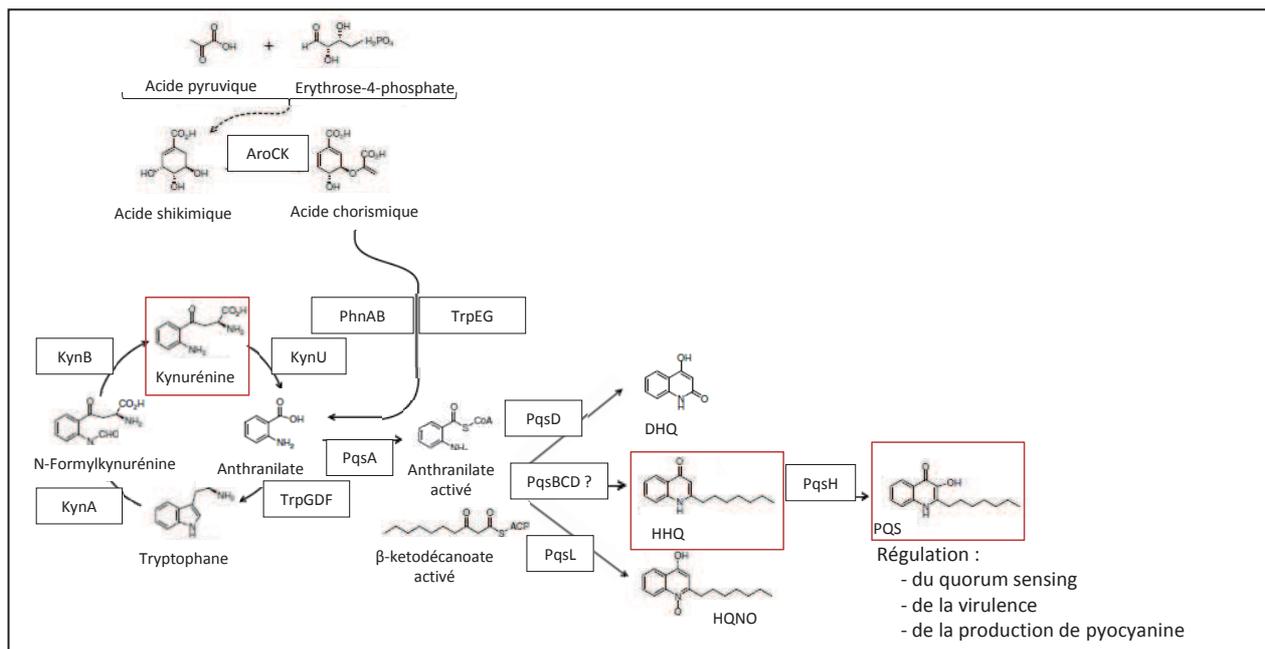


Figure 20 : Voie de synthèse du PQS, molécule clé dans la régulation du quorum sensing et de la virulence chez *Pseudomonas aeruginosa* (adapté de (Heeb *et al.*, 2011)). Les molécules encadrées en rouge sont des substrats potentiels de MexEF-OprN (Lamarche & Déziel, 2011; Olivares *et al.*, 2012).

En 2011, l'analyse par HPLC du surnageant de culture d'un mutant *nfxC* montre la présence de fortes concentrations d'un des précurseurs du PQS (*Pseudomonas* *Quinolone* *Signal*), le HHQ (Figure 20). Sa plus faible concentration dans les culots bactériens suggère son transport hors de la cellule par MexEF-OprN (Lamarche & Déziel, 2011). Un an plus tard, d'autres chercheurs analysent par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse le surnageant de cultures réalisées en milieu minimum avec du tryptophane (un métabolite de la voie de synthèse du PQS) comme seule source de carbone. Ils identifient, un intermédiaire plus précoce de la

voie de synthèse du PQS, la L-kynurénine, absent chez la souche sauvage et le mutant *nfxCΔmexE* (Figure 20) (Olivares *et al.*, 2012). Dans les deux cas, MexEF-OprN semble impliqué dans l'export de molécules du *quorum sensing* (QS).

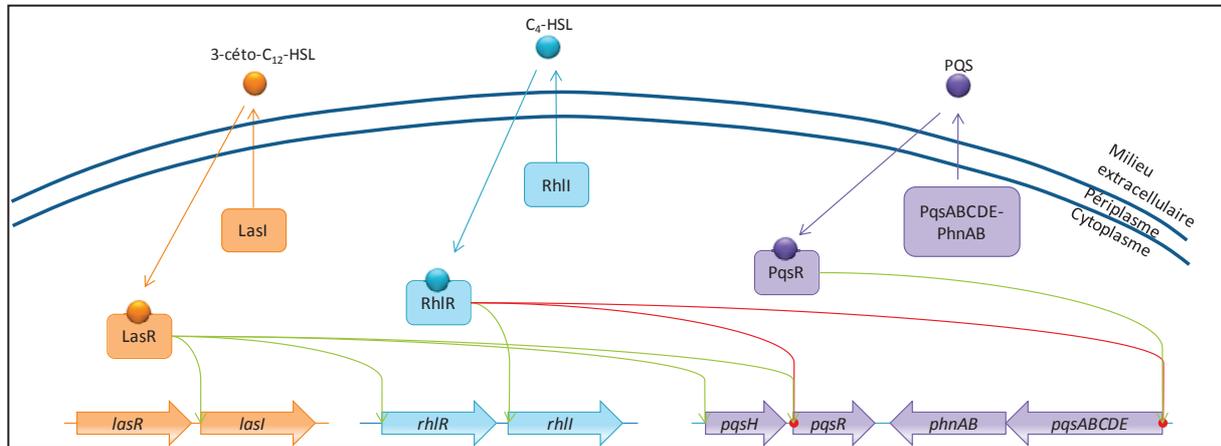


Figure 21 : Le système du quorum sensing chez *P. aeruginosa*. Lorsque la densité bactérienne atteint un certain seuil, le régulateur LasR est activé par le 3-céto-C<sub>12</sub>-HSL synthétisé par LasI. LasR ainsi activé s'autorégule positivement et provoque l'expression de *rhlR*, *pqsH* et *pqsR*. De la même manière, l'activation de RhIR par le C<sub>4</sub>-HSL déclenche sa propre production et réprime le gène *pqsR* et l'opéron *pqsABCDE*. Enfin, PqsR activé par le PQS s'autorégule positivement.

*P. aeruginosa* utilise le QS pour réguler collectivement la production de facteurs de virulence et sa persistance chez l'hôte (Jimenez *et al.*, 2012). La bactérie produit trois homosérines lactones capables de contrôler l'expression des gènes de virulence : la 3-céto-C<sub>12</sub>-homosérine lactone (3-céto-C<sub>12</sub>-HSL), la butanoyl homosérine lactone (C<sub>4</sub>-HSL) et le *Pseudomonas* *Quinolone* *Signal* (PQS). Lorsque la densité bactérienne atteint un certain niveau, la 3-céto-C<sub>12</sub>-HSL intracellulaire se lie à la protéine LasR qui ainsi activée régule de nombreux gènes cibles dont *lasI*, *rhlI*, *pqsH* et *pqsR* impliqués dans la synthèse de la 3-céto-C<sub>12</sub>-HSL, de la C<sub>4</sub>-HSL et du PQS (Figure 32). L'activation du système RhIR/RhII est donc sous la dépendance du système LasR/LasI. A son tour, la C<sub>4</sub>-HSL, en se liant à RhIR permet l'activation de la transcription de *rhlI* et la répression des gènes de synthèse du PQS, *pqsABCDE* et *pqsR* (Figure 21). Enfin, le PQS, produit grâce aux opérons *pqsABCDE*, *phnAB* et au gène *pqsH*, se lie à PqsR afin d'activer les gènes assurant sa propre synthèse et les gènes *rhlR* et *rhlI* (Figure 21).



### 5.2.1 La région intergénique *mexT-mexE*

La région intergénique *mexT-mexE* contient plusieurs éléments importants ayant un rôle dans la régulation de l'opéron d'efflux, parmi lesquels deux « *nod box* » (1 et 2), et deux séquences répétées inversées (*Figure 22*). La séquence ATC-N<sub>9</sub>-GAT-N<sub>7</sub>-ATC-N<sub>9</sub>-GAT, englobant les 2 *nod box*, a été initialement considérée comme caractéristique des gènes régulés par les LTTR et donc, correspond probablement au site de fixation de MexT (Köhler *et al.*, 1999a; Tian *et al.*, 2009a). Toutefois, des études de mutagenèse et de retard sur gel ont révélé que MexT ne se fixait en réalité qu'à la *nod box* 1 (Maseda *et al.*, 2010). La *nod box* 2 pourrait alors contenir l'élément promoteur de *mexE*, mais le séquençage de cette région n'a révélé aucune identité avec une séquence promotrice connue (Maseda *et al.*, 2010). En aval des *nod box* 1 et 2, se trouvent deux séquences répétées inversées (*Figure 22*), semblables au site de fixation de LacI, le répresseur du gène *lacZ* chez *E. coli*. Chez *P. aeruginosa*, cette région pourrait être le site de fixation d'un répresseur transcriptionnel puisque sa délétion entraîne une augmentation de la transcription de *mexEF-oprN* de 4 fois (Maseda *et al.*, 2010).

### 5.2.1 La région intergénique *mexS-mexT*

La région intergénique *mexS-mexT* contient 2 régions promotrices supposées, situées sur les 2 brins de l'ADN et dont les 2 régions -10 se chevauchent. La première (CTGACA-N<sub>18</sub>-GATAAT) serait le promoteur de *mexT* et la seconde (CTGACA-N<sub>15</sub>-AATAAC), celui de *mexS* (Köhler *et al.*, 1999a) (*Figure 22*).

## 6 LA REGULATION LOCALE DU SYSTEME D'EFFLUX MEXEF-OPRN

Contrairement aux autres pompes de type RDN, toutes régulées par des répresseurs, MexEF-OprN est la seule contrôlée par un activateur transcriptionnel de la famille LysR, MexT, composé de 348 acides aminés (Köhler *et al.*, 1997b).

### 6.1 LES REGULATEURS DE LA FAMILLE LYSR (LTTRS)

Les régulateurs de la famille LysR sont des régulateurs globaux d'environ 400 acides aminés possédant une activité activatrice ou répressive sur des gènes isolés ou organisés en opérons, pouvant être impliqués dans le métabolisme, la division cellulaire, le QS, la virulence ou encore la réponse au stress oxydatif (Maddocks & Oyston, 2008). Ils sont généralement transcrits en sens inverse du gène régulé mais peuvent se situer sur des régions plus éloignées du chromosome (Maddocks & Oyston, 2008). L'activation de ces régulateurs résulte de la fixation de molécules co-inductrices, le plus souvent un métabolite de la voie régulée. Le site de fixation du co-inducteur est situé dans la région C-terminale de la protéine qui comprend 2 sous-domaines RD1 et RD2 (*Rossmann-like fold sub Domains*) (Figure 23) connectés par une région « *cross-over* » (acides aminés 173 à 196) dont la structure tertiaire forme une crevasse de 30 x 15 x 10 Å pour l'accueil du co-inducteur.

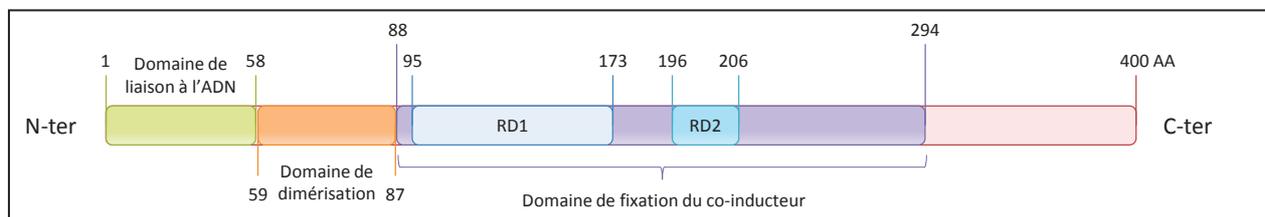
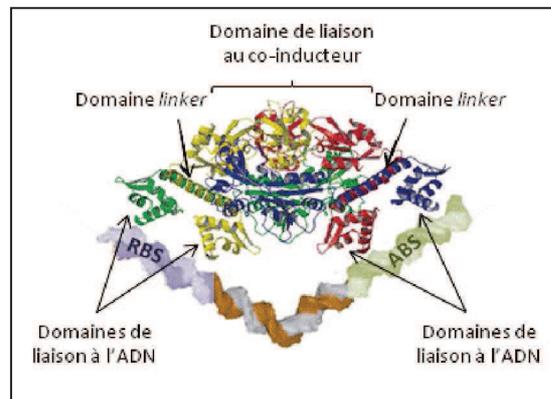


Figure 23 : Structure d'un régulateur de type LysR (adapté de (Tropel & van der Meer, 2004)). La région N-terminale de cette famille de régulateurs contient le domaine de liaison à l'ADN en vert. La région C-terminale comprend le domaine de liaison au co-inducteur (domaine de régulation en violet) composé des domaines RD1 et RD2 (Rossmann-like fold sub-Domains). La liaison entre 2 monomères semble se faire par la région linker (domaine de dimérisation en orange).

Afin d'exercer leur action, les LTTR doivent se fixer à l'ADN grâce à un motif « *helix-turn-helix* » ailé (HTH, *Figure 24*) localisé entre les acides aminés 1 et 58 de la région N-terminale (*Figure 23*).



*Figure 24 : Représentation tridimensionnelle d'un quadrimère de LTTR fixé aux domaines RBS et ABS de la double hélice d'ADN. Adapté de (Muraoka et al., 2003).*

Les LTTRs peuvent différer de ce modèle de référence mais dans tous les cas, les domaines HTH gardent la même fonction de régulation. De par leur structure « ailée », ces domaines sont capables de se fixer à 2 sites du promoteur : le RBS (*Regulatory Binding Site*, position -80 à -50 pb) et l'ABS (*Activation Binding Site*, position -50 à -20 pb) (Maddocks & Oyston, 2008). En absence de co-inducteur, deux dimères de LTTR sont fixés sur ces deux régions, celui fixé sur l'ABS rendant la région -35 du promoteur inaccessible (*Figure 25A*). Ces deux dimères, reliés entre eux par deux sous-unités, imposent une courbure de l'ADN de 71° en -51/-52 et en -42. Lorsque l'inducteur se fixe, la tension en -42 se relâche (courbure de 55°), entraînant un glissement du dimère fixé sur l'ABS vers celui fixé sur le RBS, libérant ainsi la région -35 (*Figure 25B*). L'ARN polymérase peut alors se fixer sur le promoteur et initier la transcription du gène cible (*Figure 25C*). A ce jour, plusieurs LTTRs ont été cristallisés (par exemple OxyR, CnbR) ce qui a permis de confirmer que le tétramère est la structure biologiquement active (Muraoka *et al.*, 2003; Zaim & Kierzek, 2003).

La structure de MexT reste à déterminer ainsi que la nature de son (ou ses) co-inducteur(s).

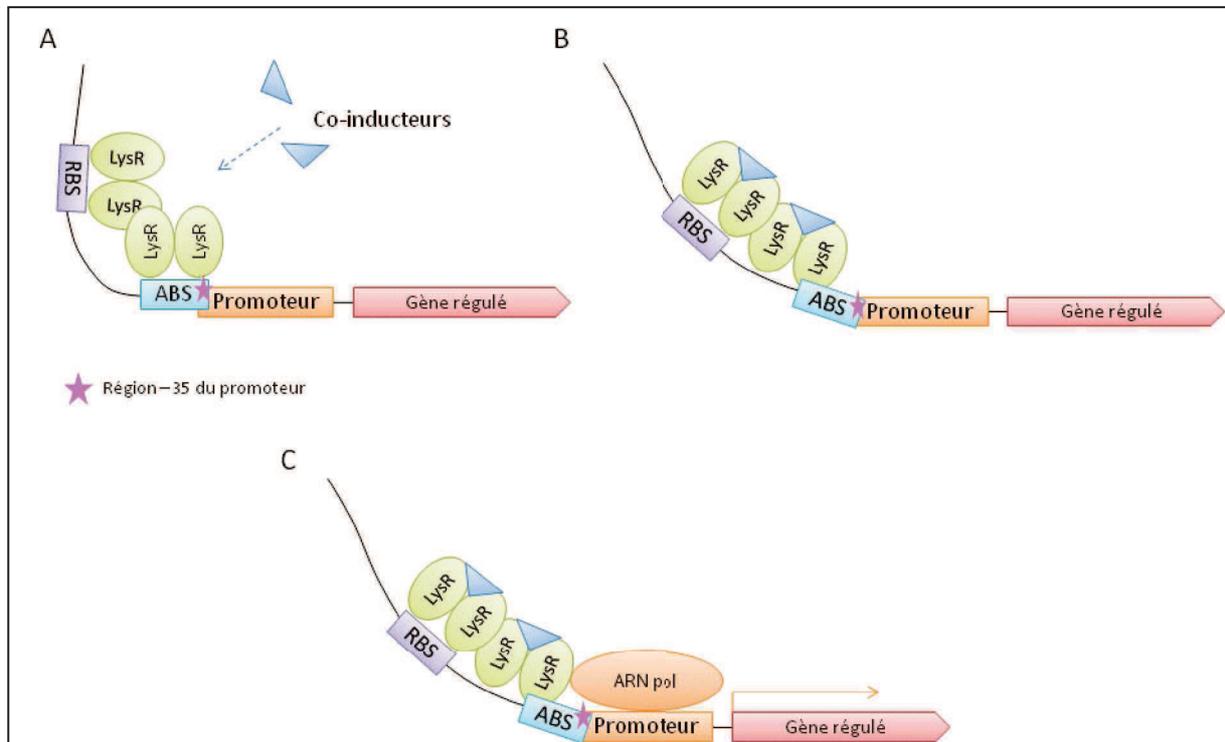


Figure 25 : Régulation par les régulateurs de type LysR d'après (Tropel & van der Meer, 2004) . (A) La fixation des deux dimères de LTTR se fait au niveau des sites ABS (Activation Binding Site) et RBS (Regulatory Binding Site). (B) Le point de courbure de l'ADN en position -42 se relâche et permet la formation du tétramère de LTTR. Le dimère fixé sur l'ABS se déplace, découvrant la région -35 et permettant à l'ARN polymérase de se fixer (C).

## 6.2 IMPACT DES MUTATIONS DANS MEXT

Des substitutions d'acides aminés dans MexT ont été décrites chez certains mutants *nfxC*, sans que leur impact sur la fonction de la protéine soit connu (Llanes *et al.*, 2011). Dans la littérature, il est rapporté que des variations d'acides aminés sont capables d'affecter l'oligomérisation de certains régulateurs LTTR en l'absence de ligand. C'est le cas, par exemple, de BenM chez *Acinetobacter baylyi* et CysB chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, des LTTR qui contrôlent respectivement la dégradation de composés aromatiques et la synthèse de la cystéine (Colyer & Kredich, 1996; Craven *et al.*, 2009). L'analyse de la séquence nucléotidique de *mexT*

chez différentes souches de référence de *P. aeruginosa* indique la présence d'un polymorphisme à la fois dans le gène et la protéine MexT (Tableau 6).

**Tableau 6 : Polymorphisme de MexT décrit dans la littérature.**

Souche	Nom équivalent	Polymorphisme de MexT <sup>a</sup>	Phénotype	Référence
PAO1 Ge	PAO LB, PT5, R-PAO1	WT	WT	(Köhler <i>et al.</i> , 1999a; Luong <i>et al.</i> , 2014; Westfall <i>et al.</i> , 2006)
PAO-7H	PT149, Ig-PAO1, L-PAO1, Ma-PAO1, C-PAO1, PAO PK	$\Delta 8pb_{104}$	<i>nfxC</i>	(Köhler <i>et al.</i> , 1999a; Olivas <i>et al.</i> , 2012; Westfall <i>et al.</i> , 2006)
MPAO1-P1		$\Delta 8pb_{104}$	<i>nfxC</i>	(Olivas <i>et al.</i> , 2012)
MPAO1-P2		Stop <sub>44</sub>	WT	(Olivas <i>et al.</i> , 2012)
PAO1 Tokai		P <sub>202</sub>	WT	(Maseda <i>et al.</i> , 2000a)
<i>nfxC</i> Tokai		S <sub>202</sub>	<i>nfxC</i>	(Maseda <i>et al.</i> , 2000a)
KH4014a		Y <sub>31</sub>	<i>nfxC</i>	(Maseda <i>et al.</i> , 2000a)
PAO1 Tian		V <sub>39</sub>	WT	(Tian <i>et al.</i> , 2009a)
IX		A <sub>199</sub>	WT	(Henrichfreise <i>et al.</i> , 2007)
PAO4009		Stop <sub>31</sub>	WT	(Maseda <i>et al.</i> , 2000a)
D-PAO1	W-PAO1	$\Delta 8pb_{104}$	WT <sup>b</sup>	(Luong <i>et al.</i> , 2014)
PAO4290		$\Delta A_{413}$	WT	(Maseda <i>et al.</i> , 2000a)
H-PAO1		$\Delta G_{77}$	WT	(Luong <i>et al.</i> , 2014)
PAO1-UK		$\Delta CG_{905-906}$	WT	(Vercammen <i>et al.</i> , 2015)

<sup>a</sup> par rapport à la séquence publiée de [www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com). <sup>b</sup> Cette souche n'est pas un mutant *nfxC* car elle possède un codon stop inactivant *mexF* en position 326.

Remarque : Les trois premiers couples du tableau sont des dérivés isogéniques WT/*nfxC*.

Ainsi, chez certaines souches PAO1, *mexT* est inactivé par l'insertion de 8 pb en position 104 et la délétion spontanée de ces 8 pb restaure la synthèse d'un MexT fonctionnel (Köhler *et al.*, 1999a; Olivas *et al.*, 2012). D'ailleurs, certains PAO1 qui ne possèdent pas cette insertion de 8 pb, surexpriment *mexEF-oprN* (Olivas *et al.*, 2012). Dans d'autres souches, le peptide MexT est tronqué en raison d'un codon stop prématuré dans le gène ou suite à un décalage de son cadre de lecture (Luong *et al.*, 2014; Maseda *et al.*, 2000a; Olivas *et al.*, 2012). Enfin, il existe des substitutions d'acides aminés dont l'impact n'est pas connu (Henrichfreise *et al.*, 2007; Maseda *et al.*, 2000a; Quale *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2009a).

### 6.3 LE RÔLE DE LA PROTEINE MEXS

MexS est une oxydoréductase appartenant à la famille MDR (*Medium chain Dehydrogenases/Reductases*) et à la sous-famille des quinone-oxydoréductases ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)). Ces enzymes sont généralement actives sous forme de dimère ou de tétramère et interviennent dans le métabolisme, les processus de régulation ou la protection de la cellule vis-à-vis des composés toxiques. Elles fonctionnent à l'aide de co-facteurs tels que le NADH ou le NADPH (Knoll & Pleiss, 2008). Peu d'informations sont disponibles sur le fonctionnement de MexS ou sur son (ses) substrat(s). Elle a été initialement décrite comme un répresseur de *mexT*, en raison de mutations fréquentes chez les mutants *nfxC* (Maseda *et al.*, 2000a). Son inactivation sous l'effet de mutations a été rapidement associée à de la surexpression de *mexEF-oprN* de manière MexT-dépendante (Sobel *et al.*, 2005b). En réalité, MexS pourrait avoir pour rôle d'éliminer certains métabolites secondaires toxiques puisque son expression est concomitante de celle du système d'efflux MexEF-OprN, par MexT (Köhler *et al.*, 1999a). La surproduction de MexEF-OprN compenserait alors l'inactivation de l'oxydoréductase MexS chez certains mutants *nfxC*, afin d'éliminer les composés toxiques qui ne seraient plus transformés par cette enzyme. L'analyse de 4 mutants *nfxC* sélectionnés sur un milieu contenant du chloramphénicol montre que l'un possède une délétion de 90 pb, inactivant totalement la protéine MexS, et les 3 autres des substitutions d'acides aminés (S<sub>124</sub>R, Y<sub>127</sub>Stop et V<sub>333</sub>G) confirmant ainsi l'hypothèse précédente (Sobel *et al.*, 2005b). En clinique, les mutants *nfxC* présentant des mutations ponctuelles dans la protéine MexS sont plus fréquents que ceux produisant des peptides MexS aberrants suite à des *indels* dans le gène, par exemple (Llanes *et al.*, 2011).

## 6.4 HYPOTHESES DE REGULATION PAR LE COUPLE MEXS/MEXT

La protéine MexS de la souche PAO1 diffère de celle de PA14 par un résidu d'acide aspartique (D) en position 249 au lieu d'une asparagine (N). L'impact de cette substitution reste controversé. Puisque chez la plupart des souches de type PAO1, la délétion des 8pb qui inactivent le gène *mexT* est suffisante pour engendrer un phénotype NfxC, il a été proposé que MexS (D<sub>249</sub>) était fonctionnelle et agissait avec MexT pour surexprimer *mexEF-oprN* (Jin *et al.*, 2011). Au contraire, pour d'autres équipes, MexS est non-fonctionnelle chez PAO1 et responsable de la surexpression de la pompe lorsque MexT devient actif (Maseda *et al.*, 2000a). Il existerait alors 2 types de souches. Le premier posséderait dans son génome les deux gènes *mexS* et *mexT* sous forme inactive, et le deuxième ces deux gènes sous forme active. Chez le premier, la réactivation de MexT et chez le deuxième l'inactivation de MexS conduirait à la surexpression de *mexEF-oprN* (Figure 26). Au final, MexT doit être sous forme active et MexS inactive (mutant *mexS*) pour permettre l'apparition du phénotype NfxC (Maseda *et al.*, 2000a).

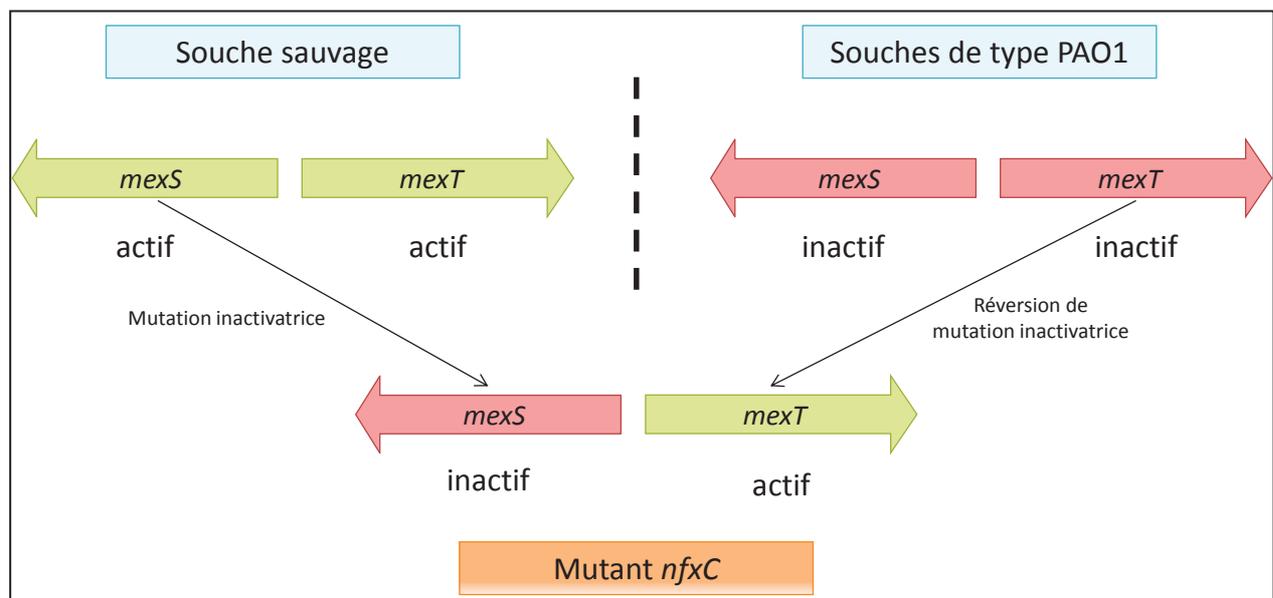


Figure 26 : Mécanismes génétiques liés à MexS/MexT, à l'origine de la surexpression de *mexEF-oprN*. Adapté de (Maseda *et al.*, 2000a).

L'inactivation de MexS a un impact mal connu sur MexT. Nous avons vu précédemment qu'elle pourrait engendrer l'accumulation intracellulaire de métabolites jouant le rôle de co-effecteurs pour MexT, et induisant alors la surexpression de *mexEF-oprN* (Sobel *et al.*, 2005b). Par ailleurs, des travaux ont montré que l'activité de MexT dépend de son niveau d'oligomérisation, lui-même dépendant du potentiel redox de la cellule (Fargier *et al.*, 2012). Ainsi, MexT migre sous la forme d'un monomère ayant une masse apparente de 35 kDa en milieu réducteur, alors qu'en milieu oxydant sa masse avoisine les 100 kDa, suggérant la formation d'un tétramère. De plus, par la technique de retard sur gel, seule la forme oxydée de MexT paraît capable de se lier à la région promotrice de *mexEF-oprN*. On peut donc imaginer que chez les souches sauvages non soumises à un stress, MexS aiderait à maintenir le potentiel redox intracellulaire à un niveau optimal pour lequel MexT est sous forme d'un monomère inactif. L'inactivation de MexS modifierait alors le potentiel redox de la cellule et favoriserait consécutivement la tétramérisation de MexT avec pour conséquence la surexpression de la pompe comme mécanisme de défense et de détoxification (Fargier *et al.*, 2012).

## 6.5 LES AUTRES REGULATEURS POTENTIELS DE MEXEF-OPRN

Le rôle de MexT n'est plus à démontrer dans la régulation de *mexEF-oprN*. Toutefois, différentes études transcriptomiques ont mis en évidence le rôle d'autres régulateurs dans l'expression de cet opéron (Balasubramanian *et al.*, 2012; Burrowes *et al.*, 2006; Juhas *et al.*, 2004; Liao *et al.*, 2013; Muller *et al.*, 2011; Vercammen *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2013; Westfall *et al.*, 2006; Zaoui *et al.*, 2012). Ainsi, 4 répresseurs (AmpR, MxtR, MvaT et PA2449) et 3 activateurs (ParR, NmoR et BrlR) transcriptionnels auraient des effets variables sur l'expression de *mexEF-oprN* et sur les CMI des substrats de la pompe (Tableau 7 et Figure 27). A ce jour, aucun mutant *nfxC* muté dans ces

régulateurs n'a pu être identifié en clinique à l'exception de possibles mutants *mvaT* (Llanes *et al.*, 2011).

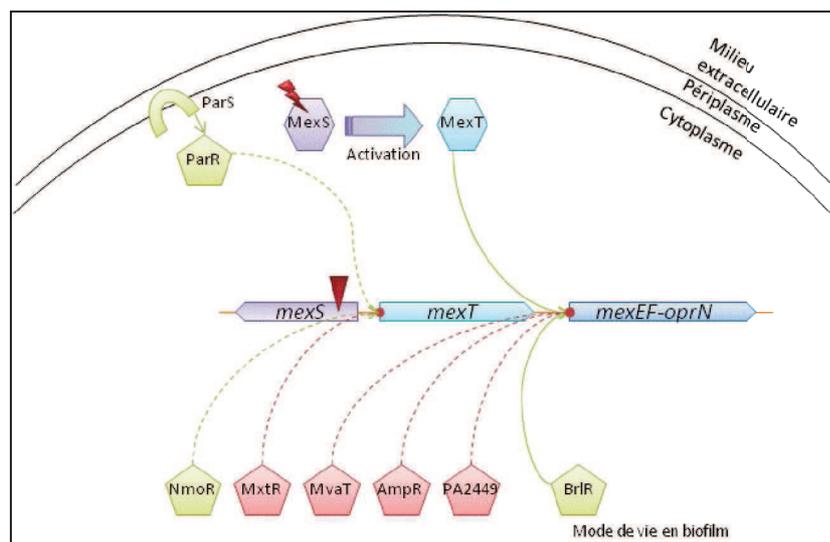
**Tableau 7 : Impact des régulateurs de *mexEF-oprN* sur l'expression de l'opéron et sur le phénotype de résistance chez différents mutants dérivés de PAO1 ou PA14.**

Souche	Expression de <i>mexE</i>		CMI (µg/mL)				
	microarray	RT-qPCR	CIP	CHL	TMP	IPM	MEM
PAO1	-	-	0,125-0,25-0,25	64-128	300-200	1-2	1
PAO7H <sup>a</sup>	ND	ND	1	1024	1024	8	ND
PA14	-	-	0,125	ND	ND	ND	ND
PAOW2 <sup>b</sup>	ND	ND	1	ND	ND	16	4
PAO1Δ <i>parS</i>	-3,51	-8,6	0,25	ND	ND	2	1
PAO1Δ <i>parR</i>	-2,39	-7,06	ND	ND	ND	ND	ND
PAO1Δ <i>parRS</i>	ND	ND	0,25	ND	ND	2	1
PAO1Δ <i>mvaT</i>	ND	6	ND	100	300	0,5	ND
PAO1Δ <i>nmoR</i>	-25	-422	ND	ND	ND	ND	ND
PAO1Δ <i>mxtR</i>	13,9	ND	0,5	ND	ND	ND	ND
PA14Δ <i>mxtR</i>	ND	ND	0,5	ND	ND	ND	ND
PAO1Δ <i>ampR</i>	108	8089	2	512	>200	ND	ND

CIP : ciprofloxacine, CHL : chloramphénicol, TMP : triméthoprime, IPM : imipénème et MEM : méropénème. ND : non déterminé.

D'après (Balasubramanian *et al.*, 2012; Köhler *et al.*, 1997b; Muller *et al.*, 2011; Vercammen *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2013; Westfall *et al.*, 2006; Zaoui *et al.*, 2012), selon le même code couleur.

<sup>a</sup>: souche sélectionnée *in vitro* dont le gène *mexS* est inactif et *mexT* actif. <sup>b</sup>: souche sélectionné *in vitro* à partir de la souche de référence PAO1 présentant une substitution activant ParR (Muller *et al.*, 2011).



**Figure 27 : Différents régulateurs décrits pour réguler l'opéron *mexEF-oprN*. Les flèches pleines et en pointillés indiquent respectivement une régulation directe et indirecte (Balasubramanian *et al.*, 2012; Köhler *et al.*, 1997b; Muller *et al.*, 2011; Vercammen *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2013; Westfall *et al.*, 2006; Zaoui *et al.*, 2012).**

### 6.5.1 NmoR

NmoR (PA4203) est un régulateur de la famille LysR organisé en opéron avec une gluconolactonase périplasmique, PpgL, dont le rôle semble être la détoxification d'intermédiaires du métabolisme cellulaire (Figure 28) (Vercammen *et al.*, 2015). En amont et transcrits en sens inverse, se trouvent les gènes codant pour une mono-oxygénase, NmoA, et pour une D-alanine-alanine ligase, DdlA. L'organisation de ces 4 gènes est conservée chez toutes les souches de *P. aeruginosa*. La délétion de *nmoR* chez PAO1 augmente l'expression de *nmoA* (20 fois) et réprime fortement *mexE* (400 fois). Il n'est pas exclu que l'activité de NmoR sur l'opéron passe par MexT car dans la souche de PAO1 utilisée, MexT est actif. D'ailleurs, l'expression de *mexT* est réduite 3 fois chez le mutant PAO1 $\Delta$ *nmoR* (Vercammen *et al.*, 2015).

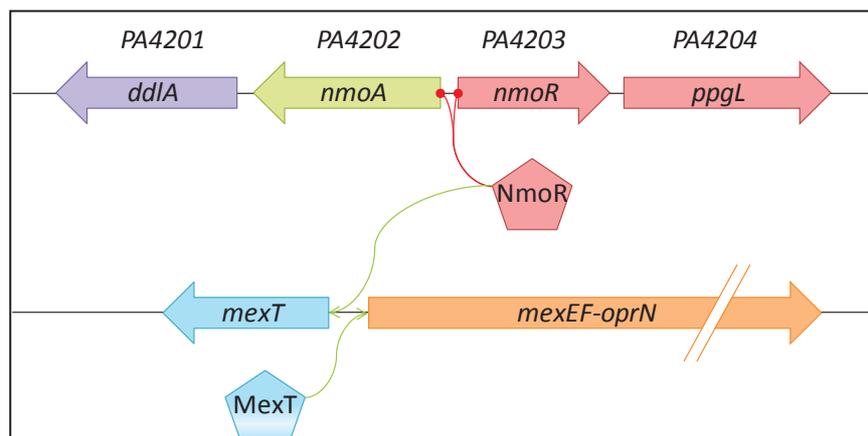


Figure 28 : La régulation de *mexEF-oprN* par *NmoR*. *NmoR* agit comme répresseur de sa propre transcription, de celle de *nmoA* et comme activateur de *mexT* conduisant à la surexpression de *mexEF-oprN* (Vercammen *et al.*, 2015). La numérotation des gènes correspond à celle de PAO1 ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)).

### 6.5.2 AmpR

AmpR (PA4109) est un régulateur de la famille LysR, capable de jouer le rôle d'activateur ou de répresseur en fonction de son co-substrat (Balcewich *et al.*, 2010). Il régule le gène *bla*<sub>AmpC</sub> codant la  $\beta$ -lactamase naturelle AmpC de *P. aeruginosa*, mais

également des gènes codant des facteurs de virulence tels que ceux impliqués dans la production de pyocyanine, d'élastase ou de protéases (Kong *et al.*, 2005). Chez PAO1 (MexT inactif), la délétion de *ampR* conduit à la surexpression des gènes *mexE*, *mexF* et *oprN* (respectivement 108, 89 et 103 fois) accompagnée d'une augmentation de 3 fois de la CMI des substrats de la pompe (ciprofloxacine et chloramphénicol) (Balasubramanian *et al.*, 2012). Le gène *mexT* est, quant à lui, surexprimé 7,5 fois chez la souche PAO1 $\Delta$ *ampR*. Toutefois, la régulation de *mexEF-oprN* par AmpR n'implique probablement pas MexT car, dans cette souche, le gène *mexT* est inactivé par l'insertion de 8pb décrite précédemment. De plus, l'analyse de la région promotrice de *mexT* n'a pas permis de mettre en évidence la séquence consensus d'ADN supposée être le site de fixation de AmpR (TCT-NNT-NNA-AAT-TT). Une étude réalisée en 2010 avait suggéré la présence d'un site de fixation d'un répresseur en amont de *mexE* (Maseda *et al.*, 2010). AmpR pourrait réguler l'activité de ce répresseur inconnu et permettre indirectement la surexpression de *mexEF-oprN* (Balasubramanian *et al.*, 2012).

### 6.5.3 PA2449

PA2449 est une protéine de la famille TyrR appartenant au groupe des EBP (*Enhancer Binding Proteins*). Ces protéines ont pour caractéristique de se fixer au facteur *sigma* de transcription RpoN afin d'activer la transcription de gènes cibles (Lundgren *et al.*, 2013). L'insertion d'un transposon au sein du gène PA2449 ne permet plus à la bactérie de croître en milieu minimum avec la glycine comme seule source de carbone, ce qui suggère un rôle pour PA2449 dans le métabolisme de cet acide aminé. Par ailleurs, l'inactivation de PA2449 augmente l'expression de *mexE*, *mexF* et *oprN* respectivement 139, 115 et 43 fois relativement à la souche sauvage (PAO1) sans que le phénotype de résistance ne soit renseigné. Les modalités de la répression de *mexEF-oprN* par PA2449 ne sont pas connues, mais l'expression de *mexT* n'étant pas

modifiée chez le mutant  $\Delta PA2449$ , cette régulation semble être indépendante de MexT (Lundgren *et al.*, 2013).

#### 6.5.4 ParRS

Le TCS ParRS, dont l'implication dans la régulation du gène *oprD* et du système d'efflux MexXY a été présentée dans les pages précédentes, modulerait également l'expression de l'opéron *mexEF-oprN*. En effet, l'analyse transcriptomique de mutants *parR* et *parS* a révélé que l'inactivation de chacun de ces deux gènes avait un impact sur l'expression de *mexS* (respectivement -2,39 et -3,51) et des gènes *mexE-mexF-oprN* (respectivement, -7,30 et -8,21 pour *mexE*, -9,36 et -8,75 pour *mexF* et -8,53 et -7,11 pour *oprN*) (Wang *et al.*, 2013). Cependant, ces résultats diffèrent de ceux obtenus au laboratoire et dans lesquels aucune modification de l'expression de *mexEF-oprN* et aucun changement dans les CMI des substrats du système d'efflux n'a été identifié chez les mutants  $\Delta parR$  et  $\Delta parS$  (Tableau 7) (Muller *et al.*, 2011).

#### 6.5.5 MxtR

MxtR (PA3271) est une senseur-kinase activée par les modifications du potentiel redox cellulaire (Zaoui *et al.*, 2012). Cette kinase appartient à la famille des TCS non-orthodoxes chez qui les domaines senseur et régulateur sont portés par la même protéine. L'insertion d'un transposon dans le gène *mxtR* provoque une augmentation modérée (20 fois) de l'expression de *mexEF-oprN*, probablement en raison de la surexpression de MexT (4,3 fois). D'ailleurs, cette surexpression est accompagnée d'une diminution de la transcription des gènes réprimés par MexT, tels que ceux impliqués dans la production de rhamnolipides et de pyocyanine (Zaoui *et al.*, 2012). L'inactivation de *mxtR* entraîne également une augmentation de 2 fois de la CMI de la ciprofloxacine, qui pourrait s'expliquer par une activité de MxtR vis-à-vis de MexT (Zaoui *et al.*, 2012).

### 6.5.6 MvaT

MvaT (PA4315) appartient à la famille des H-NS (*Histone-like Nucleoid Structuring protein*) (Castang & Dove, 2010). Comme toutes les protéines de cette famille, elle se fixe sur des régions riches en AT de l'ADN et forme des ponts ADN-H-NS-ADN. La formation de ces ponts compacte l'ADN et permet la répression de gènes cibles (*silencing*). Chez *P. aeruginosa*, MvaT est le répresseur d'environ 150 gènes de structure et de virulence parmi lesquels *cupA*, un gène impliqué dans la formation de biofilm (Castang & Dove, 2010). La délétion du gène *mvaT* engendre chez PAO1 une faible augmentation (5 à 7 fois) de l'expression de *mexE*, *mexF* et *oprN* bien inférieure à celle observée chez les mutants *nfxC*. Elle s'accompagne toutefois d'une résistance plus élevée (2 à 4 fois) au chloramphénicol et à la norfloxacine. De plus, comme chez les mutants *nfxC*, le mutant PAO1 $\Delta$ *mvaT* produit moins de pyocyanine. La CMI des carbapénèmes n'étant pas modifiée chez le mutant PAO1 $\Delta$ *mvaT*, MvaT pourrait contribuer à la régulation du système d'efflux de manière MexT-indépendante (Westfall *et al.*, 2006). Par ailleurs, cette étude ne précise pas si *mexT* est actif ou inactif. A ce jour, deux mutants *nfxC* isolés en clinique ont montré des altérations du gène *mvaT* (Llanes *et al.*, 2011). L'un présente une délétion d'un nucléotide en position 230 et l'autre une substitution conduisant à la variation A<sub>115</sub>T dans la protéine. Ces mutations étant associées à des substitutions dans MexS connues pour induire l'expression de *mexEF-oprN*, leur impact n'a pas été étudié de façon ciblée.

### 6.5.7 BrlR

BrlR (PA4878) est un régulateur transcriptionnel de la famille MerR, spécifiquement exprimé lorsque les bactéries se développent en biofilm (Liao & Sauer, 2012). Les régulateurs de cette famille sont composés d'un domaine N-terminal de liaison à l'ADN et un domaine C-terminal de liaison au co-inducteur. Par homologies de séquences avec des régulateurs connus de cette famille, BrlR a pu être classé parmi

les MTA (*Multidrug Transporter Activators*). Ces activateurs transcriptionnels sont impliqués dans la régulation de l'expression de transporteurs d'agents antimicrobiens (Liao & Sauer, 2012). Une analyse transcriptomique a d'ailleurs révélé que, dans le biofilm, le mutant PAO1 $\Delta$ *brlR* sous-exprimait *mexE* plus de 200 fois comparativement à la souche PAO1, suggérant que la pompe serait surproduite dans le biofilm. Cependant, dans les mêmes conditions, les niveaux d'expression de *mexE* déterminés par RT-qPCR n'étaient plus que 3,8 fois inférieurs à ceux de la souche parentale PAO1. Par ailleurs, la complémentation plasmidique du gène *brlR* dans la souche PAO1 $\Delta$ *brlR* entraînait une activation modeste (10 fois) du gène *mexE*. L'interaction entre BrlR et le promoteur de *mexEF-oprN* a été mise en évidence par immunoprécipitation de chromatine (ChIP), un résultat indiquant à priori que dans le biofilm BrlR a un rôle direct sur le promoteur de l'opéron d'efflux (Liao *et al.*, 2013).

### 6.5.8 VqsR

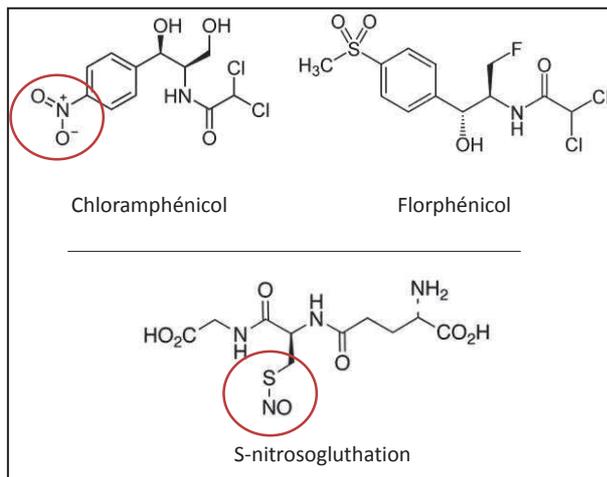
VqsR (PA2591) est un régulateur majeur de la virulence, impliqué dans l'activation de *lasI* et donc dans la régulation du QS (Juhas *et al.*, 2004). Il appartient à la famille LuxR. Son expression est inductible lorsque la souche est cultivée en présence de peroxyde d'hydrogène (Juhas *et al.*, 2004). En plus de son rôle dans la virulence, il semble avoir un impact sur l'expression de *mexEF-oprN* en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En effet, l'insertion d'une séquence Tn5 inactivant *vqsR* chez une souche sauvage issue d'un patient atteint de mucoviscidose entraîne la sous-expression de l'opéron *mexEF-oprN* de 10 à 20 fois lorsque la souche est cultivée présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le peroxyde d'hydrogène, tout comme l'inactivation de *vqsR*, ne modifient pas l'expression de *mexEF-oprN* à eux seuls (Fargier *et al.*, 2012; Juhas *et al.*, 2004) ; ce serait l'association des deux évènements qui semblerait capable de modifier la production de la pompe par une voie qui reste à découvrir (Juhas *et al.*, 2004).

### 6.5.9 RsmA

RsmA (PA0905) est une petite protéine régulatrice de 7 kDa dont l'activité est contrôlée par 2 petits ARN *rsmY* et *rsmZ* (Kay *et al.*, 2006). Elle possède une activité de régulation post-transcriptionnelle en interagissant avec des ARNm cibles possédant en 5' la séquence GGA (Kay *et al.*, 2006). Elle intervient dans le contrôle de la virulence, du QS, de la mobilité et la réponse au stress (Brencic & Lory, 2009). Une analyse transcriptomique réalisée sur des mutants *rsmA* de PAO1 (MexT actif) a révélé que l'opéron *mexEF-oprN* était surexprimé environ 200 fois par rapport à la souche parentale (Burrowes *et al.*, 2006). Toutefois, en utilisant un fond génétique différent (la souche de référence PAK), ces résultats n'ont pu être reproduits chez le mutant PAK $\Delta$ *rsmA* (Brencic & Lory, 2009). Après vérification, il semblerait que l'isolement sur chloramphénicol du mutant PAO1 $\Delta$ *rsmA* ait sélectionné dans la première étude un mutant *nfxC* spontané, biaisant les résultats (Mooij *et al.*, 2010). Au final, RsmA ne semble donc pas avoir d'impact sur l'expression de *mexEF-oprN* (Brencic & Lory, 2009).

## 7 MEXEF-OPRN : UN SYSTEME INDUCTIBLE

L'inductibilité est un processus instable qui permet à la bactérie de s'adapter temporairement à des variations de son environnement. Parmi les 12 pompes de type RND décrites chez *P. aeruginosa*, seule l'inductibilité de *mexXY* par les antibiotiques inhibant la synthèse protéique a été bien documentée (Jeannot *et al.*, 2005). Toutefois, la production de MexEF-OprN semble également être inductible dans certaines conditions de culture, avec ou sans antibiotique. Par exemple, un traitement de 45 minutes à de faibles (0,5  $\mu$ g/mL) ou fortes (16  $\mu$ g/mL) concentrations d'imipénème augmente deux fois le niveau d'expression de *mexEF-oprN* chez un mutant *nfxC*. Ce phénomène n'est pas présent chez la souche sauvage (Kolayli *et al.*, 2004).



**Figure 29 : Structure du chloramphénicol, du florphénicol et du S-nitrosogluthation. Les groupements nitreux sont entourés en rouge.**

L'induction de *mexEF-oprN* a également été démontrée par dosage de l'activité  $\beta$ -galactosidase dans des cultures renfermant des molécules nitro-aromatiques telles que le chloramphénicol utilisé au quart de la CMI (augmentation de plus de 1000 unités de Miller). Toutefois, le chloramphénicol qui sélectionne facilement des mutations dans le gène

*mexS* (Mooij *et al.*, 2010), il est possible que l'augmentation de la transcription de *mexE* résulte de la sélection fortuite de mutants MexS et non pas d'une induction par l'antibiotique (Fetar *et al.*, 2011; Mooij *et al.*, 2010). Dans l'étude de Fetar et coll., l'induction n'est plus observée avec le florphénicol, un dérivé du chloramphénicol dépourvu de groupement NO (Figure 29). L'opéron d'efflux répondrait donc à un stress oxydatif de nature nitreuse (Fetar *et al.*, 2011). Rappelons que le peroxyde d'hydrogène ne provoque pas l'expression de *mexEF-oprN* à lui seul (Fargier *et al.*, 2012), c'est donc bien le groupement NO qui serait à l'origine de l'induction. Cette hypothèse est confirmée par l'utilisation d'une autre molécule, le S-nitrosogluthation (GSNO) (Figure 29) qui, à la concentration de 5 mM induit également l'expression de *mexE* chez une souche clinique non-*nfxC* (MexT actif) après 30 min de culture. En revanche, chez un mutant  $\Delta$ *mexF*, le GSNO induit la production d'une oxydoréductase, XenB, capable d'éliminer le groupement nitrosyl présent sur certaines molécules (Fetar *et al.*, 2011). L'activation de *xenB* constituerait un mécanisme de détoxification palliant le déficit d'élimination des produits nitrosylés par la pompe MexEF-OprN. Finalement, une analyse transcriptomique a permis d'observer la surexpression de *mexE* (environ 15 fois) chez la souche PAO1 après 12h

de croissance en présence de cellules pulmonaires humaines (Frisk *et al.*, 2004). L'origine de cette induction n'est aujourd'hui pas connue mais semble impliquer MexT puisque deux gènes appartenant au régulon de MexT sont également activés : PA4623 et PA4881 codant pour des protéines de fonction inconnue (Tian *et al.*, 2009a).

## 8 PHÉNOTYPE DES MUTANTS NFXC

Les mutants *nfxC* (*n*or*f*lo*x*a*c*i*n*e) ont été découverts en 1990 suite à l'isolement de mutants de PAO1 résistants à la norfloxacine (Fukuda *et al.*, 1990). Ils ont été nommés ainsi par référence aux mutants *nfxA* et *nfxB* (Figure 30), également résistants à cet antibiotique, respectivement en raison d'altérations dans les QRDR et d'une surproduction du système d'efflux MexCD-OprJ (Hirai *et al.*, 1987).

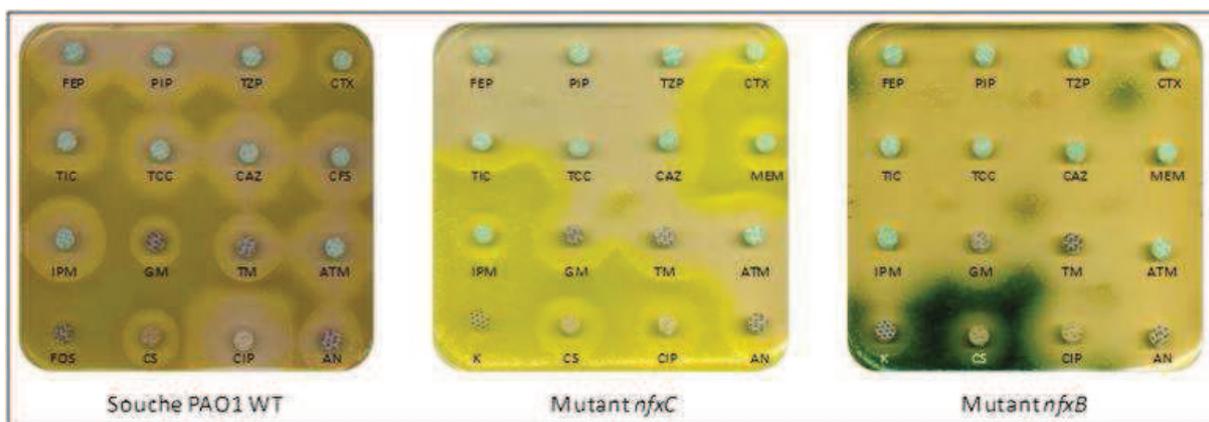


Figure 30 : Antibiogrammes de la souche de référence PAO1, d'un mutant *nfxC* et d'un mutant *nfxB* surproduisant respectivement les systèmes d'efflux MexEF-OprN et MexCD-OprJ. FEP : céfépime, PIP : pipéracilline, TZP : pipéracilline + tazobactam, CTX : céfotaxime, TIC : ticarcilline, TCC : ticarcilline + acide clavulanique, CAZ : ceftazidime, CFS : cefsulodine, MEM : méropénème, IPM : imipénème, GM : gentamicine, TM : tobramycine, ATM : aztreonam, FOS : fosfomycine, K : kanamycine, CS : colistine, CIP : ciprofloxacine, AN : amikacine.

Outre une résistance aux fluoroquinolones, au chloramphénicol et au triméthoprime, les mutants *nfxC* obtenus *in vitro* présentent également une résistance aux carbapénèmes (Köhler *et al.*, 1997b) et une hypersensibilité aux  $\beta$ -lactamines (Maseda *et al.*, 2004) et à certains aminosides (Llanes *et al.*, 2011). Bien que les mécanismes de

cette plus grande sensibilité soient mal connus, il semblerait qu'elle survienne suite à une sous-expression des opérons *mexAB-oprM* et *mexXY/oprM*, respectivement. Ces mutants semblent également déficients dans la production de certains facteurs de virulence tels que la pyocyanine, les rhamnolipides, l'élastase, le système de sécrétion de type III (T3SS) ou encore dans la formation de biofilm (Jin *et al.*, 2011; Köhler *et al.*, 2001; Linares *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2009b).

## 8.1 PHENOTYPE DE RESISTANCE DES MUTANTS *NFXC*

Divers travaux ont associé la surexpression de MexEF-OprN à une résistance accrue aux carbapénèmes, due à un déficit de porine OprD dans la membrane externe (Aubert *et al.*, 1992; Fukuda *et al.*, 1995; Köhler *et al.*, 1997b; Masuda & Ohya, 1992; Masuda *et al.*, 1995). Cette diminution semble être la conséquence d'une répression de la transcription du gène *oprD* par MexT, bien qu'aucune *nod box* n'ait été mise en évidence en amont de ce gène. Cette hypothèse semble toutefois probable puisque la surexpression de *mexT* cloné dans un plasmide conduit à une légère diminution (2,5 fois) de l'activité de fusions transcriptionnelles *oprD::xylE* (Ochs *et al.*, 1999b) et *oprD::lacZ* (Köhler *et al.*, 1999a). Par ailleurs, le pouvoir catalytique de la phosphatase alcaline PhoA, dont l'export dans l'espace périplasmique dépend de régulations transcriptionnelles mais également post-transcriptionnelles a été testé sur une fusion *oprD::phoA* (Rodríguez-Quiñones *et al.*, 1994). L'activité de la protéine hybride est diminuée 8 fois chez un mutant *nfxC* par rapport à la souche sauvage indiquant que la régulation est également post-transcriptionnelle (Köhler *et al.*, 1999a).

A l'inverse, on constate chez les mutants *nfxC*, une hyper-sensibilité à certains antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines et des aminosides, respectivement substrats des pompes d'efflux MexAB-OprM et MexXY/OprM (Maseda *et al.*, 2004). La délétion de *mexAB-oprM* chez un mutant *nfxC* conduit à une augmentation de la quantité de protéine OprN dans la membrane externe, suggérant que MexAB-OprM

pourrait être sous-produit chez les mutants *nfxC* (Li *et al.*, 1998b; Li *et al.*, 2000). Des mesures d'activité  $\beta$ -galactosidase ont montré qu'en phase exponentielle de croissance, un mutant *nfxC* produisait 2 fois moins de transcrits *mexAB-oprM* qu'une souche parentale sauvage, du fait de la répression probable de l'opéron par MexT. D'ailleurs, une séquence nucléotidique en amont de cet opéron pourrait correspondre à un site de fixation de MexT (Maseda *et al.*, 2004). Pour une autre équipe, la diminution de la transcription de *rhII* chez les mutants *nfxC* serait à l'origine de la sous-expression de *mexAB-oprM* puisque cet opéron est positivement régulé par le système RhlR/RhII (Lamarche & Déziel, 2011). Un phénomène analogue existe chez les mutants *nfxB*, qui surexpriment le système d'efflux MexCD-OprJ. Toutefois, dans ce cas, l'hypersensibilité aux  $\beta$ -lactamines et aux aminosides ne semble pas liée à la répression des opérons *mexAB-oprM* et *mexXY* mais à une moindre efficacité des pompes pour exporter leurs antibiotiques substrats (Jeannot *et al.*, 2008). Au final, l'activité des pompes MexAB-OprM et MexXY(OprM) chez les mutants *nfxC* pourrait être réduite pour compenser la forte augmentation de l'efflux médié par MexEF-OprN et maintenir un équilibre physiologique entre tous ces systèmes (Li *et al.*, 2000).

## 8.2 VIRULENCE DES MUTANTS *NFXC*

Dès la découverte de MexEF-OprN, il est apparu que les mutants *nfxC* était déficients dans la production de pyocyanine (Köhler *et al.*, 1997b). La caractérisation ultérieure de mutants issus de la souche PAO1 a révélé qu'ils produisaient également moins d'élastase et de rhamnolipides, et qu'ils étaient par conséquent déficients dans la mobilité de type *swarming* (Figure 31) (Köhler *et al.*, 2001).

Plus généralement, d'après un modèle d'étude de la virulence utilisant le ver *Caenorhabditis elegans*, la perte de virulence des mutants *nfxC* ne serait pas liée à l'action directe de MexT mais plutôt à l'export de molécules par MexEF-OprN. En

effet, si la DL50 (Dose Létale 50) d'un mutant *nfxC* est plus élevée que celle d'une souche sauvage elle est également supérieure à celle de la souche *nfxCΔmexE* (Olivares *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'analyse transcriptomique de mutants délétés ou non de l'opéron *mexEF-oprN* a permis de différencier les phénotypes directement liés à la surproduction de la pompe, de ceux régulés par MexT (Figure 31) (Tian *et al.*, 2009a). La virulence étant largement régulée par le QS chez *P. aeruginosa*, la surproduction du système MexEF-OprN, supposé exporter un précurseur du QS, conduit logiquement à une perte de virulence.

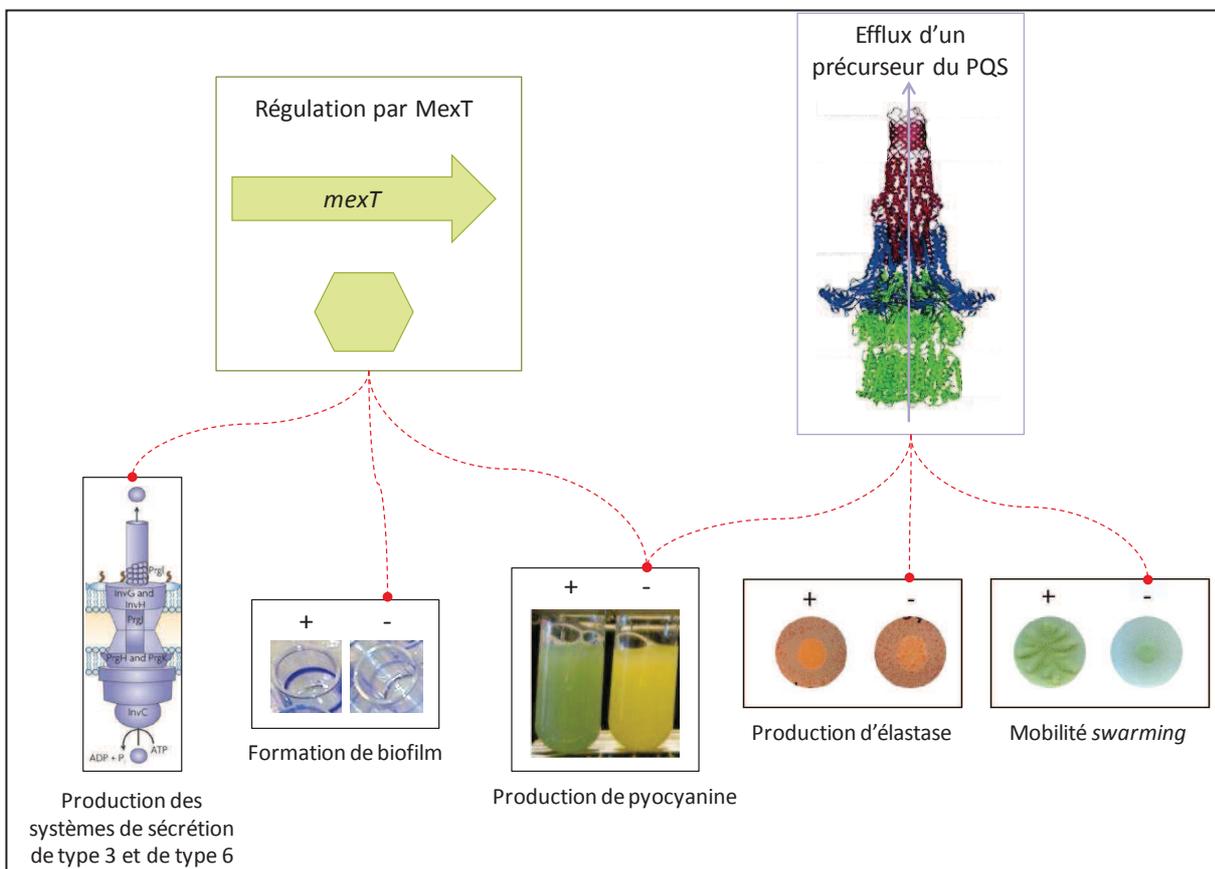


Figure 31 : Phénotype de virulence des mutants *nfxC*. La répression des systèmes de sécrétion de type 3 et de type 6 est due à MexT. Cet activateur de l'opéron d'efflux serait également capable de réprimer la formation de biofilm et la production de pyocyanine, bien que cette dernière soit également impactée par l'efflux d'un précurseur du PQS par MexEF-OprN. Enfin, la production d'élastases et la mobilité de type swarming sont réduites chez les mutants *nfxC* en raison de la quantité plus faible de PQS disponible.

### 8.2.1 La virulence MexEF-OprN dépendante

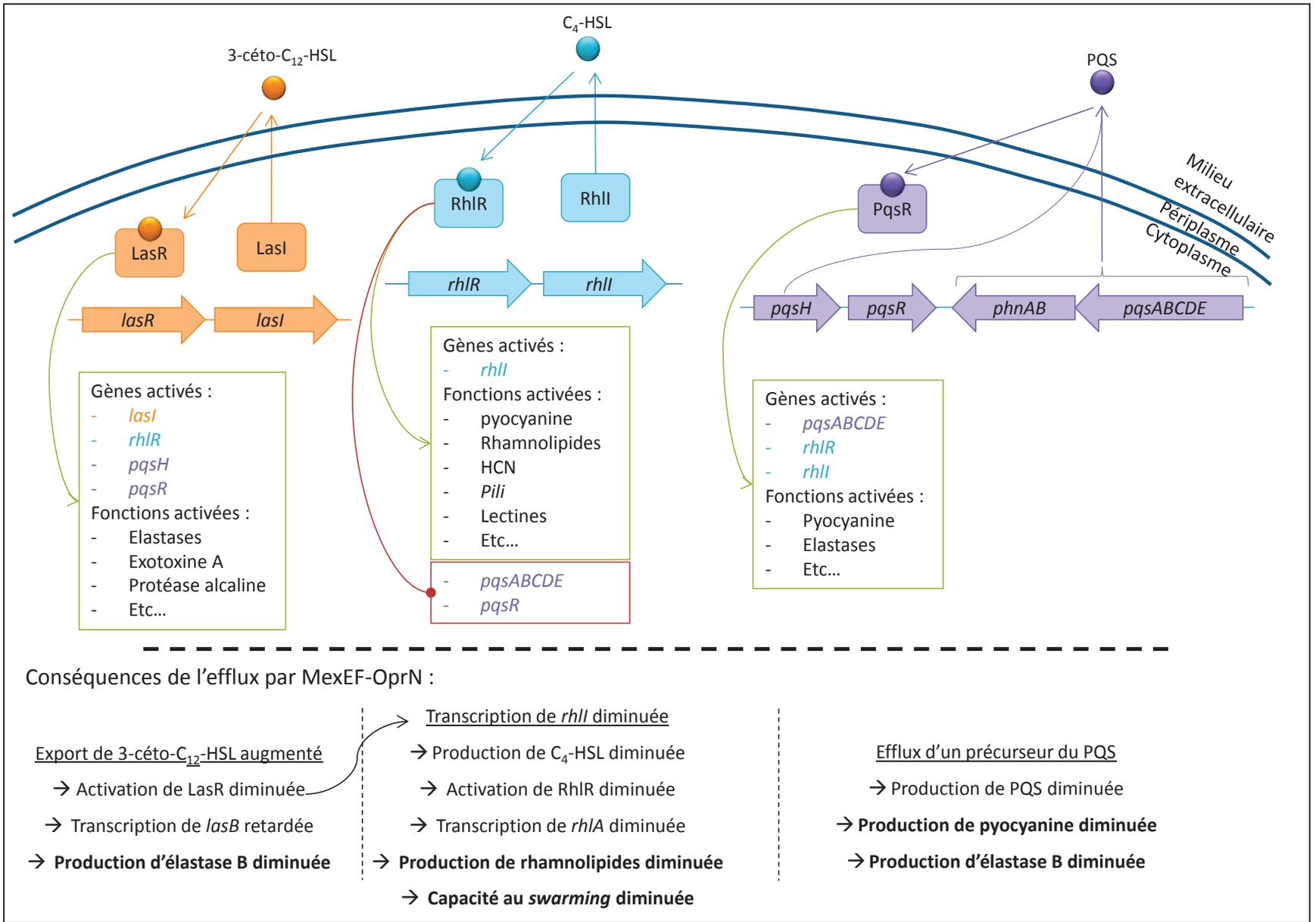
Chez les mutants *nfxC*, les systèmes Las, Rhl et PQS voient leurs relations modifiées en raison de l'activité de la pompe d'efflux MexEF-OprN, ce qui diminue la virulence des bactéries. L'analyse de surnageants de culture a montré l'existence d'une grande quantité de 3-céto-C<sub>12</sub>-HSL chez les mutants *nfxC* (Köhler *et al.*, 2001). Il semblerait que LasI soit produit en plus grande quantité chez un mutant *nfxC* de PA14, aboutissant à une plus grande production de 3-céto-C<sub>12</sub>-HSL (Lamarche & Déziel, 2011). A l'inverse, un mutant *nfxC* de PAO1 (et un mutant PAO1 *nfxC*Δ*mexE*) produit moins de C<sub>4</sub>-HSL extracellulaire, probablement en raison d'une diminution de la transcription de *rhlI* par des mécanismes non décrits (Köhler *et al.*, 2001; Lamarche & Déziel, 2011). Cependant, l'activation de *rhlR* (et donc de *rhlI*) étant sous la dépendance de la 3-céto-C<sub>12</sub>-HSL, l'export accru de cette molécule pourrait être à l'origine de la quantité moindre de C<sub>4</sub>-HSL chez les mutants *nfxC*.

#### 1. Elastases

Les élastases A et B produites par *P. aeruginosa* sont des protéases capables de dégrader ou d'inactiver de nombreuses protéines de l'hôte comme, par exemple, les immunoglobulines et les protéines composant les tissus (Le Berre *et al.*, 2006). Elles sont codées par les gènes *lasA* et *lasB*, eux-mêmes régulés par le QS (Figure 32). Chez les mutants *nfxC* dérivant de PAO1 la production d'élastase B est diminuée en raison d'une expression de *lasB* plus tardive que chez la souche sauvage (Köhler *et al.*, 2001; Olivares *et al.*, 2012). D'après des expériences de RT-qPCR réalisées sur des bactéries en phase stationnaire de croissance, les mutants *nfxC* expriment 2 fois moins *lasB* que la souche parentale dont ils dérivent (Köhler *et al.*, 2001; Olivares *et al.*, 2012). La délétion de l'opéron *mexEF-oprN* lève cette répression, suggérant que la pompe MexEF-OprN exporte une molécule activatrice du gène *lasB* (Tian *et al.*, 2009b).

Figure 32 : Contrôle de la production de virulence par les molécules du QS et conséquences de la surproduction de MexEF-OprN chez *P. aeruginosa* (Jimenez et al., 2012; Köhler et al., 2001; Lamarche & Déziel, 2011; Le Berre et al., 2006; Olivares et al., 2012; Rutherford & Bassler, 2012; Tian et al., 2009a; Tian et al., 2009b). L'expression de l'élastase et des rhamnolipides est sous la dépendance des gènes *lasAB* et *rhlAB* respectivement.

Synthèse bibliographique



## **2. Production de rhamnolipides et swarming**

Les rhamnolipides sont des molécules amphiphiles dont le rôle est de réduire les tensions de surface entre le milieu extérieur et la paroi bactérienne. Ils sont impliqués dans la virulence puisqu'ils permettent à la bactérie une mobilité de type *swarming*. Définie comme la capacité à se déplacer sur une surface semi-solide sous forme de « raft » c'est-à-dire par paquets de cellules, cette mobilité est possible grâce à l'action commune (i) du flagelle de la bactérie, (ii) des rhamnolipides et (iii) des *pili* de type IV (Kearns, 2010).

Chez *P. aeruginosa*, les rhamnolipides sont codés par les gènes *rhlAB* contrôlés par le QS (Kearns, 2010). La transcription de ces gènes est diminuée chez les mutants *nfxC* probablement en raison d'une baisse de l'expression du gène *rhlI*, comme l'indiquent les mesures effectuées grâce à une fusion *lacZ* et par RT-qPCR (Köhler *et al.*, 2001; Tian *et al.*, 2009b). De façon attendue, cet effet est perdu chez un mutant *nfxC* privé de *mexE* indiquant que la surproduction de la pompe MexEF-OprN elle-même est responsable d'un défaut de synthèse de rhamnolipides (Tian *et al.*, 2009b). En effet, les mutants *nfxC* ne forment pas ou peu de dendrites caractéristiques du *swarming* lorsque cultivés sur milieu semi-solide (Köhler *et al.*, 2001).

### **8.2.2 La virulence dépendant de MexT et de MexEF-OprN**

#### **1. Formation de biofilm**

Le mode de vie en biofilm est un mode de vie sessile qui répond à 3 phases : une première étape d'attachement cellulaire à une surface, la formation de micro-colonies et la différenciation en une population enchâssée dans une matrice polymérique. La coloration de cultures au cristal violet a montré que les mutants *nfxC* sont altérés dans ce mode de vie (Lamarche & Déziel, 2011; Ramsey & Whiteley, 2004; Tian *et al.*, 2009b). Toutefois, l'origine de cette déficience reste controversée et semble souche-

dépendante. Chez PAO1, l'attachement à une surface n'est pas restauré chez un mutant *nfxCΔmexE*, ce qui semble indiquer que *mexT* réprime des gènes impliqués dans la formation de biofilm (Tian *et al.*, 2009b). A l'inverse, chez PA14, l'inactivation de *mexE* chez le mutant *nfxC* restaure la capacité à développer ce mode de vie, impliquant cette fois-ci la surproduction de MexEF-OprN et non MexT dans ce phénotype (Lamarche & Déziel, 2011). La sélection de souches déficientes dans la formation de biofilm par insertion aléatoire d'une séquence *Tn5*, a conduit à l'isolement un mutant *nfxC*, altéré dans *mexS* chez PA14 (Ramsey & Whiteley, 2004). Cependant, dans cette étude, le défaut d'attachement initial ne semble pas être causé par MexS mais plutôt par une moindre production de surfactine ; l'implication de MexT ou de MexEF-OprN n'a pas été évaluée.

## **2. Production de pyocyanine**

La pyocyanine est une phénazine produite spécifiquement par *P. aeruginosa*. C'est un pigment bleu redox-actif utilisé par la bactérie comme vecteur d'électrons. Sa production est contrôlée par les systèmes RhlR/C<sub>4</sub>-HSL et PqsR/PQS du QS (Lau *et al.*, 2004). La mesure de la quantité de pyocyanine dans les surnageants de culture a révélé qu'un mutant *nfxC* en produit 20 fois moins que la souche PAO1 dont il dérive. Cet effet est directement lié à l'activité de la pompe MexEF-OprN car il est perdu chez un mutant *mexE* (Köhler *et al.*, 1997b). Cependant, des travaux plus récents montrent que l'inactivation de la pompe ne rétablit pas la production de pyocyanine lorsque le gène *mexT* est surexprimé artificiellement à partir d'un plasmide, laissant envisager cette fois-ci une régulation *via* MexT (Tian *et al.*, 2009b).

### **8.2.3 Les systèmes de sécrétion de type III et VI dépendant de MexT**

Les systèmes de sécrétion de type III (T3SS) et de type VI (T6SS) sont des complexes multi-protéiques qui permettent notamment d'injecter des toxines au sein de cellules

eucaryotes et bactériennes respectivement. *P. aeruginosa* secrète ces exotoxines *via* le T3SS : ExoU ou ExoS, ExoT et ExoY.

L'expression des gènes codant pour la structure du T3SS et ses protéines effectrices est sous la dépendance d'une protéine régulatrice, ExsA (Linares *et al.*, 2005). De façon intéressante, les niveaux d'expression des gènes *exsA*, *exoS*, *pcrV* et *popD* se sont révélés diminués chez un mutant *nfxC* comparativement à la souche sauvage et au mutant *nfxCΔmexE*, un résultat qui indique que le T3SS est sous le contrôle négatif de MexT activé (Olivares *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2009a). Par ailleurs, l'ajout exogène de la protéine ExsA au milieu de culture du mutant *nfxC* a permis de restaurer la production de ExoT et ExoS, ce qui confirme la répression exercée sur *exsA* par MexT (Figure 33) (Linares *et al.*, 2005). De la même façon, la production de ExoS a pu être rétablie à un niveau sauvage basal en inactivant le gène *mexT* à l'aide d'une cassette gentamicine chez un mutant *nfxC* (Jin *et al.*, 2011). Cette régulation se ferait par l'intermédiaire d'une petite protéine de 66 acides aminés, PtrC, dont la région promotrice contient une séquence de fixation de MexT (ATC-N<sub>9</sub>-GAT). PtrC est codée par le gène *PA2486* situé à proximité de *mexT* (*PA2492*) sur le chromosome de PAO1 de *P. aeruginosa*. Son activité de répresseur du T3SS serait activée par MexT (Figure 33) (Jin *et al.*, 2011).

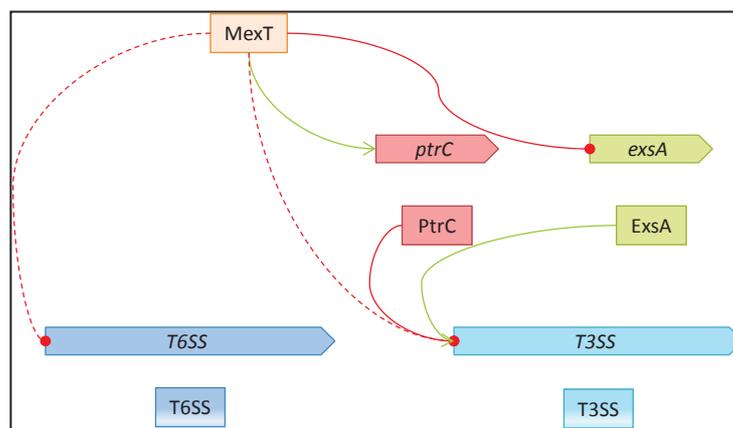


Figure 33 : la régulation des systèmes de sécrétion de type 3 (T3SS) et de type 6 (T6SS) par MexT (Jin *et al.*, 2011).

D'après les résultats d'expériences de RT-qPCR, il semblerait que MexT puisse également réprimer les gènes *hcp1*, *hcp2*, *hcp3* et *clpV1* codant pour les protéines structurales et effectrices de deux des trois systèmes de sécrétion de type VI (HSI-I et HSI-II) (Figure 33). Cependant, MexT étant un activateur transcriptionnel, les auteurs suggèrent que cette répression n'est probablement pas directe et qu'elle pourrait impliquer les deux senseur-kinases RetS et LadS, connues pour réguler à la fois le T3SS et le T6SS (Olivares *et al.*, 2012). Cette déduction est toutefois surprenante, car la régulation impliquant RetS et LadS est antagoniste sur ces deux systèmes de sécrétion et permet à *P. aeruginosa* de réaliser un switch moléculaire d'adaptation entre deux modes de vie différents (infection chronique/infection aiguë) (Moscoso *et al.*, 2011). S'il est avéré, l'effet de MexT sur ces deux systèmes de sécrétion doit par conséquent faire intervenir d'autres intermédiaires.

### 8.3 MODIFICATION DU METABOLISME DES MUTANTS *NFXC*

Comme nous avons pu le voir dans les paragraphes précédents, de nombreuses études montrent que MexT joue un rôle, à la fois dans la résistance et la virulence de la bactérie. Plus rares sont celles indiquant que la surproduction de MexEF-OprN est associée à des modifications du métabolisme ou à la formation de composés toxiques endogènes ou exogènes. Comme mentionné précédemment, une analyse transcriptomique a révélé qu'un gène de détoxification, appelé *xenB*, était surexprimé chez un mutant *nfxC* alors que son expression redevenait basale une fois le gène *mexT* inactivé (Fetar *et al.*, 2011). La surexpression de *mexT* suffit d'ailleurs à elle seule à induire la surexpression de *xenB* (Tian *et al.*, 2009a). L'enzyme XenB aurait un rôle dans la résistance au stress nitreux (Fetar *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2009a).

Des expériences effectuées chez *Salmonella* Typhimurium montrent qu'en conditions de stress nitreux et sans l'enzyme de détoxification principale Hmp, la bactérie

devient auxotrophe pour la cystéine, la valine, la leucine et l'isoleucine (Park *et al.*, 2011). La cystéine, grâce à son groupement thiol capable de réagir avec les groupements NO, protège la cellule vis-à-vis de ce type de stress. Ainsi, la synthèse de cystéine favoriserait la croissance de la bactérie en conditions de stress nitreux (Park *et al.*, 2011). Chez *P. aeruginosa*, l'expression des loci PA2813-PA2812-PA2811 codant pour les composants d'un probable transporteur ABC et une probable glutathion S-transférase semble être directement activée par MexT (Tian *et al.*, 2009a). Cette enzyme, qui permet d'utiliser le S-glutathion (produit par la réduction du glutathion) comme source de carbone pour la synthèse de glutamate, de cystéine et de glycine ([www.kegg.jp](http://www.kegg.jp)), pourrait favoriser la persistance de la bactérie en conditions de stress nitreux.

La cystéine n'est pas le seul acide aminé à jouer un rôle protecteur en cas de stress. Il a été montré que la glycine permettait à la bactérie d'assurer, après décarboxylation oxydative, la synthèse de cyanure d'hydrogène, principalement en conditions de micro-aérophilie ( $O_2 < 5\%$ ) (Blumer & Haas, 2000). Cette réaction, inactivée en aérobiose et en anaérobiose stricte, fournit des électrons et des protons supplémentaires à la chaîne respiratoire. Or, la production de cyanure est importante pour la pathogénicité de la bactérie, en particulier dans le poumon CF, puisqu'elle pourrait l'aider à exclure ou contenir d'autres pathogènes concurrents (Lenney & Gilchrist, 2011). Le régulon de MexT renferme les gènes *hcnA*, *hcnB* et *hcnC* codant pour une HCN synthase (Figure 34). Ces gènes entrent également dans le catabolisme de la glycine, en permettant à la bactérie d'utiliser cet acide aminé comme source de carbone et d'énergie (Lundgren *et al.*, 2013). Au total, 2 études transcriptomiques ont fait le lien entre le métabolisme de la glycine et la surexpression de *mexEF-oprN*. La première a montré que *hcnA* était une cible directe de MexT alors que l'expression de *hcnB* et *hcnC* était dépendante de la pompe MexEF-OprN (Tian *et al.*, 2009a). La

deuxième, réalisée sur un mutant *nfxC* obtenu par insertion d'un transposon dans le gène *mxtR*, indique que *hcnA* est sous-exprimé. Puisque MxtR est capable de réguler MexT, c'est ce dernier qui semble à l'origine de la répression de *hcnA* (Zaoui *et al.*, 2012).

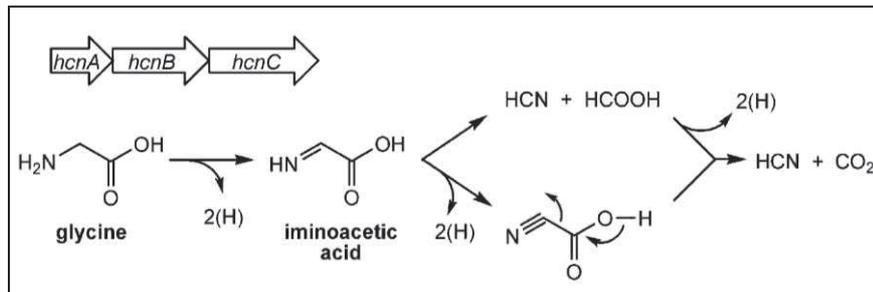


Figure 34 : Le cyanure d'hydrogène (HCN) est synthétisé à partir de la glycine par l'hydrogène cyanide synthase (HCN synthase) codée par l'opéron *hcnABC* (Gross & Loper, 2009).

Pour finir, les opérons *nir*, *nor*, *nos* et *fhp*, codant pour différentes protéines de la chaîne respiratoire des nitrates sont surexprimés chez un mutant *nfxC* (Olivares *et al.*, 2014). Habituellement, ces protéines sont mises en jeu lorsque la concentration en oxygène est faible. Une hypothèse serait que le fonctionnement de la pompe perturberait le gradient électrochimique de la membrane cytoplasmique au point de requérir la respiration des nitrates et des nitrites. Le fait qu'un mutant *nfxC* soit supplanté par une souche sauvage en co-culture dans un milieu privé de nitrates semble aller dans ce sens (Olivares *et al.*, 2014).

## 9 LES MUTANTS *NFXC* DANS LES SOUCHES CLINIQUES

Il existe peu de travaux caractérisant des mutants *nfxC* cliniques. Quelques études ont recherché sans succès ces mutants parmi des collections importantes de souches cliniques CF et non-CF, sélectionnées en raison de leur résistance ou de leur sensibilité à divers antibiotiques (Henrichfreise *et al.*, 2007; Quale *et al.*, 2006; Walsh & Amyes, 2007; Wolter *et al.*, 2004b; Xavier *et al.*, 2010). Toutefois, ces mutants sont

difficiles à identifier phénotypiquement, le seul critère fiable étant la quantification des transcrits de l'un des gènes de l'opéron *mexEF-oprN*. D'ailleurs, certaines études ont rapporté l'existence de mutants *nfxC* dans des souches cliniques, alors que les critères d'identification étaient discutables : un *cut-off* inférieur à 100 fois le niveau d'expression de la souche de référence PAO1 (Poonsuk *et al.*, 2014) ou l'utilisation exclusive de techniques semi-quantitatives comme l'évaluation de la présence de OprN dans la membrane externe (Yi *et al.*, 2014). De plus, le choix de la souche sauvage, utilisée comme référence pour évaluer la surexpression de *mexE* en RT-qPCR, peut faire varier la quantification relative des transcrits de plus de 10 fois. En effet, une étude réalisée sur 529 souches non sensibles au doripénème a révélé qu'en utilisant PAO1 comme souche de référence, seuls 2 isolats surexprimaient *mexE* entre 5 et 10 fois (Castanheira *et al.*, 2014a). A l'inverse, en utilisant un lot de souches cliniques sensibles aux substrats de la pompe comme témoins négatifs, 89,5 % des souches surexprimaient *mexE* au moins 5 fois (parmi lesquelles 26,1 % surexprimaient *mexE* plus de 100 fois) (Castanheira *et al.*, 2014a). Ainsi, seules quelques études ont identifié de façon fiable des mutants *nfxC* dans des souches CF et non-CF (Jalal *et al.*, 2000; Llanes *et al.*, 2011; Oh *et al.*, 2003; Terzi *et al.*, 2014). Henrichfreise et coll. rapportent l'existence d'une substitution dans MexS (G<sub>68</sub>S, F<sub>273</sub>I) ou dans MexT (V<sub>199</sub>A) chez 3/22 souches multirésistantes (Henrichfreise *et al.*, 2007). Cependant cette étude ne donnant pas d'indication sur les niveaux d'expression de la pompe, il est difficile de faire le lien entre ces substitutions et l'activité de MexEF-OprN. Enfin, au sein d'une collection de 85 souches non-CF sélectionnées en raison de leur faible résistance à la ciprofloxacine (CMI comprise en 0,25 et 2 µg/mL), 10 mutants *nfxC* ont été identifiés (Llanes *et al.*, 2011). Vingt pourcent de ces isolats présentaient des substitutions d'acide aminé dans MexT (2/10 isolats) ou dans MexS (5/10 souches). Au final, lorsque nous avons débuté notre travail de thèse, la signification des variations de séquence de MexT et MexS chez les souches cliniques

était inconnue à l'exception, peut-être, de la substitution A<sub>155</sub>V de la souche PA7 (Morita *et al.*, 2015). Nous nous sommes donc attachés à caractériser de façon plus approfondie des mutants *nfxC* provenant de patients hospitalisés. En dépit de leur déficit supposé en facteurs de virulence, les mutants *nfxC* cliniques proviennent de sites très variés (sangs, voies respiratoires, peau, urines...). Ils sont isolés de patients colonisés ou infectés, CF ou non-CF (Castanheira *et al.*, 2014a; Fukuda *et al.*, 1995; Llanes *et al.*, 2011). Ces observations semblent indiquer une hétérogénéité phénotypique, peut être en rapport avec la nature de leur mutation *nfxC*. C'est cette question que nous avons également cherché à exploiter à travers ce travail de thèse.

## *C. Resultats*

---

## 1 ARTICLE 1

**Complexité des mécanismes de résistance à l'imipénème chez des souches de *Pseudomonas aeruginosa* isolées dans les services de soins intensifs (GESPAR).**

Damien Fournier, Charlotte Richardot, Emeline Müller, Marjorie Robert-Nicoud, Catherine Llanes, Patrick Plésiat et Katy Jeannot

Publié dans *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* en avril 2013.

## 1.1 RÉSUMÉ

La prise en charge et la prévention des infections à *P. aeruginosa* sont capitales dans les services de soins intensifs. Toutefois, en raison de la forte pression antibiotique, de nombreuses souches résistantes, y compris aux carbapénèmes, sont fréquemment isolées en France. Le mécanisme principal à l'origine de cette résistance est une inactivation du gène *oprD* par des mutations ou l'insertion d'une IS ; la répression du gène est moins fréquente, mais tout aussi efficace. En effet, dans tous les cas, la « perte » de la porine OprD conduit à une augmentation de 4 à 16 fois de la CMI des carbapénèmes. Par ailleurs, la bactérie peut acquérir par transfert de gènes des nouvelles  $\beta$ -lactamases capables d'hydrolyser ces antibiotiques.

Le but de cette étude était d'évaluer la prévalence des souches produisant des carbapénémases dans une collection de 109 isolats issus de 26 centres de soins intensifs français, et sélectionnés pour leur CMI à l'imipénème supérieure à 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Parmi ces souches, 7 (6,5%) produisent des carbapénémases de type VIM-1 (n=1), VIM-2 (n=4), VIM-4 (n=1) et IMP-29 (n=1). La grande majorité d'entre elles (n=94, 86,2%) résistent à l'imipénème en raison de la « perte » de la porine OprD, du fait de mutations ou de l'insertion d'une IS dans le gène *oprD*, voire dans son promoteur. Une souche présente une délétion de 3 acides aminés au sein de la séquence signal de la porine, empêchant probablement son adressage à la membrane externe. Parmi les 13 souches restantes, toutes sous-expriment le gène *oprD*, connu pour être co-régulé avec les systèmes d'efflux CzcCBA, MexEF-OprN et MexXY/OprM. Le séquençage des gènes régulateurs de ces systèmes a mis en évidence (i) des substitutions d'acides aminés dans ParR ou ParS, les composants du TCS régulant *mexXY* (chez 9/13 isolats), (ii) des substitutions dans MexS, potentiellement capables d'engendrer la surexpression de *mexEF-oprN* (3/13) et (iii) une substitution au sein de CzcR, le régulateur de *czcCBA* (1/13). La mesure par RT-qPCR des niveaux de transcrits a

confirmé la surexpression de *mexY*, de *mexE* mais pas de *czcC*. En effet, le promoteur de ce dernier est interrompu par une IS.

Au final, ce travail a montré que les mécanismes de résistance développés par les souches de *P. aeruginosa* isolées dans les services de soins intensifs sont multiples et permettent à la bactérie de s'adapter très rapidement à la pression exercée par les carbapénèmes.

## 1.2 CONTRIBUTION AU TRAVAIL

Dans cette étude, j'ai réalisé les extractions et les dosages de protéines de même que les immunoblots (migration, hybridation et analyse), ce qui a permis d'apprécier la quantité de porine OprD dans la membrane externe des souches cliniques. J'ai, par ailleurs, participé à l'analyse des résultats de séquençage des gènes *oprD* et aux expériences de RT-qPCR (PCR en temps réel et analyse des données) sur les gènes *rpsL*, *oprD*, *mexE*, *mexY*, *PA1797*, *mexB*, *czcC* et *czcR*.

## 1.3 TEXTE DE L'ARTICLE

## Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*

Damien Fournier, Charlotte Richardot, Emeline Müller, Marjorie Robert-Nicoud, Catherine Llanes, Patrick Plésiat and Katy Jeannot\*

Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Besançon, Besançon, France

\*Corresponding author. Tel: +33-3-81-66-82-86; Fax: +33-3-81-66-89-14; E-mail: katy.jeannot@univ-fcomte.fr

Received 11 December 2012; returned 31 December 2012; revised 15 February 2013; accepted 24 February 2013

**Background:** *Pseudomonas aeruginosa* can become resistant to carbapenems by both intrinsic (mutation-driven) and transferable ( $\beta$ -lactamase-based) mechanisms. Knowledge of the prevalence of these various mechanisms is important in intensive care units (ICUs) in order to define optimal prevention and therapeutic strategies.

**Methods:** A total of 109 imipenem-non-susceptible (MIC >4 mg/L) strains of *P. aeruginosa* were collected in June 2010 from the ICUs of 26 French public hospitals. Their resistance mechanisms were characterized by phenotypic, enzymatic, western blotting and molecular methods.

**Results:** Single or associated imipenem resistance mechanisms were identified among the 109 strains. Seven isolates (6.4%) were found to produce a metallo- $\beta$ -lactamase (one VIM-1, four VIM-2, one VIM-4 and one IMP-29). Porin OprD was lost in 94 (86.2%) strains as a result of mutations or gene disruption by various insertion sequences (ISPa1635, ISPa1328, IS911, ISPs1, IS51, IS222 and ISPa41). Thirteen other strains were shown to be regulatory mutants in which down-regulation of *oprD* was coupled with overexpressed efflux pumps CzcCBA ( $n=1$ ), MexXY ( $n=9$ ) and MexEF-OprN ( $n=3$ ). The lack of OprD was due to disruption of the *oprD* promoter by ISPsy2 in one strain and alteration of the porin signal sequence in another.

**Conclusions:** Imipenem resistance in ICU *P. aeruginosa* strains may result from multiple mechanisms involving metallo- $\beta$ -lactamase gene acquisition and genetic events (mutations and ISs) inactivating *oprD*, turning down its expression while increasing efflux activities or preventing insertion of porin OprD in the outer membrane. This diversity of mechanisms allows *P. aeruginosa*, more than any other nosocomial pathogen, to rapidly adapt to carbapenems in ICUs.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, imipenem resistance, porin OprD, carbapenemases, active efflux

### Introduction

Development of carbapenem resistance is common in *Pseudomonas aeruginosa*, especially in intensive care units (ICUs), where the selective pressure exerted by antibiotics on bacterial populations is strong.<sup>1</sup> This well-known situation is mostly due to the occurrence of mutations or insertion sequences (ISs) inactivating the gene that codes for porin OprD, the specific portal of entry for carbapenems into this organism (for a recent review see Lister *et al.*<sup>2</sup>). The reduced outer membrane permeability that results from OprD loss usually causes a 4-fold to 16-fold increase in the MICs of all the carbapenem molecules, including imipenem, meropenem and doripenem, in strains with inducible or constitutive *ampC*

expression.<sup>3</sup> In addition to this very prevalent mechanism, *P. aeruginosa* may collect foreign genes encoding Ambler class A (e.g. GES and KPC types), class B (e.g. AIM, GIM, IMP, NDM, SPM and VIM types) or class D (e.g. OXA-198)  $\beta$ -lactamases able to hydrolyse carbapenems to varying degrees.<sup>4–7</sup> Over the last decade an ever-growing number of *P. aeruginosa* isolates producing metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) (class B) have been reported from many countries, suggesting that these enzymes could become the predominant cause of carbapenem resistance in the near future. However, the resistance patterns to individual carbapenems may vary greatly among clinical strains as a result of complex interplay between enzymatic and non-enzymatic mechanisms, some of which still await characterization.<sup>2</sup> For instance, MICs of meropenem and doripenem may be influenced

by the overproduction of MexAB-OprM, a multidrug efflux system able to extrude all these molecules except imipenem.<sup>8–12</sup>

Little is known about the genetic events leading to down-regulation of *oprD* expression and carbapenem resistance in clinical *P. aeruginosa* isolates. The transcription of this gene, driven by the distinct promoters P1 and P2, is subject to complex regulation.<sup>2</sup> Indeed, although the expression of *oprD* is stimulated when bacteria are grown in the presence of some substrates (e.g. arginine), it is repressed in some *in vitro* mutants overproducing the active efflux system MexEF-OprN, MexXY/OprM or CzcCBA.<sup>2</sup> These multispecific pumps, which belong to the resistance–nodulation–cell division family of transporters, can export various antibiotic substrates including fluoroquinolones (MexEF-OprN, MexXY/OprM), aminoglycosides, tetracyclines, macrolides,  $\beta$ -lactams (MexXY/OprM) and heavy metals such as zinc, cadmium and cobalt (CzcCBA).<sup>13–15</sup> It is now established that the inverse regulation of OprD and MexEF-OprN depends on MexT.<sup>16,17</sup> This LysR-type transcriptional regulator behaves both as an activator of operon *mexEF-oprN* and a repressor of *oprD* in *nfxC* mutants carrying mutations in *mexS*, a gene encoding a probable quinone oxidoreductase.<sup>18</sup> MexT divergent regulatory effects on *mexEF-oprN* and *oprD* were also observed in a laboratory mutant from which the gene for master regulator AmpR had been deleted, though this was not coupled with an increased resistance to carbapenems.<sup>19</sup> Recent data from our laboratory demonstrate that mutations in the two-component regulatory system ParRS may result in down-regulation of *oprD* expression as well, while increasing that of *mexXY* and of lipopolysaccharide modification operon *arnBCADTEF-ugd*.<sup>20</sup> Such multidrug-resistant mutants have been named *agrW2*. Finally, Perron *et al.*<sup>15</sup> reported that mutations in another signal transduction system, CzcRS, which positively controls the expression of operon *czcCBA*, were associated with low transcription levels of *oprD* and increased carbapenem MICs. However, the functional link coupling the OprD uptake pathway to efflux systems remains unclear because these diffusion/transport processes do not seem to have substrates in common. In contrast to OprD-deficient isolates exhibiting mutations or IS in the *oprD* promoters,<sup>2</sup> regulatory mutants with affected OprD production as a result of increased efflux have not clearly been identified in the clinical setting.

This study was initially designed to establish the prevalence of carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamases in imipenem-non-susceptible ICU strains of *P. aeruginosa*, as epidemiological data are lacking regarding this important issue. Our attention was subsequently drawn by a subpopulation of bacteria exhibiting full-length OprD porins (as deduced from *oprD* genes showing an open reading frame of expected length) and overproducing the efflux pumps MexEF-OprN, MexXY/OprM and CzcCBA, respectively. Here, we show that such regulatory mutants can be isolated from severely ill patients and deserve more attention regarding their pathogenicity and the conditions of their emergence.

## Materials and methods

### Bacterial strains

All the non-duplicate ICU isolates of *P. aeruginosa* showing non-susceptibility to imipenem (MIC >4 mg/L; EUCAST breakpoints) were prospectively collected by the laboratories of 26 French public hospitals

(GESPAR Group) during the month of June 2010. Members of the GESPAR Group (Groupe d'Etude de la Sensibilité de *Pseudomonas Aeruginosa* en Réanimation) are listed in the Acknowledgements section. The strains ( $n=109$ ) were mostly isolated from respiratory specimens (60%), catheters (9%), urine (9%) and blood cultures (5.5%). PAO1 was used as the wild-type reference strain in drug susceptibility tests and as a comparator in reverse transcription real-time quantitative PCR (RT-qPCR) experiments. All the strains were routinely cultured either in Mueller–Hinton broth (MHB; Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) or on Mueller–Hinton agar plates at 35°C, supplemented with appropriate antibiotics where necessary.

### Susceptibility testing

MICs of indicated antibiotics were determined in two independent experiments by the microbroth dilution method with microplates containing specifically designed drug panels (Sensititre; Thermo Fisher Scientific). The microplates were inoculated with  $10^5$  cfu/mL in calcium-adjusted MHB (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) and incubated at 35°C for 18 h as recommended.<sup>21</sup> Strains were considered as susceptible, intermediate or resistant to individual antimicrobials according to the current EUCAST breakpoints indicated in Table 2 (<http://www.eucast.org>).

### Detection of carbapenemase-producing isolates

The whole bacterial collection was screened for MBL production by a double-disc synergy test using EDTA as an inhibitor of enzymatic activity.<sup>22</sup> An enlargement ( $\geq 3$  mm) of the inhibition zone around an imipenem disc (10  $\mu$ g, Bio-Rad) and/or a ceftazidime disc (30  $\mu$ g, Bio-Rad) in the direction of a disc loaded with 10  $\mu$ L EDTA 0.5 mM, pH 8.0 was considered as a positive result. In parallel, the 109 strains were assayed spectrophotometrically (Uvikon, Serlabo®) for imipenem hydrolysis with cell sonicates prepared from 20-fold concentrated log-phase cultures in MHB supplemented with 50 mg/L of cefoxitin, a strong inducer of the expression of intrinsic cephalosporinase AmpC and thus of potential extended-spectrum AmpC (ESAC) enzymes.<sup>23</sup> Degradation of imipenem at 100  $\mu$ M final concentration in 66 mM sodium phosphate (pH 7.0) was recorded at 299 nm according to standard procedures.<sup>24</sup> Strains producing enzymes VIM-1 and VIM-2 were used as positive controls.

### Gene amplification and sequencing

The carbapenemase-encoding genes were amplified by PCR and sequenced in all ceftazidime-resistant strains, including those exhibiting imipenem-hydrolysing activity spectrophotometrically. The specific primers used to amplify the genes coding for GES-, KPC-, IMP-, VIM-, GIM-, SPM-, NDM-type  $\beta$ -lactamases are presented in Table 1. The presence of genes coding for PER-, VEB-, TEM-, SHV-, BEL- and OXA-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) was also investigated in the ceftazidime-non-susceptible isolates, as previously reported.<sup>25</sup> The PCR amplicons were sequenced on both strands by using the BigDye Terminator kit (PE Applied Biosystems) in an ABI Prism 3100 DNA sequencer (PE Applied Biosystems). The resulting sequences were compared with those deposited at GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>). In all the clinical isolates the porin *oprD* gene, along with its promoter region (starting –107 nt relative to the start codon), was amplified by PCR and sequenced by using specific primers (Table 1). The resulting sequences were compared with those of reference strains PAO1, PA14, LESB58 and PP2, a clinical LESB58 derivative  $\geq 8$ -fold more susceptible to meropenem than imipenem.<sup>26</sup>

### RT-qPCR experiments

Specific gene expression was measured by RT-qPCR as described previously.<sup>27</sup> Briefly, 2  $\mu$ g of total RNA were treated with ImpromII reverse

transcriptase as specified by the manufacturer (Promega). The resulting cDNA fragments were quantified in a Rotor Gene RG6000 real-time PCR instrument (Qiagen) by using fluorescent dye SybrGreen (Fast SybrGreen kit, Qiagen) and primers, as already reported for genes *oprD*, *mexE*, *mexB*,<sup>27</sup> *mexY*, *PA1797*,<sup>20</sup> *czcR*, *czcC* and *copR*.<sup>28</sup> The mRNA levels were normalized in each strain to that of housekeeping gene *rpsL* and

expressed as ratios to the values of strain PAO1 (by definition set at 1). The RT-qPCR data presented here are means of at least two independent experiments. Well-characterized mutants overexpressing *mexEF-oprN* (PAO7H), *mexAB-oprM* (PT629), *mexXY* (CMZ091) and *PA1797* (PAOW2) were used as positive controls in order to assess the involvement in resistance of efflux mechanisms MexEF-OprN, MexAB-OprM and MexXY/OprM, respectively.<sup>20,27,29</sup> Reference strain PAO1 pre-treated with sublethal concentrations of ZnCl<sub>2</sub> (300 μM) served as a positive control to assess the overexpression of genes *czcR* and *czcC* as reported by Caille et al.<sup>28</sup>

**Table 1.** Primers used in the study

Primer	Sequence (5'→3')	Amplification and sequencing
GES1A	ATGCGCTTCATTACGCAC	<i>bla<sub>GES</sub></i> genes <sup>57</sup>
GES1B	CTATTTGTCGGTGCTCAGG	
SeqKPC-Fw1	ATCGCCGCTAGTCTGCTG	<i>bla<sub>KPC</sub></i> genes (this study)
SeqKPC-Rv2	CGTTGACGCCCAATCC	
SqVIM1-Fw1	TGTTAAAAGTTATTAGTAGTTTATTG	<i>bla<sub>VIM-1</sub></i> -type genes (this study)
SqVIM1-Rv2	ACTGAGCGATTTTGTGTGC	
SqVIM2-Fw1	TGTTCAAACCTTTGAGTAAGTTATTG	<i>bla<sub>VIM-2</sub></i> -type genes (this study)
SqVIM2-RV2	ACTGAGCGATTTGTGTGC	
IMP2010-Fw	GTATATGTCATACWTCGTT	<i>bla<sub>IMP</sub></i> genes (this study)
IMP2010-Rv1	GCCAAGCTTCTAAATTTGC	
IMP2010-Rv2	ACCAGTTTTGCMTTACCATA	<i>bla<sub>SPM</sub></i> genes <sup>58</sup>
SPM-Fw	CTGCTTGGATTATGGGCGC	
SPM-Rv	CCTTTCCGCGACCTTGATC	<i>bla<sub>GIM</sub></i> genes <sup>25</sup>
GIM-A	GGAGTATATCTTCATACCTCC	
GIM-B	TTCCAACCTTGCATGCCCC	<i>bla<sub>NDM</sub></i> genes <sup>59</sup>
NDM-1 F	GTCTGGCAGCACACTTCTTA	
NDM-1 R	TAGTGCTCAGTGTCCGCATC	<i>oprD</i> genes (this study)
OprD1	CCAAGAAACACTGCGTGCTA	
OprD2	GGGGTGTTCGCAGAGTAA	promoter region of <i>oprD</i> (this study)
OprDseq1	CCTGCGTAGGTGGCATAGAG	
OprDseq2	TCCAAGACCATGCTGAAGTG	
SqpromD1	CAATTTGTGCACGGAGTTTG	
SqpromD2	GAGCTTCAGGCCAGGTAG	

### Immunodetection of OprD

Bacterial membranes were isolated, subjected to SDS-PAGE and analysed by western blotting with OprD-specific polyclonal antiserum (diluted 1:10000), as reported previously.<sup>30</sup>

### Genotyping experiments

Clondiag® chips (*P. aeruginosa* genotyping kit, Alere), which allow the identification of 14 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the core genome, were used to genotypically compare the 109 selected isolates. As previously described, the combination of SNPs allows the assignment of a genetic fingerprint (referred to by a hexadecimal code) to each strain.<sup>31</sup>

### Genotyping by multilocus sequence typing (MLST)

Determination of the sequence types (ST) of the most represented clones was performed according to the protocol of van Mansfeld et al.<sup>32</sup> by using the *P. aeruginosa* MLST web site (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>).

## Results

### Features of the selected ICU strains

One hundred and nine imipenem-non-susceptible *P. aeruginosa* isolates were prospectively collected from ICU patients in 26

**Table 2.** Drug susceptibility rates of the 109 clinical isolates of *P. aeruginosa*

Antibiotic	Number of isolates at indicated MIC (mg/L) <sup>a</sup>														Breakpoints <sup>b</sup>	Percentage susceptible	MIC <sub>50</sub> /MIC <sub>90</sub> (mg/L)
	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024			
Ticarcillin							<b>3<sup>c</sup></b>	<b>14</b>	18	22	21	12	3	16 <sup>c</sup>	16/16	15.6	64/>1024
Ceftazidime				<b>10</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	15	6	7	9	7 <sup>d</sup>			8/8	59.6	8/128
Aztreonam			<b>4</b>	<b>5</b>	16	5	25	19	20	8	3	2	2 <sup>d</sup>		1/16	8.3	8/64
Imipenem							37	51	15	1	0	5 <sup>d</sup>			4/8	0	16/32
Meropenem		<b>2<sup>c</sup></b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>17</b>	26	31	13	6	3	5 <sup>d</sup>				2/8	22.9	8/32
Doripenem		<b>3<sup>c</sup></b>	<b>4</b>	<b>6</b>	22	37	24	6	1	1	5 <sup>d</sup>				1/4	11.9	4/16
Amikacin				<b>2<sup>c</sup></b>	<b>16</b>	<b>34</b>	<b>33</b>	8	7	4	3	2 <sup>d</sup>			8/16	78.0	8/32
Tobramycin		<b>4<sup>c</sup></b>	<b>32</b>	<b>24</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	1	2	2	17	22 <sup>d</sup>				4/4	59.6	8/>128
Ciprofloxacin	<b>13<sup>c</sup></b>	<b>15</b>	<b>10</b>	8	7	3	7	46 <sup>d</sup>							0.5/1	34.9	1/>16
Colistin			<b>6</b>	<b>71</b>	<b>27</b>	<b>2</b>	3								4/4	97.2	1/2

<sup>a</sup>The shaded areas correspond to the resistant strains; the susceptible strains are indicated in bold font.

<sup>b</sup>Breakpoints according to EUCAST (susceptible ≤/resistant>).

<sup>c</sup>MIC less than or equal to the indicated value.

<sup>d</sup>MIC greater than or equal to the indicated value.

French hospitals over a 1 month period (June 2010). Analysis of these strains with Clondiag<sup>®</sup> chips discriminated 48 SNP patterns with 27, 9, 7, 1, 1, 1, 1 and 1 patterns being represented by 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9 and 17 isolates, respectively. In most cases the clonally related isolates were recovered from the same hospital or from hospitals located in a same region. The most represented clones OC2E ( $n=6$ ), E469 ( $n=7$ ), 2C1A ( $n=9$ ) and F469 ( $n=17$ ) were found to belong to ST395, ST298, ST175 and ST235, respectively. ST175 (serotype O:4) and ST235 (serotype O:11) are widespread international clones.<sup>33,34</sup> In agreement with this, F469 was traced in 12 hospitals (see Table S1 for complete data, available as Supplementary data at JAC Online). As indicated in Table 2, all the strains were intermediate or resistant to imipenem, but 22.9% and 11.9% remained susceptible to meropenem and doripenem, respectively, according to the current EUCAST breakpoints. The latter two agents showed similar MIC distributions. Of the 109 isolates 7.3% were susceptible to all the  $\beta$ -lactams tested except carbapenems, and 59.6% were susceptible to ceftazidime. PCR experiments performed on the ceftazidime-resistant population ( $n=44$ ) demonstrated the presence of genes coding for MBL in seven strains and for ESBLs (PER-1,  $n=1$ ; GES-9,  $n=1$ ; VEB-1a,  $n=1$ ; OXA-19,  $n=1$ ) in four other strains. Genes  $bla_{VIM-2}$  and  $bla_{GES-1}$  coexisted in a single isolate, NANC10. Susceptibility rates to ciprofloxacin and amikacin were 34.9% and 78%, respectively. Finally, among the three strains resistant to colistin (MIC=8 mg/L), only one (CRE05) fitted with the definition of pandrug resistance.<sup>35</sup>

### Prevalence of carbapenemases

As indicated above, seven isolates (6.4%) from five hospitals were found to harbour genes encoding a class B MBL, namely VIM-1 ( $n=1$ ), VIM-2 ( $n=4$ ), VIM-4 ( $n=1$ ) or IMP-29 ( $n=1$ ). Genotypic analysis of the VIM-2-producing strains showed that three from the same hospital were clonally related. Interestingly, all of the seven MBL-producing strains could be detected phenotypically by the imipenem-EDTA ( $n=7$ ) and/or ceftazidime-EDTA ( $n=6$ ) double-disc synergy test. ESBL GES-1 masked the ceftazidime-EDTA synergy in strain NANC10. Despite extensive PCR screening, none of the ICU strains appeared to harbour genes coding for class A carbapenemases. Similarly, no evidence of

imipenem-hydrolysing AmpC variants (ESAC) was obtained by using UV spectrophotometry and concentrated cell sonicates (data not shown). By contrast, all the MBL-producing strains were strongly positive with this assay.

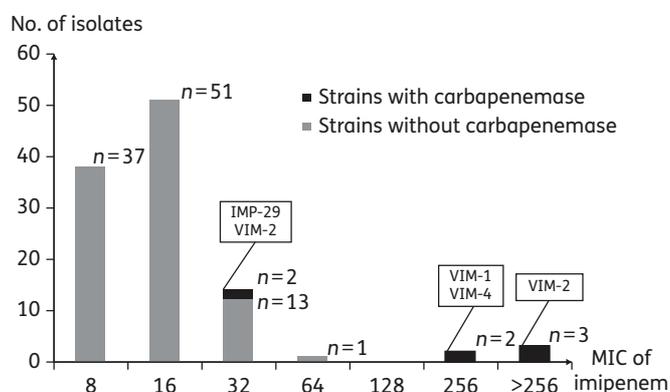
MBL-producing strains exhibited high levels of resistance to ticarcillin (MIC  $\geq 512$  mg/L) and ceftazidime ( $\geq 64$  mg/L). While five of the seven isolates were highly resistant to the three carbapenems tested (MIC  $\geq 128$  mg/L), two displayed susceptibility levels to imipenem similar to those of some carbapenemase-negative strains (MIC=32 mg/L) (Figure 1). One of these isolates (BES01) produced IMP-29, an enzyme related to IMP-8 with greater activity towards meropenem and doripenem (MIC=64 mg/L) than imipenem.<sup>36</sup> The other strain (NANC10) was found by RT-qPCR to express the  $bla_{VIM-2}$  gene 5-fold less than the other isolates positive for VIM-2.

### Mutants with disrupted oprD genes

Qualitative or quantitative alterations of porin OprD are well-known causes of resistance to carbapenems in clinical *P. aeruginosa* isolates.<sup>2</sup> To gain insight into the contribution of this specific uptake pathway to the resistance of the ICU isolates, we amplified and sequenced the *oprD* genes in the carbapenemase-positive ( $n=7$ ) and carbapenemase-negative ( $n=102$ ) bacteria. Despite repeated attempts and the use of various pairs of primers, the genes from five strains (including one positive for VIM-4) could not be amplified, strongly suggesting either large deletions or insertions in the genomic region carrying *oprD* (data not shown). Gene sequence analysis of the 104 remaining strains allowed their classification into three groups. A first group of 89 (85.6%) isolates, including three MBL producers, was found to contain single point mutations, nucleotide insertions or deletions generating frameshifts or premature stop codons in the *oprD* gene, leading to its inactivation. In 9 of these 89 isolates the gene was disrupted by an IS. Some of the elements identified, such as ISPa1635 ( $n=1$ ) and ISPa1328 ( $n=3$  clonally related strains from distantly located hospitals), have already been reported to cause imipenem resistance.<sup>37</sup> Other IS initially characterized in *Shigella dysenteriae* (IS911,  $n=1$ ), *Pseudomonas stutzeri* (ISPs1,  $n=1$ ), *Pseudomonas savastanoi* (IS51,  $n=1$ ) as well as *P. aeruginosa* (IS222,  $n=1$ ; ISPa41,  $n=1$ ) also inactivated *oprD* in the ICU isolates. Only a few strains exhibited identical mutations or IS, even within predominant clones, indicating that imipenem resistance emerged mainly independently in the different hospitals.

### Mutants with wild-type or variant OprD porins

In a second group of seven strains (6.7%), including one MBL-positive *P. aeruginosa* (NANC10), the predicted amino acid sequence of OprD was identical to that of functional porins from reference strains PAO1 ( $n=1$ ), PA14 ( $n=1$ ) and LESB58 ( $n=5$ ). The third group of eight isolates (7.7%) exhibited amino acid variations (up to three) in OprD compared with wild-type reference strains. BES04, ETI02 and TOUL04 produced chimeric (mosaic) proteins combining sequences from PAO1 and PA14. In a recent paper, Ocampo-Sosa *et al.*<sup>38</sup> demonstrated that such mosaic porins are functional and may be found in carbapenem-susceptible strains (porin types defined as T1-II and T1-IIa). More importantly, three amino acids (L<sub>11</sub>, A<sub>12</sub> and V<sub>13</sub>) were missing in the signal sequence of OprD in TOUL04.



**Figure 1.** MIC (mg/L) distribution of imipenem according to the resistance mechanism involved.

GAR05 differed from LESB58 by the mutation K<sub>268</sub>Q in porin loop L6, while the clonally related VIM-4-positive strains PBI06 and PBI10 contained the variation K<sub>399</sub>N in transmembrane stretch TMS 15, according to the crystal structure established by Biswas et al.<sup>39</sup> CLI03 differed from strain PP2 by the mutation H<sub>288</sub>D located in TMS 13. Finally, GAR02 produced a chimeric OprD deriving from LESB58 and PP2 with an additional A<sub>267</sub>P mutation in L6.

### Porin oprD expression

RT-qPCR experiments demonstrated decreased expression of *oprD*, from 3-fold to 100-fold, in all the strains from groups 2 and 3 as compared with PAO1 (Table 3). In nine strains (BES04, ETI02, GAR01, GAR02, GAR04, GAR05, PAP01, VAL02, VES03) the poor *oprD* expression correlated with absent or very low amounts of porin in the outer membrane (immunoblots shown in Figure 2). Interestingly, in the other six strains (CLI03, NANC05, NANC10, PBI06, PBI10, TOUL04) no or very faint OprD bands could be detected on immunoblots despite some degree of gene expression (from 0.1 to 0.3 times that of PAO1). In TOUL04, alteration of the signal sequence is predicted to prevent the porin from translocating across the cytoplasmic membrane. As mentioned earlier, strains CLI03, PBI06 and PBI10 produced single amino acid variants from PP2 and

LESB58, respectively (Table S2, available as Supplementary data at JAC Online). The corresponding substitutions (H288D, K399N) were localized by the PyMOL software outside the pore in the  $\beta$ -sheets of the porin barrel presumed to interact with the peptidoglycan or outer membrane lipids. Whether such mutations impair the transport to or the insertion of OprD into the outer membrane needs to be confirmed. Finally, as NANC05 and NANC10 produce wild-type LESB58 OprD, we performed additional western blotting experiments with whole-membrane extracts. The protein was detected in these extracts but not in the outer membrane subfraction, thereby suggesting a deficient transport across the inner membrane (data not shown).

### Mechanisms associated with oprD down-regulation

Various mutational events may be responsible for stable down-regulation of *oprD* expression. Indeed, imipenem resistance has been associated with mutations that: (i) inactivate at least one of the *oprD* promoters;<sup>40</sup> (ii) activate regulatory proteins involved in resistance to heavy metals,<sup>15,28</sup> or (iii) are implied in the regulation of multidrug efflux pumps MexEF-OprN and MexXY<sup>16,18,20</sup> in *in vitro*-selected mutants.

Sequencing of the genomic region upstream of *oprD* in the 15 clinical strains of groups 2 and 3 revealed the presence of ISPsy2,

**Table 3.** Description of imipenem-resistant *P. aeruginosa* strains producing porin OprD (groups 2 and 3)

Strain <sup>a</sup>	MIC (mg/L)			OprD		Relative gene expression for <sup>c</sup>						Substitutions in ParR/S	
	IPM	MEM	DOR	amount <sup>b</sup>	sequence	<i>oprD</i>	<i>mexE</i>	<i>mexB</i>	<i>mexY</i>	PA1797	<i>czcR</i>	ParR	ParS
PAO1	1	0.25	0.25	++	PAO1	1	1	1	1	1	1		
PAO1ΔD	8	2	1	none	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND		
BES04	8	4	1	–	variant	0.02	3.3	0.6	0.8	ND	<b>50.9</b>	ND	ND
CLI03	32	32	8	–	variant	0.3	2.6	<b>2.6</b>	<b>12.2</b>	<b>45.3</b>	1.1	E234K	none
ETI02	16	16	8	–	variant	0.01 <sup>d</sup>	4.5	<b>2.9</b>	<b>10.4</b>	0.9	0.7	none	ND
GAR01 <sup>e</sup>	8	1	0.5	+	LESB58	0.15	4.6	0.8	<b>9.1</b>	<b>41.2</b>	1.8	V55I; I80L	S382K
GAR02	8	2	2	+	variant	0.35	<b>236</b>	0.8	1.5	ND	2.3	ND	ND
GAR04	8	4	2	+	LESB58	0.1	39.6	<b>2.3</b>	<b>11</b>	<b>93.7</b>	1.4	none	L11I
GAR05 <sup>e</sup>	8	2	2	+	variant	0.1	9.9	0.7	<b>4.6</b>	<b>11.6</b>	2.3	V55I; I80L	S382K
NANC05	8	0.5	≤0.25	–	LESB58	0.1	0.3	0.6	<b>4.4</b>	<b>28.5</b>	0.8	none	L54Q
NANC10	32	8	4	±	LESB58	0.2	2.4	0.7	<b>4.3</b>	<b>11.4</b>	0.8	V55I; V221I	A138D
PAP01	8	1	0.5	+	PA14	0.2	<b>2335</b>	0.6	0.8	ND	0.7	ND	ND
PBI06 <sup>e</sup>	>256	>128	>128	–	variant	0.1	33.9	1.3	<b>8.8</b>	<b>162.5</b>	1.6	none	L145M
PBI10 <sup>e</sup>	>256	>128	>128	–	variant	0.1	31.1	1.1	<b>4.9</b>	<b>104.5</b>	1.0	none	L145M
TOUL04	64	8	4	–	variant	0.25	3.7	0.3	0.9	ND	0.6	ND	ND
VAL02	8	2	2	+	PAO1	0.1	<b>2015</b>	0.4	0.5	ND	0.6	ND	ND
VES03	8	2	1	+	LESB58	0.1	3.2	0.7	<b>7.5</b>	<b>14.9</b>	1.2	M59I	none

IPM, imipenem; MEM, meropenem; DOR, doripenem; ND, not determined.

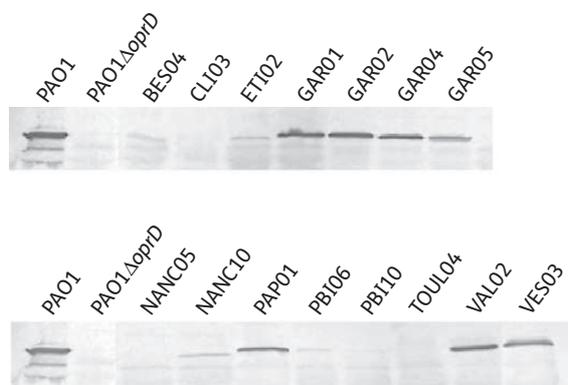
<sup>a</sup>Carbapenemase-producing strains are underlined.

<sup>b</sup>No (–), faint (±), low (+) and wild-type (++) amounts of OprD on immunoblots.

<sup>c</sup>Relative to expression in PAO1 (value of 1 by definition). Values are geometric means of at least two independent determinations. Isolates were considered as MexEF-OprN, MexAB-OprM or MexXY/OprM hyperproducers when the expression levels of *mexE*, *mexB* or *mexY* were ≥100-fold, ≥2-fold and ≥4-fold higher than those of PAO1, respectively.<sup>60</sup> The significant values are indicated in bold.

<sup>d</sup>In ETI02 the promoter region of *oprD* is disrupted by ISPsy2.

<sup>e</sup>GAR01 was genotypically related to GAR05, and PBI06 to PBI10.



**Figure 2.** Detection of porin OprD by western blotting. Outer membrane proteins of selected strains were separated by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane and then labelled with an OprD polyclonal antiserum.

a 1194 bp element (described for the first time in *Pseudomonas syringae*)<sup>41</sup> that disrupts the putative  $-35$  sequence of the P2 promoter in ETI02. The promoter regions of the other 14 strains were identical to that of PAO1. To analyse these bacteria further we quantified the transcripts of *copR* and *czcR*, which code for transcriptional regulators CopR and CzcR, respectively. When activated by their respective cognate sensor kinases (CopS and CzcS), these regulators turn on the expression of efflux operon *czcCBA* and repress *oprD* transcription.<sup>15,28</sup> One strain, BES04, was found to strongly overexpress *czcR* (Table 3). Consistent with this, sequencing of the *czcR-czcS* operon revealed a T283A mutation in the predicted histidine kinase domain of CzcS, with respect to PAO1 and PA14 CzcS.<sup>15</sup> These results support the notion of CzcRS being constitutively activated in BES04. Surprisingly, RT-qPCR experiments showed only a modest 2-fold increase in *czcC* expression in that strain compared with PAO1. Of note, exposure of PAO1 to 300  $\mu$ M of zinc as an inducing metal enhanced *czcR* and *czcC* transcripts by 42-fold and 995-fold, respectively. In agreement with our transcription data, BES04 was no more resistant to zinc than PAO1 (MICs of 10 mM and 15 mM, respectively). These results were clarified when an IS (ISPre2) initially described in *Pseudomonas resinovorans* was discovered in BES04;<sup>42</sup> ISPre2 interrupts the promoter sequences of operon *czcCBA*, likely preventing its induction.

The expression of *mexE* from the *mexEF-oprN* operon was also measured by RT-qPCR. In *nfxC* mutants the activation of LysR-type regulator MexT results in overproduction of the efflux pump MexEF-OprN and repression of *oprD* expression. This can be achieved through mutations occurring in *mexS*, which resides near *mexT* and codes for a putative oxidoreductase, MexS.<sup>18,43</sup> Three of the 15 strains (GAR02, PAP01, VAL02) were shown to be mutants overproducing MexEF-OprN. In each of them we identified amino acid substitutions in MexS (V73A and P98L in GAR02; F10S and V73A in PAP01; A75V and D272N in VAL02) with respect to the PA14 and PAO1 sequences (MexT was identical to that of PA14). One of these mutations, A75V, which is close to V73A, has already been identified in clinical *nfxC* strains.<sup>43</sup> It should be noted that none of our *nfxC* isolates harboured an inactive gene *ampR*; all the AmpR regulators showed the same sequence as that of PAO1 and PA14.

Like MexEF-OprN, the efflux pump MexXY/OprM is unable to export imipenem.<sup>14</sup> However, our laboratory recently reported that mutations activating the two-component system ParRS up-regulate operon *mexXY* and turn down *oprD* expression.<sup>20</sup> Such mutants, named *agrW2*, overexpress PA1797, a gene adjacent to the *parRS* operon. In 9 of 15 selected strains, RT-qPCR experiments demonstrated concomitant overexpression of PA1797 ( $\geq 11.4$ -fold more than in PAO1) and *mexY* ( $\geq 4.3$ -fold) (Table 3). Sequencing of *parS* and *parR* in these bacteria confirmed the presence of amino acid substitutions in the sensor ParS and/or the response regulator ParR that potentially activate the phosphorelay (Table 3). In four strains (GAR01, GAR05, NANC10, VES03) the mutations were located near the phosphorylation site D57, including the already reported change M59I.<sup>20</sup> Other mutations were situated in the first (L11I in GAR04) or the second (A138D in NANC10; L145M in PBI06 and PBI10) transmembrane domain of ParS, considered as being important for signal transduction. In NANC05 the mutation L54Q affected the periplasmic domain of the sensor.

## Discussion

This study is the first to specifically evaluate the prevalence of carbapenemases in imipenem-non-susceptible French ICU strains of *P. aeruginosa*. Although the rates of MBL *P. aeruginosa* are lower in France than reported for other countries,<sup>44–49</sup> they are now high enough to recommend hospital laboratories to routinely screen for MBLs. We believe that strains resistant to both imipenem and ceftazidime should be prioritized for phenotypic testing for MBL detection as 16% (7 of 44) were shown to produce such enzymes. All the MBL- and/or ESBL-positive strains from this study belonged to the subset of strains ( $n=23/109$ ) resistant to both ceftazidime and tobramycin, which may help to optimize the application of additional detection tests.

With the notable exception of IMP-29, found in a single hospital,<sup>36</sup> the carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamases identified in the present work (VIM-1, VIM-2 and VIM-4) tend to become increasingly prevalent in many Gram-negative species worldwide.<sup>4</sup>

Interestingly, all the collected strains were deficient in porin OprD, including the seven carbapenemase-positive isolates. Analysis of the whole bacterial collection revealed that a variety of mechanisms can alter this carbapenem-specific uptake pathway. As expected, mutational inactivation of the *oprD* gene represents the major cause of OprD loss in ICU *P. aeruginosa* strains.<sup>2</sup> However, this study also highlights a significant number of insertional events involving different IS, some of which (IS911, ISPs1, IS222, IS51, ISPa41 and ISPa1328) have never been associated with imipenem resistance before or have never to our knowledge even been reported in *P. aeruginosa* (IS911, ISPs1, and IS51). Collectively these data confirm the role played by these mobile elements in the emergence of carbapenem resistance in this species (9 of 104 isolates; 8.7%).<sup>23,50,51</sup>

As many as 94 of the 109 strains (86.2%), including 90 carbapenemase-negative strains, were found to harbour inactivated *oprD* genes and could be considered 'classical' impermeability-type mutants. However, our attention was attracted by 15 isolates (including three VIM-2 producers) expressing a wild-type (i.e. identical to reference strain PAO1, PA14, LESB58 or PP2) or

**Table 4.** Mechanisms responsible for the loss of porin OprD in ICU *P. aeruginosa*

Mechanisms	Genetic events
Lack of OprD production	substitutions/deletions/insertions in <i>oprD</i> ( $n=85$ strains including four MBL producers) disruption of <i>oprD</i> by IS ( $n=9$ )
Impaired insertion of OprD into the outer membrane	alteration of signal sequence ( $n=1$ )
Down-regulated OprD production	amino acid substitutions in sensor CzcS controlling efflux system CzcCBA ( $n=1$ ) amino acid substitutions in sensor ParS controlling efflux system MexXY/OprM ( $n=9$ <i>agrW2</i> mutants, including three MBL producers) amino acid substitutions in putative quinone oxidoreductase MexS impacting efflux system MexEF-OprN ( $n=3$ <i>nfxC</i> mutants) disruption of <i>oprD</i> promoters by IS ( $n=1$ )

mosaic full-length porin OprD. As OprD is known to have high sequence polymorphism among environmental and clinical strains of *P. aeruginosa*,<sup>52,53</sup> we wondered whether these sequence variations might have an impact on the diffusion of some or all of the carbapenem molecules and thus be linked with particular resistance phenotypes. While this cannot be excluded, RT-qPCR, western blotting and DNA sequencing experiments clearly demonstrated that production of OprD was deficient in all these isolates, mainly as a result of inverse coregulation of *oprD* with active efflux systems CzcCBA ( $n=1$ ), MexXY ( $n=9$ ) and MexEF-OprN ( $n=3$ ). Overexpression of *czcR*, *mexY* (and PA1797) and *mexE* in the corresponding strains was associated with mutations in CzcR, in the two-component system ParRS and in oxidoreductase MexS, respectively. As reported by Perron et al.,<sup>15</sup> OprD-defective mutants harbouring a V194L substitution in the CzcS sensor protein can be selected *in vitro* on lethal concentrations of zinc. The present study is the first to establish a link between the emergence of mutations in CzcS and resistance of *P. aeruginosa* to carbapenems in the clinical setting. In strain BES04 this was not accompanied by a higher zinc MIC because of the disruption of the promoter sequence of operon *czcCBA* by ISPre2. Accordingly, heavy metals (zinc, cadmium and cobalt) do not seem to have played a role in the selection of the BES04 mutation.

This work confirms that *agrW2* mutants are clinically relevant and not just laboratory-selected organisms.<sup>20</sup> Such mutants seem to be relatively prevalent in the imipenem-resistant population (9 of 15 isolates investigated;  $\geq 8.3\%$  of the whole collection). These bacteria, which typically overexpress the efflux pump components MexXY along with PA1797 (a protein of unknown function coded by a gene adjacent to operon *parRS*), exhibit decreased susceptibility to aminoglycosides, fluoroquinolones and imipenem. Four of the nine clinical *agrW2* mutants were also slightly (2-fold) more resistant than wild-type strains to colistin, as reported previously for *in vitro*-selected isolates.<sup>20</sup>

Although *in vitro*-selected mutants that overproduce MexEF-OprN have been reported to exhibit increased resistance to carbapenems,<sup>54,55</sup> a recent study from our laboratory showed that 7 of 10 clinical *nfxC* strains remained susceptible to imipenem, two isolates being of intermediate susceptibility and one isolate being resistant to this antibiotic (EUCAST breakpoints  $\leq 4$  and  $>8$  mg/L, respectively).<sup>43</sup> Thus, the three *nfxC* mutants detected in the present work (MIC 8 mg/L) should not be taken as representative of those prevailing among ICU strains (MIC  $\leq 4$  mg/L).

Finally, in the remaining strains, the lack of OprD in the outer membrane was associated with disruption of the *oprD* promoter P2 by ISPsy2 (ETI02) and alteration of the porin signal sequence (TOUL04). Several other amino acid substitutions in OprD were noted in strains devoid of porin at the cell surface. Additional experiments are required to confirm that the observed changes affect the translocation/insertion process of OprD in the inner/outer membrane. Aberrant interactions of outer membrane proteins with their cognate chaperones or defects in the Bam translocation complex may indeed have significant effects on the folding and assembly of these proteins.<sup>56</sup> Table 4 summarizes the complexity of resistance mechanisms found in the ICU strains.

## Acknowledgements

We are grateful to the following biologists (GESPAR Group) for their participation in this survey: Hôpital Ambroise-Paré, Boulogne-Billancourt (Pr Gaillard, Dr Soismier), CHU Amiens (Dr Mammeri), CHU Angers (Dr Joly-Guillou), Hôpital Beaujon, Clichy (Pr Nicolas-Chanoine, Dr Bert), Hôpital Bégin, Paris (Dr Merens), CH Béthune (Dr Descamps), Hôpital Bichat, Paris (Dr Armand-Lefèvre), CHU Bordeaux (Dr Dubois), CH Brest (Dr Tandé), CHU Caen (Pr Leclercq), CHU Clermont-Ferrand (Pr Bonnet), CH Colmar (Dr De Briel), Hôpital H. Mondor, Créteil (Pr Soussy), CHU Dijon (Pr Neuwirth), CHU Grenoble (Dr Croizé), Hôpital Européen G. Pompidou, Paris (Dr Podglajen), CH Mulhouse (Dr Delarbre), CHU Nancy (Pr Lozniewski, Dr Aissa), CHU Nantes (Dr Caillon), Hôpital Necker Paris (Dr Zahar), Hôpital R. Poincaré, Garches (Dr Ronco), CHU Reims (Pr de Champs), CH Roubaix (Dr Vachée), CH de St-Denis de la Réunion (Dr Belmonte), CHU St-Etienne (Pr Berthelot, Dr Grattard), CHU Strasbourg (Pr Jehl), CHU Toulouse (Pr Marty), CHU Tours (Dr van der Mee-Marquet), CH Valenciennes (Dr Cattoen), CH Vesoul (Dr Cailleaux). We also thank Fabrice Poncet (Structure Fédérative de Recherche, SFR4234, Besançon) for his excellent technical assistance in all our DNA sequencing projects. We are grateful to Thilo Köhler (Centre Médical Universitaire, Geneva) for providing the OprD antibody, and Isabelle Broutin and Laura Monlezun (Laboratoire de Cristallographie et RMN biologiques, UMR 8095, Paris V) for their help in structural analysis of porin OprD.

## Funding

Part of this research was funded by Janssen laboratory.

## Transparency declarations

None to declare.

## Supplementary data

Tables S1 and S2 are available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

## References

- Hidron AI, Edwards JR, Patel J *et al.* Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; **29**: 996–1011.
- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 2009; **22**: 582–610.
- Livermore DM. Interplay of impermeability and chromosomal  $\beta$ -lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; **36**: 2046–8.
- Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- $\beta$ -lactamases: a last frontier for  $\beta$ -lactams? *Lancet Infect Dis* 2011; **11**: 381–93.
- El Garch F, Bogaerts P, Bebrone C *et al.* OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 4828–33.
- Poirel L, Weldhagen GF, Naas T *et al.* GES-2, a class A  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 2598–603.
- Villegas MV, Lolans K, Correa A *et al.* First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 1553–5.
- Davies TA, Queenan AM, Morrow BJ *et al.* Longitudinal survey of carbapenem resistance and resistance mechanisms in Enterobacteriaceae and non-fermenters from the USA in 2007–2009. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 2298–307.
- Okamoto K, Gotoh N, Nishino T. Alterations of susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* by overproduction of multidrug efflux systems, MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY/OprM to carbapenems: substrate specificities of the efflux systems. *J Infect Chemother* 2002; **8**: 371–3.
- Pai H, Kim J-W, Kim J *et al.* Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 480–4.
- Quale J, Bratu S, Gupta J *et al.* Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 1633–41.
- Riera E, Cabot G, Mulet X *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem, and doripenem. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 2022–7.
- Maseda H, Yoneyama H, Nakae T. Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 658–64.
- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S *et al.* Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 3322–7.
- Perron K, Caille O, Rossier C *et al.* CzcR-CzcS: a two component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 2004; **279**: 8761–8.
- Köhler T, Epp SF, Curty LK *et al.* Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1999; **181**: 6300–5.
- Ochs MM, McCusker MP, Bains M *et al.* Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 1085–90.
- Sobel ML, Neshat S, Poole K. Mutations in PA2491 (*mexS*) promote MexT-dependent *mexEF-oprN* expression and multidrug resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2005; **187**: 1246–53.
- Balasubramanian D, Schneper L, Merighi M *et al.* The regulatory repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC  $\beta$ -lactamase regulator AmpR includes virulence genes. *PLoS One* 2012; **7**: e34067.
- Muller C, Plésiat P, Jeannot K. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and  $\beta$ -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 1211–21.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically—Seventh Edition: Approved Standard M7-A7*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2006.
- Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K *et al.* Convenient test for screening metallo- $\beta$ -lactamase-producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 40–3.
- Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 4783–8.
- Bryan LE, Godfrey AJ.  $\beta$ -Lactam antibiotics: mode of action and bacterial resistance. In: Lorian V, ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 3rd edn. Baltimore, MD, USA: Williams & Wilkins, 1991; 599–664.
- Hocquet D, Plésiat P, Dehecq B *et al.* Nationwide investigation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases, metallo- $\beta$ -lactamases, and extended-spectrum oxacillinases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 3512–5.
- Epp SF, Köhler T, Plésiat P *et al.* C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 1780–7.
- Dumas J-L, van Delden C, Perron K *et al.* Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol Lett* 2006; **254**: 217–25.
- Caille O, Rossier C, Perron K. A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2007; **189**: 4561–8.
- Jeannot K, Sobel ML, El Garch F *et al.* Induction of the MexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction. *J Bacteriol* 2005; **187**: 5341–6.
- Hocquet D, Vogne C, El'Garch F *et al.* MexXY-OprM efflux pump is necessary for adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 1371–5.
- Morales G, Wiehlmann L, Gudowius P *et al.* Structure of *Pseudomonas aeruginosa* populations analyzed by single nucleotide polymorphism and pulsed-field gel electrophoresis genotyping. *J Bacteriol* 2004; **186**: 4228–37.
- van Mansfeld R, Willems R, Brimicombe R *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* genotype prevalence in Dutch cystic fibrosis patients and age dependency of colonization by various *Pseudomonas aeruginosa* sequence types. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 4096–101.
- Cholley P, Thouverez M, Hocquet D *et al.* Most multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from hospitals in Eastern France belong to a few clonal types. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 2578–83.
- García-Castillo M, del Campo R, Morosini MI *et al.* Wide dispersion of ST175 clone despite high genetic diversity of carbapenem-

- nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in 16 Spanish hospitals. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 2905–10.
- 35** Falagas ME, Koletsis PK, Bliziotis IA. The diversity of definitions of multidrug-resistant (MDR) and pandrug-resistant (PDR) *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 2006; **55**: 1619–29.
- 36** Jeannot K, Poirel L, Robert-Nicoud M et al. IMP-29, a novel metallo- $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012.
- 37** Wolter DJ, Hanson ND, Lister PD. Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiol Lett* 2004; **236**: 137–43.
- 38** Ocampo-Sosa AA, Cabot G, Rodriguez C et al. Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 1703–13.
- 39** Biswas S, Mohammad MM, Patel DR et al. Structural insight into OprD substrate specificity. *Nat Struct Mol Biol* 2007; **14**: 1108–9.
- 40** Yoneyama H, Nakae T. Mechanism of efficient elimination of protein-D2 in outer membrane of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**: 2385–90.
- 41** Kamiunten H, Inoue S, Yakabe Y et al. Characterization of ISPsy2 and ISPsy3, newly identified insertion sequences in *Pseudomonas syringae* pv. *erobotryae*. *J Gen Plant Pathol* 2002; **68**: 75–80.
- 42** Urata M, Miyakoshi M, Kai S et al. Transcriptional regulation of the *ant* operon, encoding two-component anthranilate 1,2-dioxygenase, on the carbazole-degradative plasmid pCAR1 of *Pseudomonas resinovorans* strain CA10. *J Bacteriol* 2004; **186**: 6815–23.
- 43** Llanes C, Köhler T, Patry I et al. Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 5676–84.
- 44** Valenza G, Joseph B, Elias J et al. First survey of metallo- $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a German university hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 3493–7.
- 45** Rossolini GM, Luzzaro F, Migliavacca R et al. First countrywide survey of acquired metallo- $\beta$ -lactamases in Gram-negative pathogens in Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 4023–9.
- 46** Wang J, Zhou JY, Qu TT et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Chinese hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 2010; **35**: 486–91.
- 47** Lee K, Park AJ, Kim MY et al. Metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. in Korea: high prevalence of isolates with VIM-2 type and emergence of isolates with IMP-1 type. *Yonsei Med J* 2009; **50**: 335–9.
- 48** Franco MR, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN et al. Metallo- $\beta$ -lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics (Sao Paulo)* 2010; **65**: 825–9.
- 49** Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA et al. Emerging metallo- $\beta$ -lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis* 2005; **41** Suppl 4: S276–8.
- 50** Evans JC, Segal H. A novel insertion sequence, ISPa26, in *oprD* of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with carbapenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 3776–7.
- 51** Ruiz-Martinez L, Lopez-Jimenez L, d'Ostuni V et al. A mechanism of carbapenem resistance due to a new insertion element (ISPa133) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int Microbiol* 2011; **14**: 51–8.
- 52** Pirnay J-P, De Vos D, Mossialos D et al. Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* *oprD* gene from clinical and environmental isolates. *Environ Microbiol* 2002; **4**: 872–82.
- 53** Sanbongi Y, Shimizu A, Suzuki T et al. Classification of OprD sequence and correlation with antimicrobial activity of carbapenem agents in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates collected in Japan. *Microbiol Immunol* 2009; **53**: 361–7.
- 54** Fukuda H, Hosaka M, Iyobe S et al. *nfxC*-type quinolone resistance in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 790–2.
- 55** Köhler T, Michéa-Hamzehpour M, Henze U et al. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 1997; **23**: 345–54.
- 56** Rigel NW, Silhavy TJ. Making a  $\beta$ -barrel: assembly of outer membrane proteins in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2012; **15**: 189–93.
- 57** Poirel L, Le Thomas I, Naas T et al. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 622–32.
- 58** Pitout JD, Gregson DB, Poirel L et al. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo- $\beta$ -lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 3129–35.
- 59** Roy S, Viswanathan R, Singh AK et al. Sepsis in neonates due to imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing NDM-1 in India. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 1411–3.
- 60** Hocquet D, Roussel-Delvallez M, Cavallo JD et al. MexAB-OprM- and MexXY-overproducing mutants are very prevalent among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to ticarcillin. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 1582–3.

## 2 ARTICLE 2

**Diversité des mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines chez des souches de *Pseudomonas aeruginosa* issues de patients atteints de mucoviscidose : une étude française multicentrique (GERPA).**

Catherine Llanes, Christine Pourcel, Charlotte Richardot, Patrick Plésiat, Gwernaele Fichant, Jean-Didier Cavallo et Audrey Mérens, ainsi que le groupe d'étude GERPA.

Publié dans *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* en avril 2013.

## 2.1 RÉSUMÉ

La persistance de *Pseudomonas aeruginosa* dans le tractus respiratoire des patients atteints de mucoviscidose s'explique par la capacité de la bactérie à échapper au système immunitaire de l'hôte et par sa résistance aux traitements administrés aux patients incluant des  $\beta$ -lactamines et des aminosides, principalement. Cette résistance résulte à la fois de mécanismes transitoires conférant une résistance dite adaptative (e.g. mode de vie en biofilm, induction de la  $\beta$ -lactamase AmpC), et de mécanismes stables dus à des mutations (e.g. surproduction stable de la  $\beta$ -lactamase AmpC, surproduction constitutive des pompes d'efflux Mex, perte de la porine OprD). Ce phénomène est amplifié par le fait que, dans les souches CF, les mécanismes de réparation de l'ADN sont fréquemment altérés, conduisant à l'apparition de souches hypermutatrices. C'est pourquoi même en l'absence d'acquisition de gènes étrangers les niveaux de résistance des bactéries augmentent graduellement au cours de la maladie.

Le but de ce projet était d'étudier au sein d'une large collection de souches CF les mécanismes de résistance aux  $\beta$ -lactamines, assez peu évalués dans la littérature. Deux cent quatre souches, issues de 156 patients CF provenant de 10 hôpitaux français, ont donc été collectées entre octobre 2006 et avril 2007 sans aucun critère de sélection (étude GERPA-CF). Environ la moitié des souches (124/204) est sensible aux  $\beta$ -lactamines selon les critères de l'EUCAST. L'étude par MLVA révèle 131 génotypes différents, sans lien avec les profils de résistance. Parmi les 80/204 souches non sensibles à au moins une  $\beta$ -lactamine, 71 surexpriment au moins une pompe d'efflux (36/80 : MexAB-OprM, 65/80 : MexXY/OprM, 7/80 : MexEF-OprN et 2/80 : MexCD-OprJ). La dépression de AmpC est observée chez 49 souches et 11 ont acquis une  $\beta$ -lactamase transférable. L'accumulation des mécanismes de résistance, caractéristique des souches CF, augmente avec l'âge des patients. Près de 84 % des souches cumulent au moins 2 mécanismes de résistance et 23 % au moins 4. Dans cette

collection, 42 souches sont insensibles à l'imipénème (intermédiaire ou résistant), en raison d'une  $\beta$ -lactamase transférable (1/42) ou de l'altération quantitative ou qualitative de la porine OprD. De nombreuses variations d'acide aminé considérées comme du polymorphisme banal, sont retrouvées également chez les souches sensibles. Toutefois, chez les souches résistantes, des mutations non-sens ou des décalages du cadre de lecture du gène *oprD* sont présentes dans 76,2% (32/42) des cas. Les 10/42 souches restantes possèdent un gène *oprD* fonctionnel, identique à celui de la souche de référence sensible LESB58 dont l'expression est, soit significativement plus basse (6/10 isolats), soit comparable à celle de PAO1 (4/10 isolats). Des analyses complémentaires ont été réalisées sur ces 4 derniers isolats afin d'expliquer la résistance à l'imipénème (article 3).

Pour conclure, il apparaît que 3 mécanismes principaux sont à l'origine de la résistance aux  $\beta$ -lactamines chez les souches CF : la dépression de la  $\beta$ -lactamase AmpC, la surproduction de pompes d'efflux de type Mex et la « perte » de la porine OprD, ces mécanismes pouvant se cumuler au cours du temps. La résistance aux carbapénèmes est, quant à elle, principalement causée par la sous-expression ou l'inactivation de la porine OprD.

## 2.2 CONTRIBUTION AU TRAVAIL

Dans cette étude, j'ai effectué les immunoblots de membrane externe (purification des protéines de membrane externe, migration sur gel et hybridation). J'ai également participé à l'analyse des résultats de séquençage des gènes *oprD* pour les 42 isolats résistants à l'imipénème.

## 2.3 TEXTE DE L'ARTICLE

## Diversity of $\beta$ -lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study

Catherine Llanes<sup>1</sup>, Christine Pourcel<sup>2</sup>, Charlotte Richardot<sup>1</sup>, Patrick Plésiat<sup>1</sup>, Gwennaele Fichant<sup>3</sup>, Jean-Didier Cavallo<sup>4</sup> and Audrey Mérens<sup>5\*</sup> on behalf of the GERPA Study Group†

<sup>1</sup>CHRU Jean Minjot, Centre National de Référence de la résistance aux antibiotiques, Besançon, France; <sup>2</sup>Université Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologie, Orsay, France; <sup>3</sup>CNRS, Laboratoire de génétique et de microbiologie moléculaires, Toulouse, France; <sup>4</sup>Ecole du Val-de-Grâce, Paris, France; <sup>5</sup>Hôpital d'instruction des armées Bégin, Service de biologie médicale, Saint-Mandé, France

\*Corresponding author. Tel: +33-1-43-98-49-98; Fax: +33-1-43-98-54-61; E-mail: merens-a@wanadoo.fr  
†Members of the GERPA Study Group are listed in the Acknowledgements section.

Received 15 December 2012; returned 16 January 2013; revised 24 February 2013; accepted 4 March 2013

**Objectives:** To investigate the resistance mechanisms of  $\beta$ -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis (CF) patients in France.

**Methods:** Two-hundred-and-four *P. aeruginosa* CF isolates were collected in 10 French university hospitals in 2007. Their susceptibility to 14 antibiotics and their resistance mechanisms to  $\beta$ -lactams were investigated. Their  $\beta$ -lactamase contents were characterized by isoelectric focusing, PCR and enzymatic assays. Expression levels of efflux pumps and the intrinsic  $\beta$ -lactamase AmpC were quantified by reverse transcription real-time quantitative PCR. Genotyping was performed using multiple-locus variable number of tandem repeats analysis (MLVA). The *oprD* genes were sequenced and compared with those of reference *P. aeruginosa* strains. To assess deficient OprD production, western blotting experiments were carried out on outer membrane preparations.

**Results:** MLVA typing discriminated 131 genotypes and 47 clusters. One-hundred-and-twenty-four isolates (60.8%) displayed a susceptible phenotype to  $\beta$ -lactams according to EUCAST breakpoints. In the 80 remaining isolates, resistance to  $\beta$ -lactams resulted from derepression of intrinsic cephalosporinase AmpC (61.3%) and/or acquisition of secondary  $\beta$ -lactamases (13.8%). Efflux pumps were up-regulated in 88.8% of isolates and porin OprD was lost in 53.8% of isolates due to frameshifting or nonsense mutations in the *oprD* gene.

**Conclusions:**  $\beta$ -Lactam resistance rates are quite high in CF strains of *P. aeruginosa* isolated in France and not really different from those reported for nosocomial strains. Development of  $\beta$ -lactam resistance is correlated with patient age. It results from intrinsic mechanisms sequentially accumulated by bacteria isolated from patients who have undergone repeated courses of chemotherapy.

**Keywords:** OprD, efflux systems, AmpC, antibiotic resistance surveillance, molecular typing

### Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* contributes to the decline of respiratory function in cystic fibrosis (CF) patients. Shortly after infection of the CF airways, the microorganism is able to develop various strategies to evade the host's immune defences and to resist antibiotics of different classes, including  $\beta$ -lactams.<sup>1</sup> These latter agents are essential to control infectious exacerbations and are administered intravenously (e.g. ceftazidime, cefepime, piperacillin/tazobactam and meropenem) or by aerosol (e.g. aztreonam). The persistence of *P. aeruginosa* in the CF lung is believed to result from both transient (adaptive) and stable (mutational) mechanisms.<sup>2</sup> For example, the slow growth or

dormancy of bacteria living in biofilms under low oxygen tension has been proposed to strongly impair the *in vivo* efficacy of  $\beta$ -lactams, as these drugs mostly kill actively dividing cells.<sup>3</sup> The spatial induction of the intrinsic  $\beta$ -lactamase AmpC by  $\beta$ -lactams (e.g. ceftazidime and imipenem) would provide protection to those bacteria located in microaerophilic zones of the biofilm.<sup>4</sup> On the other hand, the accumulation of mutations in persistent clones is known to gradually increase the resistance of *P. aeruginosa* to antibiotics during the chronic stage of infection. It is now well established that this evolution is amplified in a majority of CF patients by alteration of the bacterial system of DNA repair and the emergence of hypermutator populations.<sup>5</sup> Some of these mutations have been reported to

promote  $\beta$ -lactam resistance through the stable overexpression of AmpC,<sup>6,7</sup> the constitutive up-regulation of Mex efflux systems (mainly MexXY/OprM)<sup>8,9</sup> or the loss of the carbapenem-specific porin OprD.<sup>10</sup> According to previous studies, the horizontal acquisition of genes coding for secondary  $\beta$ -lactamases seems to be a rather infrequent event in CF strains.<sup>11–14</sup> Whether alterations in penicillin-binding proteins<sup>15</sup> or lipopolysaccharides<sup>16</sup> contribute to the decreased susceptibility to  $\beta$ -lactams remains unclear.

Only a few studies have systematically investigated the resistance mechanisms of *P. aeruginosa* to  $\beta$ -lactams in the CF context.<sup>13,17</sup> This prospective multicentre study was set up to improve our knowledge on how the pathogen adapts to antibiotic treatments in this pathology.

## Materials and methods

### Bacterial strains and culture conditions

Between October 2006 and April 2007, consecutive, non-repetitive, respiratory isolates of *P. aeruginosa* were collected from CF patients in 10 French university hospitals (CHU or CHRU). Eighteen, 19, 20 and 27 isolates were collected by one, one, seven and one participating centres, respectively, leading to a total of 204 isolates. The participating centres were CHU Rangueil (Toulouse), CHU Hôtel Dieu (Nantes), CHU Robert Debré (Paris), CHU Cochin (Paris), CHRU Arnaud-de-Villeneuve (Montpellier), CHRU Calmette (Lille), CHRU Gabriel-Montpied (Clermont-Ferrand), CHU Côte-de-Nacre (Caen), CHU Trousseau (Paris) and CHRU Jean Minjot (Besançon). The isolates were sent to two coordinating centres for further investigations together with patient data (Bégin Military Hospital, Saint-Mandé and CHRU Jean Minjot, Besançon). The bacterial isolates were kept frozen at  $-70^{\circ}\text{C}$  until analysed. The well-characterized mutants PT629,<sup>18</sup> MutGR1,<sup>9</sup> EryR<sup>19</sup> and PAO7H,<sup>20</sup> which all derive from wild-type reference strain PAO1, were used as positive controls in reverse transcription real-time quantitative PCR (RT-qPCR) experiments to identify clinical isolates overexpressing the MexAB-OprM, MexXY/OprM, MexCD-OprJ and MexEF-OprN pumps, respectively. Bacterial cultures were performed at  $37^{\circ}\text{C}$  on Mueller–Hinton medium (MH agar, bioMérieux, Marcy l'Étoile, France).

### Epidemiological typing

The clinical isolates of this collection were genotyped using a multiple-locus variable number of tandem repeats (VNTRs) analysis (MLVA) assay, based on the analysis of short to long tandemly repeated sequences (also called microsatellites and minisatellites). A total of 15 VNTR markers were studied as described previously.<sup>21</sup> The allelic profile of an isolate with 15 VNTRs was expressed as the number of repeats for each VNTR in the order ms77, ms127, ms142, ms172, ms211, ms212, ms213, ms214, ms215, ms216, ms217, ms222, ms223, ms207, ms209. A new genotype number was given when one difference was observed at any VNTR. The genotype numbers were determined for the present study and were given the prefix 'gerpa'. The MLVA clustering analysis was performed using the categorical coefficient and the unweighted pair group method with arithmetic mean with three reference strains, namely PAO1, PA14<sup>22</sup> and clinical strain C50 from Sweden that belongs to the widely distributed 'clone C'.<sup>23</sup> The MLVA profile of strain 2192<sup>24</sup> was deduced from the genome sequence (Broad Institute, www.broadinstitute.org). For global phylogenetic pattern determination, a cut-off value of 53% was applied to define a cluster, corresponding to seven allelic differences among the 15 markers. In the case of a VNTR that could not be amplified or the size of one VNTR that could not be analysed because of the presence of an insertion sequence (IS)

element in the VNTR,<sup>21</sup> the percentage cut-off value for clustering was applied to the 14 remaining VNTRs.

### Antibiotic susceptibility testing

The disc diffusion method (Bio-Rad, Marne la Coquette, France) on Mueller–Hinton II (MHA) plates (bioMérieux) was used routinely by the participating laboratories to establish the resistance profiles of isolates. Drug MICs were determined by the reference broth microdilution method,<sup>25</sup> with *P. aeruginosa* ATCC 27853 as a control. The isolates were then categorized as susceptible, intermediate or resistant in accordance with current EUCAST clinical breakpoints for *P. aeruginosa* ([http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/Breakpoint\\_table\\_v\\_3.1.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf)). These breakpoints are (S breakpoint/R breakpoint, mg/L): ticarcillin, 16/16; ticarcillin/clavulanate, 16/16; piperacillin, 16/16; piperacillin/tazobactam, 16/16; ceftazidime, 8/8; ceftipime, 8/8; aztreonam, 1/16; imipenem, 4/8; ciprofloxacin, 0.5/1; gentamicin, 4/4; tobramycin, 4/4; amikacin, 8/16; fosfomycin, 32/32; and colistin, 4/4.

### Identification of $\beta$ -lactamases

All of the isolates resistant to at least one of the antipseudomonal  $\beta$ -lactams tested were screened phenotypically for stable AmpC overproduction by measuring the inhibition zones around the disc of ceftazidime on MHA  $\pm$  500 mg/L cloxacillin (1000 mg/L with some highly resistant isolates). An increase of  $>5$  mm in the presence of the AmpC inhibitor was considered as potentially positive.<sup>26</sup> All the resistant isolates were subjected to ultrasonic disruption and then isoelectric focusing (IEF) to determine the isoelectric point (pI) of individual  $\beta$ -lactamases, as published previously.<sup>27</sup> The  $\beta$ -lactamase activities in the lysates were measured spectrophotometrically at 262 nm with nitrocefin as a chromogenic substrate.<sup>27</sup> The expression of gene *bla*<sub>AmpC</sub> was assayed by quantitative RT-qPCR with specific primers (Table S1, available as Supplementary data at JAC Online) as reported previously.<sup>18</sup> The mRNA levels were normalized to that of housekeeping gene *rpsL* and expressed as a ratio to that of strain PAO1.<sup>28</sup> The RT-qPCR results were interpreted according to the thresholds defined by Cabot et al.<sup>28</sup>

In isolates with a negative cloxacillin test, showing additional bands in IEF gels (other than AmpC at pI 8.7–8.9) and/or exhibiting significant  $\beta$ -lactamase activity despite low *bla*<sub>AmpC</sub> gene expression ( $<10$ -fold versus PAO1), the presence of transferable  $\beta$ -lactamase genes was investigated by real-time PCR in a LightCycler apparatus (Roche Diagnostics) after extraction of total bacterial DNA.<sup>29</sup> The consensus primers used were specific of type PSE, TEM, SHV, VEB, GES, PER, VIM, IMP, OXA-10 group, OXA-1 group, OXA-2 group, CTX-M1 group, CTX-M2 group and CTX-M9 group  $\beta$ -lactamases (Table S1, available as Supplementary data at JAC Online). The PCR products were sequenced on both strands. The predicted sequences of AmpC were compared with those of extended-spectrum AmpC (ESAC) PDC-1 (accession number FJ666065) and PDC-2 (accession number FJ666064) for identification of the Ala105 mutation.

### Efflux and OprD deficiency

The overexpression of genes *mexB*, *mexY*, *mexC* and *mexE* was assayed by RT-qPCR with specific primers (Table S1, available as Supplementary data at JAC Online) as reported previously.<sup>18</sup> Transcripts of gene *oprD* were quantified by RT-qPCR in isolates exhibiting imipenem resistance (MIC  $>4$  mg/L) and full-length *OprD* coding sequences. Because of the high sequence polymorphism of *oprD*, specific primers were designed in two consensus regions (ch1-*oprD* and ch2-*oprD*, Table S1, available as Supplementary data at JAC Online) deduced from the *oprD* sequences of the selected isolates. The mRNA levels were normalized to that of housekeeping gene *rpsL* and expressed as a ratio to PAO1 (value of 1

by definition). The thresholds for interpretation were those defined by Hocquet *et al.*<sup>30</sup>

### Immunodetection of OprD

Outer membranes were isolated, subjected to SDS-PAGE and analysed by western blotting with an OprD-specific polyclonal antiserum (diluted 1:10000) as reported previously.<sup>31</sup> OprD bands were visualized with alkaline phosphatase conjugated to an antirabbit secondary antibody by using a colorimetric AP substrate reagent kit (Promega, Charbonnières, France).

### Multiple sequence alignments and phylogenetic analyses

The *oprD* gene sequences from clinical and reference *P. aeruginosa* strains (PAO1, PA14, PA5, PA7, PP2 and LESB58) were compared with MUSCLE software.<sup>32</sup> The phylogenetic analysis was performed with SEAVIEW<sup>33</sup> and the distances were estimated with the two-parameter substitution model of Kimura.<sup>34</sup> The tree was reconstructed using BIONJ, an improved version of the neighbour-joining method,<sup>35</sup> on alignment positions without a gap. One thousand bootstrap replicates were computed. The root of the tree was considered as the barycentre of the tree.

## Results

### Molecular epidemiology

A total of 204 isolates of *P. aeruginosa* were collected in 10 French hospitals from 156 CF patients (78 females, 78 males; 1–45 years of age, median age 21) (Table S2, available as Supplementary data at JAC Online). The MLVA identified 131 different genotypes with 47 clusters (defined as identical size alleles for at least eight VNTR). Genotypes are listed in Table S2, available as

Supplementary data at JAC Online and are represented in the phylogenetic tree (Figure S1, available as Supplementary data at JAC Online). The largest cluster contained 14 isolates from five centres (centres 3, 5, 6, 8 and 10) and included genotypes 33–36. Cluster C (corresponding to MLVA profile C50) included 12 isolates (5.9%) from eight different centres (centres 1–6, 9 and 10). Cluster PA14 contained eight isolates from four centres (centres 5 and 7–9). Isolates 1–7 and 3–16 had a genotype similar to that of strain 2192, which was recovered from a CF patient.<sup>24</sup> The last 168 CF isolates belonged to 112 different genotypes. No isolate appeared to be genotypically related to the epidemic clone Liverpool LESB58.<sup>36</sup>

### Antimicrobial susceptibility

The drug susceptibility rates of the isolates are indicated in Table 1. Overall, 124/204 (60.8%) isolates displayed a phenotype susceptible to  $\beta$ -lactams according to EUCAST breakpoints (Table S2, available as Supplementary data at JAC Online and Table 1). Susceptibility rates to piperacillin/tazobactam, ceftazidime and imipenem were 77.1%, 81% and 80%, respectively, higher than those reported previously (ceftazidime susceptibility rate: 60.4%).<sup>37</sup> Fifteen of the 204 isolates (7.35%) exhibited concomitant resistance to ceftazidime, imipenem, ciprofloxacin and aminoglycosides (tobramycin, gentamicin and/or amikacin). Colistin remained active against all these 15 isolates. In contrast to colistin and fosfomycin, resistance to ciprofloxacin, aminoglycosides, piperacillin/tazobactam, ceftazidime and cefepime tended to increase with patient age (Table 1). Overall, no correlation could be established between the resistance profiles and the different MLVA genotypes.

**Table 1.** Susceptibility rates of the 204 *P. aeruginosa* isolates

Antibiotics	MICs (mg/L)			Susceptibilities (%) <sup>a</sup>			
	MIC <sub>50</sub> <sup>b</sup>	MIC <sub>90</sub> <sup>b</sup>	range	total, n=204	Patient age (years)		
					0–6, n=15	7–18, n=71	>18, n=118
Ticarcillin	16	256	0.125–2048	66.8	80.0	71.8	62.7
Ticarcillin/clavulanate	16	256	0.25–2048	67.3	80.0	73.2	62.7
Piperacillin	4	256	0.25–1024	74.1	93.3	77.4	69.5
Piperacillin/tazobactam	4	128	0.125–256	77.1	93.3	77.4	73.7
Ceftazidime	2	32	0.064–128	81.0	100	84.5	75.4
Cefepime	4	32	0.064–256	81.5	100	81.7	77.9
Aztreonam	2	64	0.032–512	42.9	40.0	38.0	44.9
Imipenem	1	16	0.032–64	80.0	86.6	83.1	77.1
Ciprofloxacin	0.5	4	0.016–32	65.9	93.3	69.0	58.4
Gentamicin	4	32	0.064–512	60.5	73.3	63.3	56.7
Tobramycin	2	16	0.125–512	82.0	100	85.9	77.1
Amikacin	8	32	0.125–512	58.0	66.6	60.5	55.0
Fosfomycin	64	512	0.25–1024	35.6	40.0	29.5	39.0
Colistin	1	4	0.064–4	100	100	100	100

<sup>a</sup>Percentages of susceptibility are in accordance with EUCAST breakpoints: ticarcillin/clavulanate, 16/16; piperacillin/tazobactam, 16/16; ceftazidime, 8/8; cefepime, 8/8; aztreonam, 1/16; imipenem, 4/8; ciprofloxacin, 0.5/1; gentamicin, 4/4; tobramycin, 4/4; amikacin, 8/16; fosfomycin, 32/32; and colistin, 4/4.

<sup>b</sup>MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub>: concentrations of antibiotics that inhibit 50% and 90% of isolates, respectively.

### Mechanisms of resistance to $\beta$ -lactams

Eighty isolates, belonging to 56 different MLVA profiles, showed a non-susceptible phenotype to at least one of the  $\beta$ -lactams tested. The resistance mechanisms found in these isolates are listed in Table 2. Interestingly, a high proportion of isolates (71/80; 88.8%) was found to overproduce one or more active efflux systems, including MexAB-OprM (36/80; 45%) and MexXY/OprM (65/80; 81.25%). MexEF-OprN (7/80; 8.75%) and MexCD-OprJ (2/80; 2.5%) overproducers were less prevalent in the collection. Of the 71 efflux overproducers, 29 and 5 overexpressed two or three efflux systems simultaneously, respectively.

Stable derepression of  $\beta$ -lactamase AmpC was identified in 49/80 isolates (61.3%). While 40/49 of these isolates were categorized as resistant to ceftazidime according to EUCAST breakpoints (MIC >8 mg/L), 9/49 appeared susceptible to this antibiotic (MIC 4–8 mg/L), suggesting deficient MexAB-OprM efflux systems counterbalancing the effect of AmpC production (TicHS phenotype).<sup>8</sup> Indeed, while ceftazidime is not a good substrate of MexAB-OprM,<sup>38</sup> deficient production of this pump in general results in a 2-fold decrease in the ceftazidime MIC.

Transferable  $\beta$ -lactamases occurred in only 11 isolates (13.8%) (isolated from seven patients of 13, 19, 20, 23, 24, 31 and 35 years of age), namely 1 VIM-2 carbapenemase and 10 narrow-spectrum penicillinases (1 TEM-2, 1 PSE-1, 4 OXA-47

and 4 OXA-2). Of note, 3/4 OXA-47- and 4/4 OXA-2-producing isolates were clonally related, respectively. All of the 11 isolates displayed high-level resistance to aminoglycosides (gentamicin MICs  $\geq$ 16 mg/L).

Multiple combinations of enzymatic and non-enzymatic resistance mechanisms were observed in the CF isolates that increased with patient age (Figure 1). Two or more mechanisms were evidenced in 67/80 isolates, with 19 isolates harbouring at least four mechanisms. As expected, accumulation of these mechanisms was associated with higher  $\beta$ -lactam MICs in isolates (Table 3).

### Resistance to carbapenems

Forty-two isolates were non-susceptible to imipenem (Table 4), of which 26 were also resistant to ceftazidime. As indicated above, one isolate was found to produce the metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2, while 27 overexpressed the intrinsic enzyme AmpC. Sequencing of the *bla*<sub>AmpC</sub> genes in these latter isolates indicated that 25 of them contained the T105A change proposed to extend the hydrolytic activity of AmpC to carbapenems.<sup>39</sup> Ten out of the 42 isolates were resistant or of intermediate susceptibility to imipenem only, as compared with the other  $\beta$ -lactams tested. Sequence analysis of the entire *oprD* gene from all of the

**Table 2.** Mechanisms involved in  $\beta$ -lactam resistance among the CF isolates

Identified mechanisms of resistance								
efflux systems <sup>a</sup>					$\beta$ -lactamases			Number of isolates (n=80)
MexAB-OprM	MexXY/OprM	MexCD-OprJ	MexEF-OprN	OprD <sup>b</sup>	AmpC <sup>a</sup>	transferable	unknown	
+	-	-	-	+	-	-	-	1
+	-	-	-	+	+	-/PSE-1	-	1/1
+	-	-	+	-	+	-	-	1
+	+	-	-	+	-	-	-	5
+	+	-	-	+	+	-	-	6
+	+	-	-	-	-	-/VIM-2	-	3/1
+	+	-	-	-	+	-	-	10
+	+	-	-	+	-	OXA-2/OXA-47	-	1/1
+	+	+	-	-	+	-	-	1
+	+	-	+	+	+	-	-	1
+	+	-	+	-	+	-	-	3
-	+	-	-	+	-	-/OXA-47	-	2/2
-	+	-	-	-	-	OXA-2	-	1
-	+	-	-	-	+	-/OXA-2/TEM-2	-	10/1/1
-	+	-	-	+	+	-/OXA-2	-	6/1
-	+	-	+	+	+	-	-	1
-	+	-	-	-	-	-	-	8
-	-	+	-	-	+	-	-	1
-	-	-	+	+	-	-	-	1
-	-	-	-	+	-	OXA-47	-	1
-	-	-	-	+	+	-	-	4
-	-	-	-	-	-	-	-	2
-	-	-	-	+	-	-	+	2

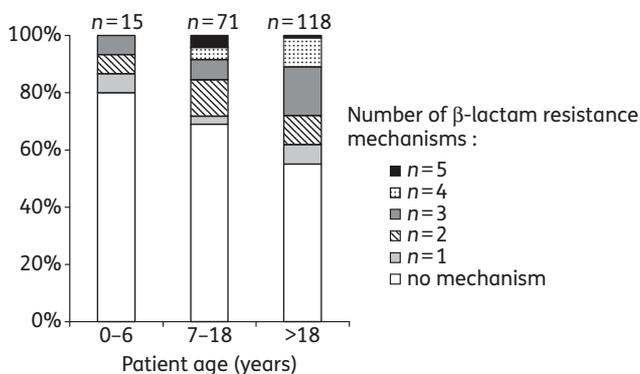
<sup>a</sup>+, stable up-regulation of efflux or  $\beta$ -lactamase AmpC; -, basal uninduced levels.

<sup>b</sup>+, presence of wild-type porin; -, inactivation or down-regulation of *oprD*.

42 isolates highlighted a significant polymorphism that could be subdivided into five distinct clusters (not correlated with resistance levels), whose branches were supported by high bootstrap values (Figure 2). The first cluster that grouped most of the *oprD* genes was closely related to the epidemic CF strain LESB58. A second cluster included sequences related to strain PA14 (5-17, 6-20, 9-13, 9-9 and 9-12). The sequences of isolates 2-4, 2-16, 8-9 and 7-18 were similar to that of reference strain PAO1. Those of isolates 10-4, 4-13, 6-5 and 6-11 formed a fourth cluster with the *oprD*-TS allele (strain PP2) and possessed a hypothetical common ancestor with strain PA5. Finally, isolates 1-14, 5-1 and 9-11 exhibited sequences that could be grouped under the

same node on the tree. This latter cluster does not include any reference strain. However, it shares a common hypothetical ancestor with the *oprD*-TS/PA5 group.

As already pointed out by other studies on CF *P. aeruginosa*,<sup>17</sup> a high percentage of isolates (76.2% of the 42 imipenem-non-susceptible isolates; 53.8% of the 80  $\beta$ -lactam-non-susceptible isolates) contained frameshifts or nonsense mutations inactivating the *oprD* gene (Table 4). Of the 10 remaining isolates with intact, full-length coding sequences, six (1-10, 5-11, 7-3, 7-4, 7-7 and 7-20) expressed *oprD* at very low levels. It should be noted that 7-3 and 7-4 were clonally related. These mRNA data correlated with lower amounts of porin OprD in the outer membrane compared with wild-type reference strain PAO1 (Figure 3). Interestingly, the CF isolate 7-20 was found to be a typical *nfxC* mutant overexpressing the MexEF-OprN efflux pump with concomitant down-regulation of OprD.<sup>40</sup> In three of the 10 isolates with intact *oprD* (1-13, 1-17 and 6-20), the porin could not be detected in membrane extracts despite some expression of the gene. Intriguingly, the last isolate, 10-16, appeared to produce significant amounts of intact porin as compared with the control. The reason for its resistance to imipenem (MIC of 8 mg/L) remains unclear so far.



**Figure 1.** Accumulation of  $\beta$ -lactam resistance mechanisms with patient age. The number of  $\beta$ -lactam resistance mechanisms detected in each isolate is represented for three groups of patients according to their age: 0–6 years (15 isolates); 7–18 years (71 isolates); and >18 years (118 isolates). The different  $\beta$ -lactam resistance mechanisms were AmpC derepression, transferable  $\beta$ -lactamase, MexAB-OprM overproduction, MexCD-OprJ overproduction, MexEF-OprN overproduction, MexXY/OprM overproduction and/or OprD deficiency.

## Discussion

The structure of the present collection of CF *P. aeruginosa* isolates is characteristic of the previously described panmictic population with some clonal complexes.<sup>41,42</sup> It reflects the fact that in CF patients the infection is more likely to be community acquired. Clusters C and PA14 correspond to clones previously associated with CF and which might show some ability to colonize the patient airways.<sup>21,43</sup> Cluster C represented 20% of the CF strains isolated in Hanover, Germany.<sup>23</sup> The CF patients were 1–45 years old, with a majority of adolescents and young adults. In longitudinal surveys of CF children, it was shown that

**Table 3.** MIC<sub>50</sub>s of  $\beta$ -lactams according to the number of resistance mechanisms identified in the CF isolates

Antibiotics	MIC <sub>50</sub> s (mg/L) for $\beta$ -lactam-susceptible isolates (n=124)	MIC <sub>50</sub> s (mg/L) for $\beta$ -lactam-non-susceptible isolates <sup>a</sup> (n=80)		
		0 or 1 resistance mechanism <sup>b</sup> (n=13)	2 or 3 resistance mechanisms <sup>c</sup> (n=48)	4 or 5 resistance mechanisms <sup>c</sup> (n=19)
Ticarcillin	4	64	128	512
Ticarcillin/ clavulanate	4	32	128	256
Piperacillin	2	16	64	256
Piperacillin/ tazobactam	2	16	32	128
Ceftazidime	1	4	8	64
Cefepime	2	8	8	32
Aztreonam	4	16	16	64
Imipenem	0.5	2	4	32

<sup>a</sup>To at least one  $\beta$ -lactam tested.

<sup>b</sup>AmpC derepression, MexAB-OprM overproduction, MexEF-OprN overproduction, MexXY/OprM overproduction or OprD deficiency.

<sup>c</sup> $\beta$ -Lactam resistance mechanisms among AmpC derepression, transferable  $\beta$ -lactamase, MexAB-OprM overproduction, MexCD-OprJ overproduction, MexEF-OprN overproduction, MexXY/OprM overproduction and OprD deficiency.

**Table 4.** Profiles and mechanisms of resistance of the 42 imipenem-non-susceptible CF isolates

Isolates		MICs (mg/L)										β-Lactamases		mRNA expression for <sup>b</sup> :					OprD polymorphism
Centre	isolate	TIC	PIP	CAZ	FEP	ATM	IPM	CIP	GEN	TOB	AMK	acquired	ESAC <sup>a</sup>	<i>bla</i> <sub>AmpC</sub>	<i>oprD</i> <sup>c</sup>	<i>mexB</i>	<i>mexY</i>	<i>mexE</i>	
1	2	1	0.5	1	4	0.125	16	0.125	2	1	8			2.8	0.47	<b>2.5</b>	<b>54.9</b>	3.1	Δ6 bp (723)
	3	256	512	64	32	128	64	0.5	8	4	32		T105A	<b>1490</b>	—	0.6	1.8	5.9	IS Pa (1635)
	5	1024	512	128	32	512	16	0.5	512	32	4		T105A	220	—	<b>2.8</b>	<b>71.8</b>	3.7	STOP (830)
	10	8	16	2	4	1	16	0.5	8	4	16			1.2	<b>0.16</b>	1.4	<b>27</b>	1.7	LESB58 variant
	13	1024	256	128	64	128	16	2	8	4	32		T105A	124	0.22	0.3	<b>16</b>	7.5	LESB58 variant
	17	128	64	8	16	16	8	2	4	1	8		T105A	90.7	0.64	0.6	<b>19.8</b>	2	LESB58 variant
	18	256	512	32	16	64	32	0.25	2	0.5	8		T105A	285	—	<b>2.7</b>	<b>31.6</b>	5.3	Δ2 bp (482)
	11	512	256	64	64	64	16	0.125	1	2	1		T105A	42	—	1.0	<b>60</b>	39	STOP (642)
3	9	128	128	16	8	16	16	4	4	2	8		T105A	<b>365.5</b>	—	<b>4.0</b>	<b>89</b>	10.6	+4 bp (314)
	10	1	1	1	4	0.25	32	1	2	1	8			7.2	—	0.5	<b>33</b>	3.2	STOP (17)
4	18	2	4	8	2	2	16	0.5	2	2	8			0.9	—	<b>2.5</b>	<b>59.4</b>	5.6	Δ10 bp (319)
5	1	1024	256	64	16	64	32	32	256	512	128	TEM-2	T105A	250	—	1.0	<b>57</b>	2.9	STOP (603)
	11	512	512	64	32	64	8	0.5	8	4	16		T105A	338	<b>0.16</b>	1.0	<b>50</b>	4.6	LESB58 variant
	15	512	256	64	32	64	64	4	128	64	256	VIM-2		1.1	—	1.3	<b>18.4</b>	2.8	STOP (711)
6	19	2	4	1	4	0.5	16	0.5	4	2	8			0.6	—	1.5	<b>91.8</b>	3.6	STOP (711)
	5	128	256	16	8	8	32	2	4	2	16		T105A	<b>26</b>	—	0.9	<b>48.3</b>	0.1	Δ2 bp (1145)
	6	16	128	16	8	16	32	1	16	2	32		T105A	<b>65</b>	—	<b>2.8</b>	<b>182.7</b>	23.7	+G (1106)
	14	1024	256	128	64	256	16	4	8	2	16		T105A	<b>25.5</b>	—	<b>2.5</b>	<b>50.5</b>	1.7	ΔC (681)
	15	128	128	16	8	16	32	0.5	2	1	8		T105A	<b>1144</b>	—	<b>2.1</b>	4.9	<b>111</b>	+C (1206)
	20	4	8	8	8	64	32	0.5	8	8	16			4.9	0.25	0.5	1.5	2.4	PA14 variant
7	3	2048	512	64	16	32	32	0.125	512	512	512	OXA-2	T105A	<b>82</b>	<b>0.08</b>	0.7	<b>23.8</b>	5.0	LESB58
	4	512	128	1	1	0.25	8	0.125	128	64	8	OXA-2		1.2	<b>0.07</b>	1.9	<b>53</b>	12.4	LESB58
	7	16	8	2	4	16	8	0.5	16	4	16			0.3	<b>0.03</b>	0.9	<b>12.3</b>	0.9	LESB58
	13	256	128	64	64	128	32	4	8	2	16			2.1 <sup>d</sup>	—	0.9	<b>57.1</b>	13.8	ΔG (1021)
	18	128	128	32	8	32	16	0.5	4	1	8		no	<b>166</b>	—	1.3	<b>17.7</b>	6.5	ΔG (433)
	20	512	32	32	256	128	16	2	64	32	256		no	<b>56.8</b>	<b>0.07</b>	<b>2.0</b>	<b>149</b>	<b>123</b>	LESB58
	22	32	64	8	8	2	32	8	16	8	32		T105A	<b>11.8</b>	—	0.7	<b>75</b>	21.8	+C (1206)
	10	16	16	4	8	4	64	2	8	4	16			9.2	—	0.5	<b>30.9</b>	1.2	ΔA (1166)
8	11	128	128	64	128	128	64	2	8	1	32		T105A	<b>57</b>	—	<b>2.8</b>	<b>240</b>	70	ΔA (1166)
	19	128	32	8	8	32	16	2	8	2	16			0.5	—	<b>6.4</b>	<b>66</b>	6.5	+C (1206)
	2	32	8	1	4	8	8	32	4	1	8			2.4	—	1.3	<b>32.3</b>	10.7	STOP (413)
9	9	16	8	4	8	4	16	0.25	8	2	16			7.5	—	0.1	<b>26.4</b>	1.6	+AC (657)
	12	512	256	32	16	64	32	0.5	4	1	8		T105A	<b>407.5</b>	—	<b>6.7</b>	<b>229</b>	<b>364</b>	Δ11 bp (1001)
	18	1024	128	64	128	128	32	2	32	8	64		T105A	<b>82</b>	—	0.7	<b>22.1</b>	7.5	STOP (424)
	2	512	256	128	64	128	64	8	16	2	32		T105A	<b>158</b>	—	<b>6.3</b>	<b>152</b>	49	+C (1206)
	10	1	0.5	0.5	2	0.5	16	1	4	0.5	8		T105A	<b>33.2</b>	—	1.5	<b>84.3</b>	1.8	Δ11 bp (379)
10	11	16	0.5	2	16	0.5	16	2	32	32	128			1.4	—	0.6	1.6	8.0	STOP (195)
	12	512	512	128	32	32	16	4	4	1	16		T105A	<b>325</b>	—	<b>9.2</b>	<b>192</b>	<b>168</b>	Δ STOP
	16	32	128	16	32	8	8	0.5	4	1	8		T105A	<b>13.9</b>	0.38	<b>4.4</b>	<b>84</b>	31	LESB58
	17	128	4	32	32	64	16	2	16	4	64		T105A	<b>12</b>	—	<b>2.4</b>	<b>37</b>	11.8	ΔC (736)
	18	512	256	32	32	128	16	4	8	2	16		T105A	<b>104.5</b>	—	<b>3.3</b>	<b>90</b>	12.4	Δ STOP
	19	128	512	64	32	64	64	8	8	4	32		T105A	<b>39.1</b>	—	<b>2.5</b>	<b>75</b>	20.6	ΔG (333)

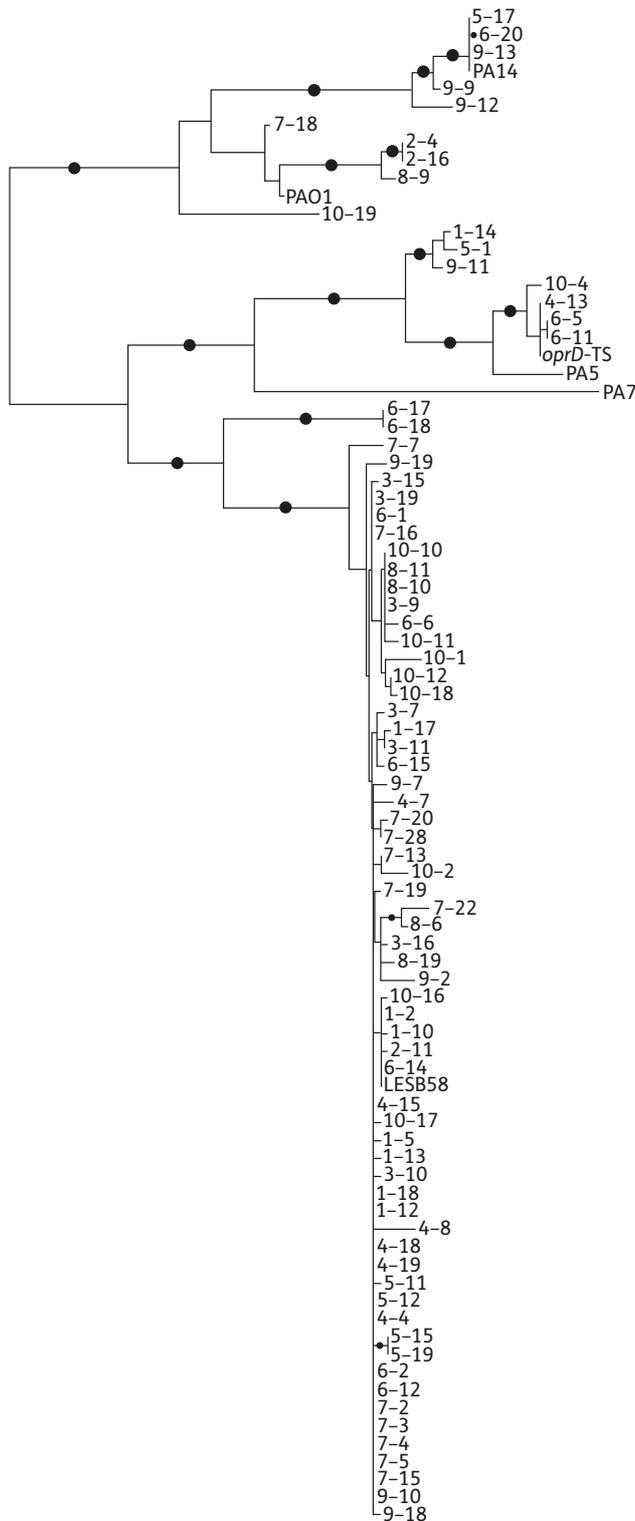
TIC, ticarcillin; PIP, piperacillin; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; IPM, imipenem; CIP, ciprofloxacin; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; AMK, amikacin.

<sup>a</sup>Sequencing of the *ampC* gene was performed for isolates showing AmpC overexpression.

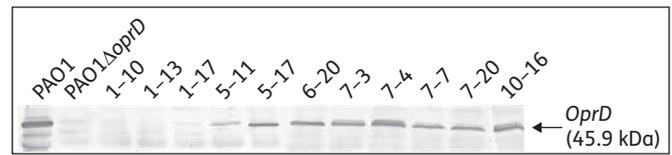
<sup>b</sup>Values in bold indicate a significant overexpression (or underexpression for *oprD*) of the corresponding gene according to the defined thresholds.

<sup>c</sup>The relative expression levels of *oprD* were determined in isolates with intact genes.

<sup>d</sup>This isolate was considered as an 'AmpC phenotype' since (i) 1000 mg/L cloxacillin increased the inhibition zones around β-lactams discs, (ii) a high β-lactamase activity was detected with nitrocefin, and (iii) no band other than AmpC was visualized on IEF gels.



**Figure 2.** Phylogenetic tree of the *oprD* sequences. Sequences of the *P. aeruginosa* reference strains are indicated by the name of the strain (PA14, PA01, PA5, PA7, LESB58). The *oprD*-TS allele belongs to the PP2 strain.<sup>50</sup> One thousand bootstrap replicates were computed; bootstrap values >80% are indicated on branches with filled circles.



**Figure 3.** Production of protein OprD in imipenem-resistant CF isolates exhibiting no frameshifting or nonsense mutations in the *oprD* gene. Outer membrane proteins were analysed by western blotting; they were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and probed with an anti-OprD polyclonal specific antibody. Fourteen micrograms of outer membrane proteins was used per lane for immunodetection of OprD. PAO1 and PAO1 $\Delta$ *oprD* were used as positive and negative controls, respectively.

primary colonization of young children is often cured but is later followed by stable recolonization with a single strain.<sup>21,44</sup>

To our knowledge, this is the first French multicentre study analysing the antibiotic susceptibility of a large collection of CF *P. aeruginosa*. As already noted previously,<sup>13,37,45</sup> CF strains become gradually more resistant to  $\beta$ -lactams with patient age as a consequence of the increased selective pressure exerted by multiple courses of aerosol and intravenous chemotherapy. Spencker *et al.*<sup>46</sup> suggested that this evolution might be slower for  $\beta$ -lactams than for aminoglycosides and quinolones. The present study confirms that three major mutational mechanisms contribute to the loss of  $\beta$ -lactam susceptibility in the CF context, namely the derepression of  $\beta$ -lactamase AmpC, the overproduction of efflux systems (MexXY/OprM, MexAB-OprM and MexEF-OprN) and the loss of porin OprD.<sup>13</sup> More importantly, we show here that these intrinsic mechanisms often randomly accumulate over time in late isolates, leading to complex resistance phenotypes that cannot be dissected without the help of molecular (e.g. RT-qPCR and DNA sequencing) and enzymatic techniques (e.g. IEF and spectrophotometric assays). In this evolution, the acquisition of secondary  $\beta$ -lactamases plays a modest role despite sporadic reports on extended-spectrum  $\beta$ -lactamases or metallo- $\beta$ -lactamases in CF *P. aeruginosa*,<sup>12,14,47</sup> as is the case here with metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2. In spite of intensive investigations, the  $\beta$ -lactam resistance of a minority of isolates (2/80) could not be elucidated, suggesting other mechanisms specific of CF strains.

Carbapenem resistance mostly relies on mutations resulting in deficient production of the specific porin OprD. As already described for CF strains, no correlation could be established between *oprD* disruption or underexpression and the isolate genotype.<sup>13,48</sup> In this collection, seven isolates overexpressing the MexEF-OprN efflux pump were identified, reinforcing the notion that these mutants are more represented among clinical strains than anticipated previously.<sup>49</sup> The repression of porin OprD that is concomitant with MexEF-OprN activation accounts for the higher resistance of these bacteria to carbapenems. Further investigations will be needed to better understand the emergence of these *nfxC* mutants in the clinical context.

### Acknowledgements

We are grateful to Thilo Köhler (Service of Infectious Diseases, University Hospital, Geneva, Switzerland) for providing the anti-OprD antibody used in western blotting experiments and Cédric Muller for providing primers

for DNA sequencing of *oprD*. We are grateful to Chantal Gros, Pascale McGill and Rodolphe Suspène for technical assistance.

### Members of the GERPA Study Group (Groupe d'Etude de la Résistance de *Pseudomonas aeruginosa*)

H. Vu-Thien (CHU Trousseau, Paris), R. Leclercq (CHRU Côte-de-Nacre, Caen), J.-P. Romaszko (CHRU Gabriel-Montpied, Clermont-Ferrand), C. Poyard (CHU Cochin, Paris), H. Marchandin (CHRU Arnaud-de-Villeneuve, Montpellier), E. Bingen (Hôpital Robert Debré, Paris), C. Segonds (CHU Rangueil, Toulouse), J. Caillon (CHU Hôtel Dieu, Nantes), M. Roussel-Delvallez (CHRU Calmette, Lille), G. Vergnaud (Institut de Génétique et Microbiologie, Orsay, France), D. Hocquet and P. Plésiat (CHRU Besançon) and J.-D. Cavallo (Bégin Military Hospital, Saint-Mandé).

### Funding

This work was supported by a grant from Wyeth-Lederle Pharmaceuticals. P. P. is supported by the French association for cystic fibrosis 'Vaincre la Mucoviscidose'.

### Transparency declarations

None to declare.

### Supplementary data

Table S1, Table S2 and Figure S1 are available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

### References

- Hauser AR, Jain M, Bar-Meir M et al. Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2011; **24**: 29–70.
- Bryan LE. Microbial persistence or phenotypic adaptation to antimicrobial agents: cystic fibrosis as an illustrative case. In: Bryan LE, ed. *Microbial Resistance to Drugs*. Berlin: Springer-Verlag, 1989; 411–8.
- Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect* 2003; **5**: 1213–9.
- Bagge N, Hentzer M, Andersen JB et al. Dynamics and spatial distribution of  $\beta$ -lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 1168–74.
- Oliver A, Canton R, Campo P et al. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000; **288**: 1251–4.
- Plasencia V, Borrell N, Macia MD et al. Influence of high mutation rates on the mechanisms and dynamics of *in vitro* and *in vivo* resistance development to single or combined antipseudomonal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 2574–81.
- Giwercman B, Lambert PA, Rosdahl VT et al. Rapid emergence of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients due to *in vivo* selection of stable partially derepressed  $\beta$ -lactamase producing strains. *J Antimicrob Chemother* 1990; **26**: 247–59.
- Vettoretti L, Plésiat P, Muller C et al. Efflux unbalance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 1987–97.
- Vogne C, Ramos-Aires J, Bailly C et al. Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 1676–80.
- Ballesteros S, Fernandez-Rodriguez A, Villaverde R et al. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother* 1996; **38**: 39–45.
- Campbell JI, Ciofu O, Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis have different  $\beta$ -lactamase expression phenotypes but are homogeneous in the *ampC-ampR* genetic region. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; **41**: 1380–4.
- Valenza G, Tappe D, Turnwald D et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2008; **7**: 123–7.
- Tomas M, Doumith M, Warner M et al. Efflux pumps, OprD porin, AmpC  $\beta$ -lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 2219–24.
- Pollini S, Fiscarelli E, Mugnaioli C et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis caused by an epidemic metallo- $\beta$ -lactamase-producing clone with a heterogeneous carbapenem resistance phenotype. *Clin Microbiol Infect* 2011; **17**: 1272–5.
- Godfrey AJ, Bryan LE, Rabin HR.  $\beta$ -Lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with modified penicillin-binding proteins emerging during cystic fibrosis treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; **19**: 705–11.
- Godfrey AJ, Hatlelid L, Bryan LE. Correlation between lipopolysaccharide structure and permeability resistance in  $\beta$ -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; **26**: 181–6.
- Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W et al. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 4062–70.
- Dumas JL, van Delden C, Perron K et al. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol Lett* 2006; **254**: 217–25.
- Hamzehpour MM, Pechère JC, Plésiat P et al. OprK and OprM define two genetically distinct multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; **39**: 2392–6.
- Köhler T, Michea-Hamzehpour M, Henze U et al. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 1997; **23**: 345–54.
- Vu-Thien H, Corbinau G, Hormigos K et al. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for longitudinal survey of sources of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 3175–83.
- Lee DG, Urbach JM, Wu G et al. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol* 2006; **7**: R90.
- Römling U, Kader A, Sriramulu DD et al. Worldwide distribution of *Pseudomonas aeruginosa* clone C strains in the aquatic environment and cystic fibrosis patients. *Environ Microbiol* 2005; **7**: 1029–38.
- Pier GB, Matthews WJ Jr, Eardley DD. Immunochemical characterization of the mucoid exopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Infect Dis* 1983; **147**: 494–503.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard M07-A8*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2009.
- Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. Extended-spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 1766–71.

- 27** Cavallo JD, Fabre R, Leblanc F *et al.* Antibiotic susceptibility and mechanisms of  $\beta$ -lactam resistance in 1310 strains of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study (1996). *J Antimicrob Chemother* 2000; **46**: 133–6.
- 28** Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Tubau F *et al.* Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 1906–11.
- 29** Cavallo JD, Hocquet D, Plésiat P *et al.* Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials: a 2004 French multicentre hospital study. *J Antimicrob Chemother* 2007; **59**: 1021–4.
- 30** Hocquet D, Roussel-Delvallez M, Cavallo JD *et al.* MexAB-OprM- and MexXY-overproducing mutants are very prevalent among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to ticarcillin. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 1582–3.
- 31** Epp SF, Köhler T, Plésiat P *et al.* C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 1780–7.
- 32** Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 2004; **32**: 1792–7.
- 33** Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 2010; **27**: 221–4.
- 34** Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* 1980; **16**: 111–20.
- 35** Gascuel O. BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol Biol Evol* 1997; **14**: 685–95.
- 36** Cheng K, Smyth RL, Govan JR *et al.* Spread of  $\beta$ -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet* 1996; **348**: 639–42.
- 37** Pitt TL, Sparrow M, Warner M *et al.* Survey of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from UK patients with cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents. *Thorax* 2003; **58**: 794–6.
- 38** Masuda N, Sakagawa E, Ohya S *et al.* Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 3322–7.
- 39** Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 4783–8.
- 40** Köhler T, Epp SF, Curty LK *et al.* Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1999; **181**: 6300–5.
- 41** Denamur E, Picard B, Decoux G *et al.* The absence of correlation between allozyme and *rrn* RFLP analysis indicates a high gene flow rate within human clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *FEMS Microbiol Lett* 1993; **110**: 275–80.
- 42** Picard B, Denamur E, Barakat A *et al.* Genetic heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates revealed by esterase electrophoretic polymorphism and restriction fragment length polymorphism of the ribosomal RNA gene region. *J Med Microbiol* 1994; **40**: 313–22.
- 43** Römling U, Wingender J, Müller H *et al.* A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl Environ Microbiol* 1994; **60**: 1734–8.
- 44** Sobral D, Mariani-Kurkdjian P, Bingen E *et al.* A new highly discriminatory multiplex capillary-based MLVA assay as a tool for the epidemiological survey of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; **31**: 2247–56.
- 45** Henwood CJ, Livermore DM, James D *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: results of a UK survey and evaluation of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy disc susceptibility test. *J Antimicrob Chemother* 2001; **47**: 789–99.
- 46** Spencker FB, Staber L, Lietz T *et al.* Development of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* obtained from patients with cystic fibrosis at different times. *Clin Microbiol Infect* 2003; **9**: 370–9.
- 47** Cardoso O, Alves AF, Leitao R. Metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cystic fibrosis patient. *Int J Antimicrob Agents* 2008; **31**: 375–9.
- 48** Turton JF, Turton SE, Yearwood L *et al.* Evaluation of a nine-locus variable-number tandem-repeat scheme for typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 2010; **16**: 1111–6.
- 49** Llanes C, Köhler T, Patry I *et al.* Role of the efflux system MexEF-OprN in low level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 5676–84.
- 50** Edalucci E, Spinelli R, Dolzani L *et al.* Acquisition of different carbapenem resistance mechanisms by an epidemic clonal lineage of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 2008; **14**: 88–90.
- 51** Hocquet D, Nordmann P, El Garch F *et al.* Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 1347–51.
- 52** Jeannot K, Sobel ML, El Garch F *et al.* Induction of the MexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction. *J Bacteriol* 2005; **187**: 5341–6.

### 3 ARTICLE 3

**La résistance aux carbapénèmes chez des souches de *Pseudomonas aeruginosa* issues de patients atteints de mucoviscidose peut résulter de substitutions d'acides aminés dans la porine OprD.**

Charlotte Richardot, Patrick Plésiat, Damien Fournier, Laura Monlezun, Isabelle Broutin et Catherine Llanes

Publié dans *International Journal of Antimicrobial Agents* en mai 2015.

Pour finir, la substitution S<sub>403</sub>P diminue partiellement la quantité de porine OprD dans la membrane. La croissance du mutant transcomplémenté en milieu minimum gluconate est d'ailleurs intermédiaire entre celles de PAO1 et de PAO1Δ*oprD*. En revanche, les CMI des 3 carbapénèmes sont identiques à celles de PAO1Δ*oprD*, montrant que les molécules de porine présentes dans la membrane ne permettent plus le passage des trois antibiotiques. La modélisation tridimensionnelle de cette porine suggère que la mutation S<sub>403</sub>P entrave la réorientation de la boucle périplasmique, qui peut ainsi obstruer partiellement le pore.

Ainsi, ce travail complémentaire de l'étude GERPA révèle que chez les souches CF, la « perte » de OprD peut être causée non seulement par une sous-expression du gène *oprD* ou la production d'un peptide aberrant mais également par de simples substitutions d'acides aminés dans la séquence protéique qui altèrent profondément la fonctionnalité de la porine.

### 3.2 TEXTE DE L'ARTICLE



## Short Communication

Carbapenem resistance in cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa* as a result of amino acid substitutions in porin OprDCharlotte Richardot<sup>a</sup>, Patrick Plésiat<sup>a</sup>, Damien Fournier<sup>a</sup>, Laura Monlezun<sup>b</sup>, Isabelle Broutin<sup>b</sup>, Catherine Llanes<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Laboratoire de Bactériologie EA4266, Faculté de Médecine-Pharmacie, Université de Franche-Comté, Besançon, France<sup>b</sup> UMR8015, Laboratoire de Cristallographie et RMN biologiques, Paris, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 8 October 2014

Accepted 30 December 2014

## Keywords:

*Pseudomonas aeruginosa*

Carbapenem resistance

OprD porin

Cystic fibrosis

## ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the impact of single amino acid substitutions occurring in specific porin OprD on carbapenem resistance of cystic fibrosis (CF) strains of *Pseudomonas aeruginosa*. A PAO1  $\Delta$ *oprD* mutant was complemented with the *oprD* genes from five carbapenem-resistant CF strains exhibiting very low amounts of mutated OprD porins in their outer membrane despite wild-type levels of *oprD* transcripts. Compared with wild-type porin from strain PAO1, single amino acid substitutions S<sub>403</sub>P (in periplasmic loop 8), Y<sub>242</sub>H, S<sub>278</sub>P and L<sub>345</sub>P (in  $\beta$ -sheets 10, 12 and 14, respectively) were found to result in reduced amounts of OprD in the outer membrane, increased carbapenem resistance, and slower growth in minimal medium containing gluconate, an OprD substrate, as the sole source of carbon and energy. This indicates that in CF strains of *P. aeruginosa*, loss of porin OprD may not only result from mutations downregulating the expression of or disrupting the *oprD* gene, but also from mutations generating deleterious amino acid substitutions in the porin structure.

© 2015 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

## 1. Introduction

Carbapenems are key antibiotics in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. However, resistance rates to these  $\beta$ -lactams have been reported to be gradually increasing in many countries because of the emergence and diffusion of strains producing carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamases (carbapenemases) [1] and/or that are deficient in porin OprD, the major route of entry of these molecules into the micro-organism [2]. Unless carbapenemases are produced, loss of OprD is usually associated with a 4- to 16-fold increase in the minimum inhibitory concentrations (MICs) of all carbapenems [3]. As shown by several recent studies [4,5], deficient OprD production mainly results from mutations or insertion sequences disrupting the *oprD* gene or its promoter region. In some strains, carbapenem resistance is associated with mutations occurring in genes (*parRS*, *mexS* and *czcS*) that are involved in the inverse co-regulation of expression of *oprD* and various efflux operons (*mexXY*, *mexEF-oprN* and *czcCBA*, respectively) [4]. Here we demonstrate for the first time that some single amino acid substitutions drastically decrease the stability and/or insertion in the outer membrane of the otherwise highly polymorphic porin and

account for the resistance to carbapenems of cystic fibrosis (CF) *P. aeruginosa* strains.

## 2. Materials and methods

## 2.1. Bacterial strains and plasmids

Recently, 5 (12%) of 42 imipenem-resistant (MICs > 8 mg/L) CF strains of *P. aeruginosa* (named 1–10, 1–13, 1–17, 5–11 and 6–20) were found to have poor or undetectable amounts of porin OprD in their outer membrane despite expression of their *oprD* genes similar to that of wild-type susceptible strains [5]. Sequencing of these genes revealed the presence of single amino acid substitutions (L<sub>345</sub>P, Y<sub>242</sub>H, S<sub>278</sub>P, V<sub>401</sub>A and S<sub>403</sub>P, respectively) in the corresponding OprD proteins compared with homologues from reference strains PAO1, LESB58 and PA14 [5]. An extensive search among the already edited OprD porins of *P. aeruginosa* (<http://www.pseudomonas.com>) led to the conclusion that these mutations were unique to these strains.

## 2.2. Mutant frequency

Phenotypic mutation frequencies of clinical isolates were determined by resistance to rifampicin based on the method described by Oliver et al. [6]. Strains giving rise to mutants able to resist

\* Corresponding author. Tel.: +33 3 63 08 22 76; fax: +33 3 63 08 22 32.  
E-mail address: [cllanesb@univ-fcomte.fr](mailto:cllanesb@univ-fcomte.fr) (C. Llanes).

10-fold the baseline resistance levels to rifampicin at rates  $\geq 20$ -fold that of reference strain PAO1 were considered as hypermutators.

### 2.3. Gene inactivation and complementation

A  $\Delta oprD$  mutant from reference strain PAO1 (<http://v2.pseudomonas.com>) was constructed and was complemented by genomic insertion of the five *oprD* genes and their respective promoter regions. Mutant PAO1 $\Delta oprD$  was obtained by using overlapping PCRs with specific primers (PCRioprD1, 5'-CAATTTGTGCACGGAGTTTG-3'; PCRioprD2, 5'-CAGGTCGTGTCTTCGATGAACCCCTTC-3'; PCRioprD3, 5'-GAAGACACGACTGAACCTAGCCTCCT-3'; and PCRioprD4, 5'-GGGGTGTTCGAGAGTAA-3') and recombination events as described previously [7]. Allelic exchange and deletion of 910 bp in the *oprD* gene were confirmed by PCR and DNA sequencing. Then, the *oprD* genes of clinical strains were amplified from whole DNA extracts using the oligonucleotide pair IntoprDCh1 (5'-CGGAAGCTTAGCCATTTTCCAATTTGTGC-3') and IntoprDCh2 (5'-GCCGATCCGGGTGTTTTTCGAGAGTAA-3'). The PCR conditions used were as follows: 5 min of denaturation at 98 °C; 30 amplification cycles each consisting of 30 s at 98 °C, 30 s at 61 °C and 2 min at 72 °C; with a final extension step at 72 °C for 7 min. The resulting 1828 bp DNA fragments were cloned into the *Bam*HI/*Hind*III restricted plasmid mini-CTX1 and were then transferred from *Escherichia coli* CC118 to *P. aeruginosa* PAO1 $\Delta oprD$  by conjugation [8]. A control recombinant strain, named CRPAO1, complemented with the wild-type *oprD* allele of PAO1 was engineered in parallel.

### 2.4. Immunodetection of OprD

Immunoblotting experiments were carried out on purified outer membrane extracts or whole-cell lysates with an OprD-specific polyclonal antiserum (diluted 1:10,000) as reported previously [9].

### 2.5. Susceptibility testing and growth conditions

All of the bacterial strains were cultured at 37 °C in Mueller–Hinton broth (MHB) or on Mueller–Hinton agar (MHA), both of them containing adjusted concentrations of divalent cations (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). MICs were determined by the serial two-fold macrodilution method in MHA according to protocols recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (<http://www.clsi.org>). Bacterial growth experiments were carried out in MHB and minimal medium supplemented with 0.5 mM gluconate as previously described [10].

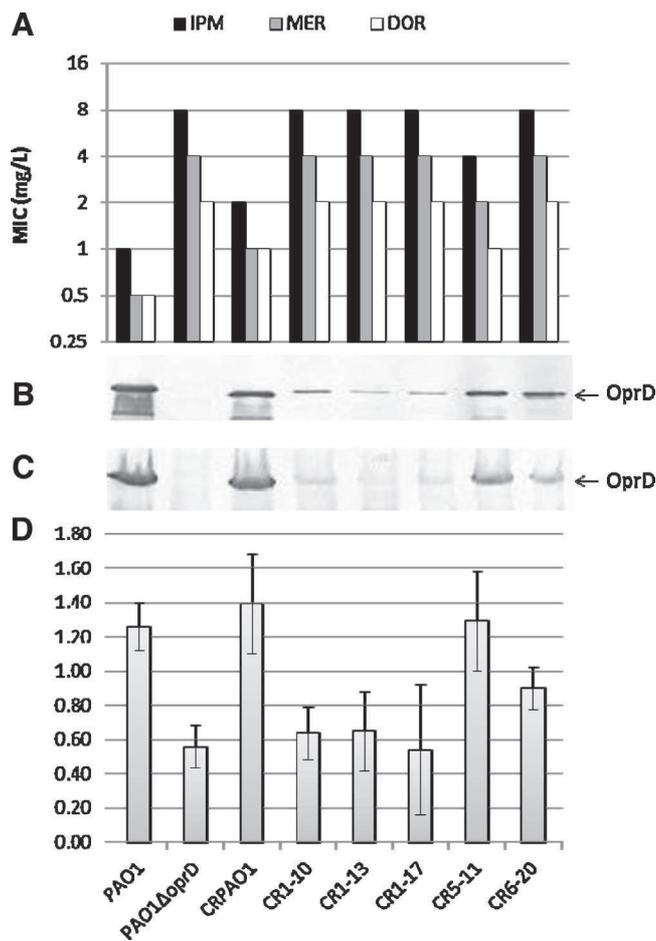
### 2.6. OprD structural bioinformatics analysis

The amino acid substitutions were mapped on the most recently solved structure of OprD (Protein Data Bank code: 3SY7) using the Coot program [11]. The geometry was refined locally using planar peptide restraints. All of the graphical representations were performed using PyMOL software (<http://pymol.sourceforge.net/>).

## 3. Results and discussion

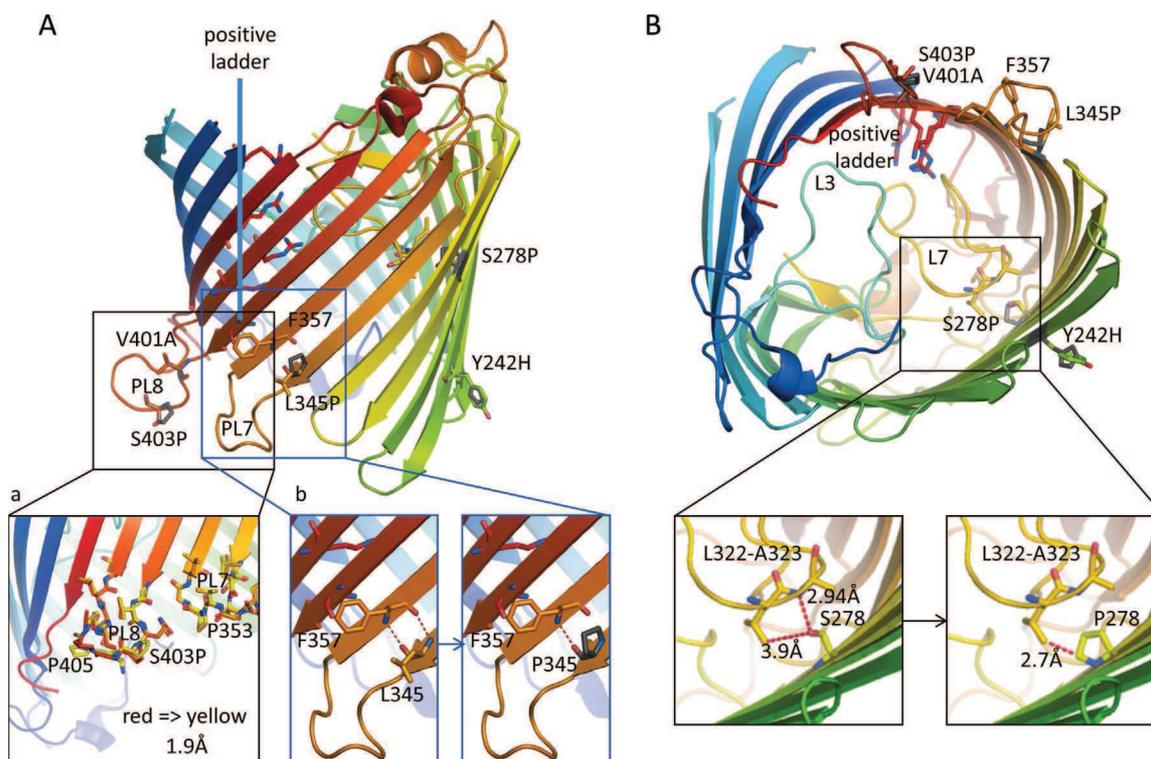
Complementation of PAO1 $\Delta oprD$  with the various *oprD* alleles failed to fully restore carbapenem susceptibility in four of the five transconjugants. Indeed, CR1-10, CR1-13, CR1-17 and CR6-20 appeared to be two- to four-fold less susceptible than CRPAO1 to imipenem, meropenem and doripenem (Fig. 1A). These recombinant strains were also as resistant as PAO1 $\Delta oprD$  to carbapenems.

Very low amounts of the OprD variants could be detected in CR1-10, CR1-13 and CR1-17 (Fig. 1B), suggesting that the



**Fig. 1.** (A) Resistance levels, (B, C) OprD immunoblots and (D) growth rates of PAO1  $\Delta oprD$  trans-complemented mutants. (A) Minimum inhibitory concentrations (MICs) of imipenem (IPM), meropenem (MER) and doripenem (DOR) were determined at least twice in two independent experiments. (B, C) Detection of porin OprD by western blotting in outer membrane extracts (B) and whole-cell lysates (C) of mutants CRPAO1, CR1-10, CR1-13, CR1-17, CR5-11 and CR6-20. (D) Growth rates of PAO1  $\Delta oprD$  trans-complemented mutants were measured in minimal medium with 0.5 mM gluconate as the sole carbon source.

corresponding amino acid substitutions ( $L_{345}P$ ,  $Y_{242}H$  and  $S_{278}P$ , respectively) might either prevent insertion of the porin into the outer membrane or make the protein more susceptible to enzymatic degradation in the cytoplasm or in the periplasmic space. Indeed, some misfolded proteins are known to form aggregates that are rapidly degraded by periplasmic proteases [12]. Consistent with this, only low levels of these OprD variants could be detected in whole-cell lysates from CR1-10, CR1-13 and CR1-17 by western blotting (Fig. 1C). Since OprD allows the uptake of gluconate [10], we measured the growth rates of complemented strains in minimal medium with gluconate as the sole carbon source and in MHB for comparison. CR1-10, CR1-13 and CR1-17 exhibited a growth rate similar to that of PAO1  $\Delta oprD$  (growth rate 0.56), compatible with the slight amounts of porin present in these strains (Fig. 1D). Conversely, in MHB medium all of the transconjugants grew at the same rates as CRPAO1 (data not shown), confirming that in minimal medium with gluconate bacterial growth solely relies upon OprD-dependent penetration of the substrate into the cells. To evaluate the impact of the different mutations on porin architecture, we mapped the corresponding amino acid variations on the structure of OprD. Possibly accounting for defective insertion of the OprD variants into the outer membrane, the model predicted that: (i) the  $L_{345}P$  substitution (CR1-10), located at the extremity of strand



**Fig. 2.** Cartoon representation of the structure of OprD with the amino acid substitutions L<sub>345</sub>P, Y<sub>242</sub>H, S<sub>278</sub>P, V<sub>401</sub>A and S<sub>403</sub>P in ball and stick. Some additional residues, the positively charged ladder (constituted by amino acids R<sub>53</sub>, K<sub>398</sub>, R<sub>412</sub>, R<sub>414</sub> and R<sub>433</sub>) as well as residues L<sub>322</sub>, A<sub>323</sub> and F<sub>357</sub> are indicated for clarity. (A) View of the porin through the outer membrane. Inset (a) presents in ball and stick all the residues constituting periplasmic loops PL7 and PL8 in order to highlight the possible displacement of loop PL8 owing to the S<sub>403</sub>P mutation. Amino acid residues in red show the wild-type position of the loop; those in yellow show the modifications that could be induced by the S<sub>403</sub>P substitution. Inset (b) represents the wild-type interaction between L<sub>345</sub> and F<sub>357</sub>, and the breaking of the hydrogen bond between the carbonyl of P<sub>345</sub> and the nitrogen of F<sub>357</sub>. (B) Perpendicular view. The insets represent a scaled-up view of the interactions between residue 278 and loop L7 before and after mutation. It highlights the possible steric hindrance between S<sub>278</sub>P and residue L<sub>322</sub>. In addition, the  $\beta$ -sheet could be twisted by the introduction of a proline that could lead to destabilisation of the whole pore.

S14, could destabilise the end of this strand by breaking the hydrogen bond between the carbonyl of L<sub>345</sub> and the nitrogen of F<sub>357</sub> and impact the orientation of the PL7 periplasmic loop; (ii) Y<sub>242</sub>H (CR1-13) introduces a positive charge in the acidic environment of the periplasmic space, as it is localised outside of the pore structure, close to the inner side of the outer membrane; and (iii) S<sub>278</sub>P (CR1-17), located in S12, could both destabilise this strand and change amino acid interactions into the pore by creating a steric hindrance with L<sub>322</sub> from one of the loops responsible for the inner constriction of the pore, the loop L7 (Fig. 2).

The complemented strain CR6-20 exhibited carbapenem resistance despite the presence of significant amounts of OprD in the outer membrane (Fig. 1B). Based on our model of OprD, the S<sub>403</sub>P mutation in this variant might modify the orientation of the periplasmic loop PL8, thereby disturbing the nearby positively charged molecular ladder (Fig. 2), which promotes the passage of carbapenems through the pore [13]. Consistent with this, CR6-20 exhibited an intermediate growth rate of 0.9 compared with that of the positive and negative controls (CRPAO1 and PAO1 $\Delta$ oprD, respectively) (Fig. 1D). Carbapenem resistance in CR6-20 would thus result from both the presence of reduced amounts of OprD in the outer membrane and lower penetration rates of carbapenems through the porin channel, a hypothesis that would require electrophysiology techniques for confirmation.

In the last complemented strain, CR5-11, which produced notable amounts of OprD (Fig. 1B), carbapenem susceptibility was partially restored in comparison with CRPAO1, suggesting that the V<sub>401</sub>A substitution, located in periplasmic loop PL8, does not play a major role in resistance. A trivial explanation would be that a component of the Bam transport machinery, which delivers porins

to the outer membrane, is impaired in the parental strain 5–11, thus leading to carbapenem resistance. Supporting this notion, decreased expression of one Bam component in an in vitro mutant has been reported to significantly affect the ability of porin OprF to localise into the outer membrane [14].

OprD polymorphism could be considered as a consequence of the well-known hypermutable phenotype of *P. aeruginosa* CF strains. To confirm this, we determined mutant frequencies leading to rifampicin resistance for strains 1–10, 1–13, 1–17, 5–11 and 6–20. As expected, all of them exhibited higher ( $\geq 20$ -fold) mutation rates ( $4.1 \times 10^{-7}$ ,  $2.6 \times 10^{-6}$ ,  $2.0 \times 10^{-6}$ ,  $4.8 \times 10^{-7}$  and  $2.9 \times 10^{-6}$ , respectively) compared with PAO1 ( $7.6 \times 10^{-9}$ ), indicating that CF isolates are hypermutators.

#### 4. Conclusion

In conclusion, this study shows that single amino acid substitutions located in periplasmic loops or in  $\beta$ -sheets may result in very low levels of porin OprD in the outer membrane and thus impermeability to carbapenems. Contrary to OprD-deficient mutants, those harbouring permeability-impairing amino acid substitutions in the porin structure require extensive analyses for their identification. This is probably why such mutants have rarely been reported among clinical strains of *P. aeruginosa* and remain under-recognised. Sanbongi et al. suggested that the G<sub>314</sub>D substitution in L7 could impact carbapenem resistance levels [15]. This substitution, initially identified in an in vitro mutant selected for its resistance to carbapenems, was further observed in a clinical strain. Because of its carboxylic group, D<sub>314</sub> might cause a significant change to the porin conformation [15]. Anyway,

compared with frameshifting mutations in the *oprD* gene [4,5], amino acid changes appear to be less frequent but still significant (12%) among imipenem-non-susceptible isolates in the context of CF where the strains are exposed to repeated antibiotic treatments and evolve rapidly because of hypermutator phenotypes.

### Acknowledgments

The authors wish to thank Romé Voulhoux (LISM CNRS, University Aix-Marseille, France) for helpful discussions, Fabrice Poncet (SFR FED 4234, Besançon, France) for DNA sequencing data, and Thilo Köhler (Service of Infectious Diseases, University Hospital, Geneva, Switzerland) for providing the OprD antibody used in western blotting experiments. The authors are also grateful to the members of the GERPA Study Group (Groupe d'Etude de la Résistance de *Pseudomonas aeruginosa*) for providing imipenem-resistant cystic fibrosis strains of *P. aeruginosa*.

**Funding:** This work was supported by a grant from the French 'Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche'.

**Competing interests:** None declared.

**Ethical approval:** Not required.

### References

- [1] Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36(Suppl. 3):S8–14.
- [2] Trias J, Nikaido H. Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:52–7.
- [3] Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 2009;22:582–610.
- [4] Fournier D, Richardot C, Müller E, Robert-Nicoud M, Llanes C, Plésiat P, et al. Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:1772–80.
- [5] Llanes C, Pourcel C, Richardot C, Plésiat P, Fichant G, Cavallo JD, et al. Diversity of  $\beta$ -lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:1763–71.
- [6] Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000;288:1251–4.
- [7] Muller C, Plésiat P, Jeannot K. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and  $\beta$ -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:1211–21.
- [8] Hoang TT, Kutchma AJ, Becher A, Schweizer HP. Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* 2000;43:59–72.
- [9] Epp SF, Pechère J, Kok M. Raising antibodies against OprD, an outer membrane protein of *Pseudomonas aeruginosa* using translational fusions to MalE. *J Microbiol Methods* 2001;46:1–8.
- [10] Huang H, Hancock RE. Genetic definition of the substrate selectivity of outer membrane porin protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1993;175:7793–800.
- [11] Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D: Biol Crystallogr* 2004;60:2126–32.
- [12] Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* 1999;286:1888–93.
- [13] Biswas S, Mohammad MM, Patel DR, Movileanu L, van den Berg B. Structural insight into OprD substrate specificity. *Nat Struct Mol Biol* 2007;14:1108–9.
- [14] Hoang HH, Nickerson NN, Lee VT, Kazimirova A, Chami M, Pugsley AP, et al. Outer membrane targeting of *Pseudomonas aeruginosa* proteins shows variable dependence on the components of Bam and Lol machineries. *MBio* 2011;2, pii: e00246–11.
- [15] Sanbongi Y, Shimizu A, Suzuki T, Nagaso H, Ida T, Maebashi K, et al. Classification of OprD sequence and correlation with antimicrobial activity of carbapenem agents in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates collected in Japan. *Microbiol Immunol* 2009;53:361–7.

## 4 RESULTATS COMPLEMENTAIRES DE L'ETUDE OPRD :

### 4.1 LA RESISTANCE AUX CARBAPENEMES PEUT RESULTER DE LA SOUS-EXPRESSION DU GENE *OPRD*

#### 4.1.1 Impact de mutations dans le promoteur de *oprD*

Parmi les 42 souches de l'étude GERPA-CF résistantes à l'imipénème, nous avons montré que (i) 32 produisent un peptide OprD aberrant en raison d'un décalage du cadre de lecture du gène, (ii) 5 possèdent une porine avec une substitution à l'origine de la résistance à l'imipénème, et (iii) 5 renferment une porine de type LESB58, peu visible sur les immunoblots membranaires. Nous avons mesuré les niveaux de transcrits *oprD* de ces 5 dernières souches (7-3, 7-4, 7-7, 7-20 et 10-16) : 4 d'entre elles sous-expriment significativement (plus de 10 fois) le gène *oprD* en comparaison à PAO1 (*Tableau 8*). Afin de comprendre les raisons de cette sous-expression, le gène *oprD* ainsi que sa région promotrice ont été séquencés, la sous-expression pouvant être causée par l'insertion d'une IS dans le promoteur du gène *oprD*. Seules 2/4 souches (7-3 et 7-4) présentent une mutation de l'adénine située 45 nucléotides en amont du codon ATG (A<sub>45</sub>C) (*Tableau 8*).

Afin d'évaluer l'impact de cette substitution nous avons intégré une copie du gène *oprD* et de la région promotrice mutée (souche 7-3) ou non (souche 7-20) dans le chromosome de la souche PAO1 $\Delta$ *oprD*, aboutissant à la construction des souches CR7-3 et CR7-20. Un témoin (CRPAO1) a été construit en complétant la souche PAO1 $\Delta$ *oprD* avec le gène *oprD* de PAO1. La mesure par RT-qPCR des niveaux de transcrits *oprD* montre que cette construction CRPAO1 exprime le gène *oprD* au même niveau que la souche parentale PAO1 (*Tableau 8*). La sous-expression observée chez l'isolat clinique 7-3 (0,08 en comparaison à PAO1) n'est pas reproduite chez la

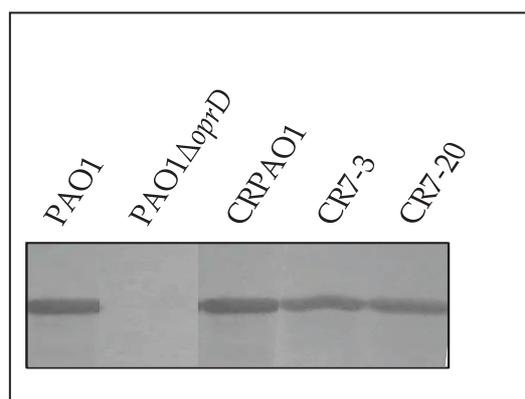
souche transcomplémentée CR7-3, indiquant que la mutation A<sub>45</sub>C n'est pas à l'origine de la sous-expression de *oprD*. Confirmant ces résultats, les niveaux de résistance aux carbapénèmes (imipénème, méropénème et doripénème) des souches CR7-3 et CRPAO1 s'avèrent identiques (Tableau 8).

**Tableau 8 : Etude de la sous-expression de *oprD* sur la résistance aux carbapénèmes des souches GERPA-CF.**

Souche	Séquence promotrice	Niveaux de transcrits <i>oprD</i> <sup>b</sup>	CMI (µg/mL)		
			IPM	MEM	DOR
PAO1	WT	1	1	0,5	0,5
PAO1Δ <i>oprD</i>	WT	ND	16	4	2
7-3	A <sub>45</sub> C	<b>0,08</b>	32	64	128
7-4	A <sub>45</sub> C	<b>0,07</b>	8	16	16
7-7	WT	<b>0,03</b>	8	2	1
7-20	WT	<b>0,08</b>	8	2	4
10-16	WT	0,38	8	0,5	1
CRPAO1 <sup>a</sup>	WT	1	2	1	0,5
CR7-3 <sup>a</sup>	A <sub>45</sub> C	1,2	2	1	0,5
CR7-20 <sup>a</sup>	WT	1,2	2	1	0,5

<sup>a</sup>CR : Transconjugants PAO1Δ*oprD* complétés par le gène *oprD* et sa région promotrice de la souche clinique correspondante. <sup>b</sup>Les niveaux de transcrits considérés comme significativement sous-exprimés sont en caractères gras.

ND : non déterminé, IPM : imipénème, MEM : méropénème, DOR : doripénème.



**Figure 35 : Western blotting de la porine OprD dans la membrane externe chez les mutants transcomplétés dont le promoteur du gène *oprD* est muté (A<sub>45</sub>C).**

De la même manière, la complémentation de PAO1Δ*oprD* avec la séquence issue de la souche 7-20 ne modifie, ni l'expression de *oprD*, ni la CMI des carbapénèmes. Enfin, le gène *oprD* pouvant être soumis à une régulation post-transcriptionnelle, nous avons purifié les protéines de membrane externe et évalué la quantité de porine par Western blotting après hybridation avec un

anticorps polyclonal anti-OprD (Figure 35). Les souches CR7-3 et CR7-20 produisent une quantité de porine similaire aux souches PAO1 et CRPAO1, confirmant les résultats précédents.

Au final, ces résultats indiquent que la sous-expression du gène *oprD* chez les 4 souches CF n'est pas liée à la séquence de leur promoteur mais plus vraisemblablement à une répression transcriptionnelle exercée par un régulateur. Le gène *oprD* pouvant être inversement co-régulé avec la surproduction de certains systèmes d'efflux (MexXY/OprM, MexEF-OprN et CzcCBA), nous nous sommes intéressés au statut de ces 3 systèmes d'efflux actif chez les 4 souches cliniques 7-3, 7-4, 7-7 et 7-20.

#### 4.1.2 Implication des régulateurs des systèmes d'efflux actif

La quantification relative des transcrits des gènes *mexE*, *mexY* et *czcR* montre que les 4 souches surexpriment l'opéron *mexXY*, la souche 7-20 surexprimant en plus l'opéron *mexEF-oprN* (Tableau 9).

**Tableau 9 : Niveaux de transcrits et séquences protéiques des gènes régulateurs de *mexEF-oprN* et *mexXY* chez les souches CF sous-exprimant le gène *oprD*.**

Souche	Niveaux de transcrits <sup>a</sup>					Séquences protéiques <sup>b</sup>		
	<i>oprD</i>	<i>mexE</i>	<i>mexY</i>	<i>PA1797</i>	<i>czcR</i>	ParR	ParS	MexT
PAO1	1	1	1	1	1	WT	WT	+8pb
PA14	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	WT
7-3	<b>0,08</b>	5	<b>23,8</b>	0,02	3,6	Q <sub>53</sub> Stop	WT	ND
7-4	<b>0,07</b>	12,4	<b>53</b>	0,01	6,8	Q <sub>53</sub> Stop	WT	ND
7-7	<b>0,03</b>	0,9	<b>12,3</b>	<b>19,9</b>	3,1	WT	<b>G<sub>388</sub>S</b>	ND
7-20	<b>0,07</b>	<b>123</b>	<b>149</b>	<b>119,5</b>	7,2	WT	<b>A<sub>395</sub>T</b>	<b>WT</b>

ND : non déterminé. <sup>a</sup> en gras sont indiquées les valeurs significativement différentes de celles de la souche de référence PAO1. <sup>b</sup> +8pb : insertion de 8pb inactivant le gène. Les régulateurs probablement impliqués dans la répression de *oprD* sont indiqués en rouge.

L'opéron *mexXY* étant inversement co-régulé avec *oprD* par le TCS ParRS, nous avons mesuré les niveaux de transcrits d'une cible de ce TCS : *PA1797* (Muller *et al.*, 2011). Seules 2/4 souches (7-7 et 7-20) surexpriment également ce gène. Le séquençage de *parR* et *parS* révèle qu'elles présentent chacune une substitution (G<sub>388</sub>S et A<sub>395</sub>T respectivement) dans la protéine ParS, probablement à l'origine de l'augmentation des transcrits *mexXY* et *PA1797*, ainsi que de la répression de *oprD* (Fournier *et al.*, 2013; Muller *et al.*, 2011). En revanche, chez les souches 7-3 et 7-4, la surexpression de *mexXY* est liée à un autre mécanisme de régulation (MexZ ou altération de la synthèse protéique), sans lien avec *oprD* car *parR* est inactivé par un codon stop prématuré en position 53 (*Tableau 9*).

Les 4 souches surexpriment également le gène *czcR* (*Tableau 9*). Ce gène code pour le régulateur de réponse CzcR qui, lorsqu'il est surexprimé, réprime *oprD* (Caille *et al.*, 2007). Cependant, lors de l'étude GESPAR, il a été montré que *czcR* est surexprimé plus de 50 fois chez la souche PAO1 cultivée en présence de zinc (300 mM), ce qui suggère que les niveaux d'expression des 4 souches étudiées ici (< 10 fois) (*Tableau 9*) ne sont pas significatifs.

La souche 7-20 surproduit par ailleurs le système d'efflux MexEF-OprN (mutant *nfxC*). Dans ce cas, le gène *oprD* est réprimé par le régulateur transcriptionnel MexT dont la séquence est sauvage (*Tableau 9*). Au final, chez cette souche, la sous-expression de *oprD* résulte à la fois de l'action du TCS ParRS et de celle du régulateur MexT.

## 4.2 IDENTIFICATION DE 7 MUTANTS *NFXC* DANS LA COLLECTION GERPA-CF

De façon inattendue, l'étude GERPA nous a permis d'identifier au total 7 mutants *nfxC* CF qui surexprimaient le gène *mexE* au moins 100 fois plus que PAO1 (*Tableau*

10). Ces mutants étant rarement décrits parmi les souches cliniques et considérés comme peu virulents quand sélectionnés *in vitro*, la question se pose des mécanismes leur permettant de coloniser les patients et de persister. Afin de caractériser ces nouveaux mutants, nous avons entrepris le séquençage des gènes codant pour l'activateur transcriptionnel MexT et l'oxydoréductase MexS, tous deux impliqués dans la régulation de *mexEF-oprN*. Quatre souches affichent des substitutions dans la protéine MexS (souches 4-7, 9-7 et 10-1) ou MexT (10-12) dont l'impact sur l'opéron d'efflux n'a pas été évalué ici. Les 3 souches restantes produisent des protéines MexS et MexT sauvages et renfermant donc des mutations encore inconnues à l'origine de la surexpression de *mexEF-oprN* (Tableau 10). Le séquençage d'autres gènes régulateurs de *mexEF-oprN* (*mvaT*, *ampR*) s'est révélé négatif. Nous aurons l'occasion de constater dans les pages suivantes que cette situation n'est pas rare dans les souches cliniques.

**Tableau 10 : Niveaux relatifs de transcrits du gène *mexE* et séquences protéiques de MexS et MexT chez les mutants *nfxC* de la collection de souches GERPA-CF.**

Souche	Taux de transcrits de <i>mexE</i> <sup>a</sup>	Phénotype	Séquence protéique	
			MexS	MexT <sup>b</sup>
PAO1	1	WT	N <sub>249</sub> D	+8pb
PAO7H	265	<i>nfxC</i>	N <sub>249</sub> D	WT
4-7	294	<i>nfxC</i>	G <sub>39</sub> S	WT
6-15	111	<i>nfxC</i>	WT	WT
7-20	123	<i>nfxC</i>	WT	WT
9-7	162	<i>nfxC</i>	R <sub>267</sub> C	WT
9-12	364	<i>nfxC</i>	WT	WT
10-1	246	<i>nfxC</i>	F <sub>259</sub> L	WT
10-12	168	<i>nfxC</i>	WT	A <sub>136</sub> T + G <sub>257</sub> A

<sup>a</sup> : par rapport à PAO1 ; <sup>b</sup> : chez PAO1, le gène *mexT* est inactivé par l'insertion de 8pb décalant le cadre de lecture. La délétion de ces 8pb restaure le cadre de lecture (WT).

Si les fluoroquinolones, antibiotiques substrats de MexEF-OprN, sont connues pour sélectionner aisément des mutants *nfxC in vitro*, on ne connaît pas les circonstances d'émergence de ces mutants chez les malades. Des travaux effectués précédemment au laboratoire ont montré que leur sélection était difficile voire impossible *in vitro* avec la ciprofloxacine inhibitrice (2µg/mL et 4µg/mL, respectivement) (Llanes *et al.*, 2011). Chez les patients, la concentration des antibiotiques varie dans le temps, selon les doses administrées, les tissus, l'efficacité des voies d'élimination, etc... et peut être suboptimale (inférieure à la CMI). Nous avons donc essayé de sélectionner des mutants *nfxC*, au laboratoire, en utilisant des concentrations subinhibitrices de ciprofloxacine.

### 4.3 SELECTION DE MUTANTS *NFXC IN VITRO*

La souche PA14 (MexT actif) a été cultivée en bouillon MH pendant 4 jours en présence de concentrations subinhibitrices de ciprofloxacine (1/4, 1/2 et 1 fois la CMI). Au total, 266 mutants de sensibilité réduite à la ciprofloxacine ont été isolés. La stabilité de leur phénotype a été vérifiée par 2 repiquages successifs sur gélose MH puis sur MH additionné de ciprofloxacine. Seuls 143 mutants se sont avérés stables. Afin d'analyser un maximum d'événements différents, nous n'avons retenus que les isolats jugés différents sur la base de leur phénotype (profil de résistance aux antibiotiques, pigmentation, taille des colonies), soit 79 mutants au total. Puis, des expériences de RT-qPCR ciblant le gène *mexE* ont abouti à la sélection de 52 mutants *nfxC* surexprimant *mexEF-oprN* de manière significative (de 38 à 815 fois plus que la souche sauvage PA14).

#### 4.3.1 Effet des concentrations de ciprofloxacine sur la sélection de mutants *nfxC* *in vitro*

Confirmant les résultats antérieurs obtenus au laboratoire, la sélection de mutants *nfxC* s'avère maximale avec les plus faibles concentrations de ciprofloxacine. En effet, à 0,03 µg/mL (¼ de la CMI) 90% des mutants sélectionnés sont de type *nfxC* et seulement 54% à 0,12 µg/mL (1x CMI) (Figure 36).

De plus, la fréquence d'apparition des mutants *nfxC* diminue au cours du temps après 1, 2, 3 ou 4 jours d'exposition à l'antibiotique. En effet, après 24h de croissance, la proportion de mutants *nfxC* varie de 80 à 100%, alors qu'elle chute entre 30 et 40 % après 4 jours de contact avec la ciprofloxacine. Cette diminution est d'autant plus significative que la concentration en antibiotique est élevée (Figure 37).

La sélection de mutants *nfxC* serait alors optimale avec des faibles concentrations de ciprofloxacine (0,03 µg/mL) et au début de l'exposition. Bien que les autres mécanismes de résistance aux fluoroquinolones (mutations dans les QRDR, surproduction d'autres systèmes d'efflux de type Mex) n'aient pas été recherchés dans ce travail, les mutants résistants non-*nfxC*, présentaient un profil de résistance évoquant celui des mutants *nfxB* (surproduisant de la pompe MexCD-OprJ). Cependant la surexpression de ce système n'a pas été vérifiée par RT-qPCR.

#### 4.3.2 Origine génétique de la surexpression de *mexEF-oprN*

Afin de déterminer si les différentes concentrations et durées d'exposition sélectionnaient des événements génétiques différents, nous avons séquencé les gènes *mexS* et *mexT* de 26 mutants choisis au hasard dans chacune des conditions. Le gène *mexS* est apparu inactivé par insertion ou délétion d'un ou plusieurs nucléotide(s) chez 20/26 isolats (Tableau 11). Ces altérations sont toutes différentes à l'exception de la délétion de l'alanine en position 355 ( $\Delta A_{355}$ ), retrouvée chez 2 mutants. Seuls 6/26

mutants possèdent des substitutions d'acides aminés, l'une d'entre elles étant commune à 3 mutants (A<sub>133</sub>D). D'après le logiciel *SIFT algorithm* ([http://sift.jcvi.org/www/SIFT\\_BLink\\_submit.html](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_BLink_submit.html)), aucune de ces substitutions ne serait tolérée ; elles entraveraient la fonction de la protéine MexS, et seraient par conséquent, responsables de la surexpression de *mexEF- oprN* (Tableau 11).

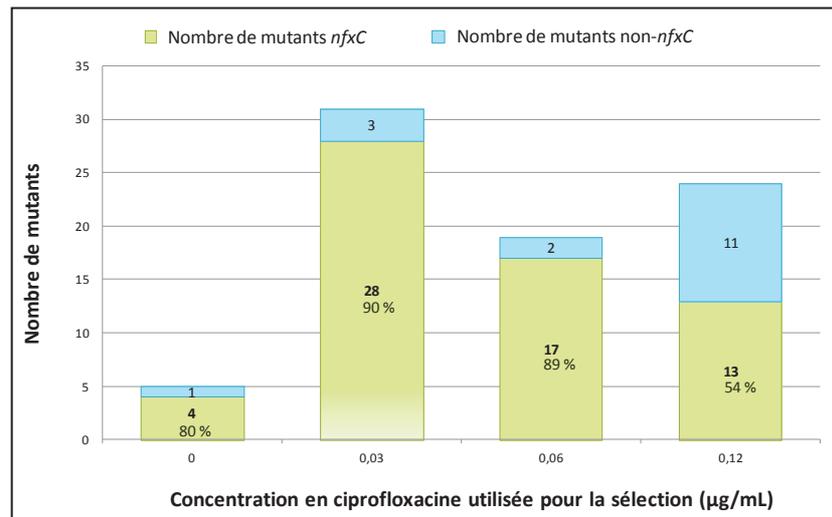


Figure 36 : Mutants *nfxC* (n = 62) /non *nfxC* (n = 17) sélectionnés sur différentes concentrations de ciprofloxacine ; le pourcentage de mutants *nfxC* est indiqué.

Contrairement aux observations faites avec les mutants *nfxC* cliniques de la collection GERPA-CF, ces résultats démontrent que la ciprofloxacine sélectionne *in vitro* des mutations dans *mexS*, conduisant dans la majorité des cas à l'inactivation totale du gène par des *indels*. Chez l'ensemble des mutants, les CMI de la ciprofloxacine (substrat de MexEF-OprN) et de l'imipénème (substrat de la porine OprD) sont au moins 4 fois supérieures à celles obtenues avec la souche parentale PA14. Seul, un isolat montre une résistance à la ciprofloxacine 256 fois supérieure à celle de PA14, suggérant un mécanisme additionnel associé à la surexpression de *mexEF-oprN* (Tableau 11). Au final, aucune corrélation n'a pu être établie entre le type d'altération de MexS et les conditions de sélection (concentration de ciprofloxacine utilisée et durée de contact). De la même façon, aucun événement génétique particulier n'a pu

être relié aux valeurs de CMI, même si les niveaux de transcrits les plus faibles sont retrouvés chez les mutants dont la protéine MexS est porteuse d'une mutation ponctuelle.

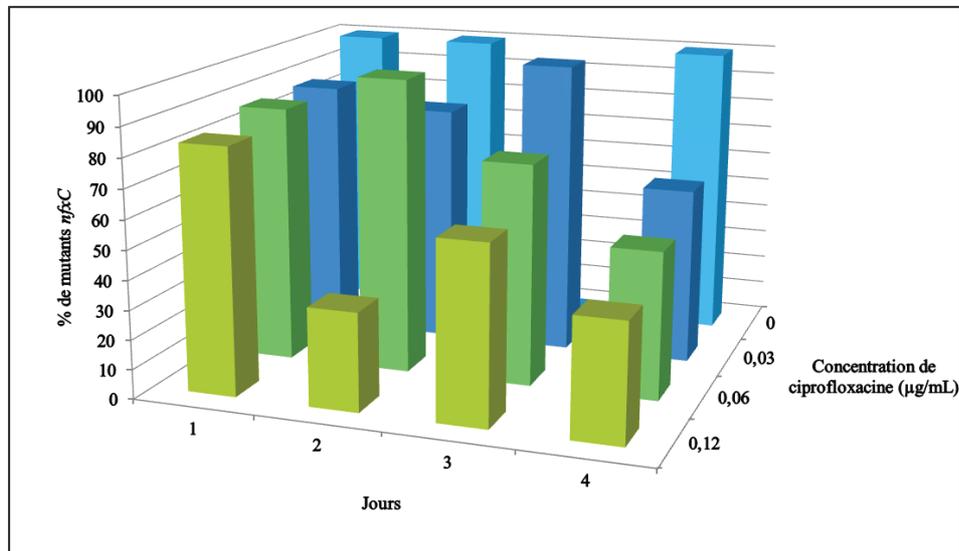


Figure 37 : Pourcentage de mutants *nfxC* sélectionnés au cours du temps, en fonction de la concentration de ciprofloxacine. La valeur de 100% (bleu clair) obtenue sans pression de sélection (0 µg/mL ciprofloxacine) correspond à l'isolement d'un seul mutant *nfxC* spontané à 1, 2 et 4 jours.

Il est remarquable de constater que des concentrations de ciprofloxacine très peu inhibitrices ( $1/4$  de la CMI) suffisent à sélectionner des mutants *nfxC* affichant des niveaux de résistance tout à fait significatifs sur le plan thérapeutique (concentrations critiques EUCAST 2015 :  $S \leq 0,5 \mu\text{g/mL}$  ;  $R > 1 \mu\text{g/mL}$ ). Tous les mutants analysés sauf un restent toutefois sensibles à l'imipénème. Ces résultats concordent avec ceux d'autres études (Jørgensen *et al.*, 2013; Tanimoto *et al.*, 2008) sur les effets de la ciprofloxacine en tant que promoteur de résistance chez *P. aeruginosa*, même si les mécanismes sélectionnés semblent varier selon les conditions expérimentales et la souche parentale utilisés.

**Tableau 11 : Analyse de 26 mutants *nfxC* dérivés de PA14 et sélectionnés sur des concentrations sub-inhibitrices de ciprofloxacine.**

Souches	Conditions de sélection		Mutations		Niveaux de transcrit <i>mexF</i>	CMI (µg/mL)		
	CIP (µg/mL)	Jour	<i>mexS</i>	<i>mexT</i>		CIP	IPM	
<i>Témoins</i>								
PA14	-	-	WT	WT	1	0,12	1	
PA14-31	-	-	Δ 1 pb <sup>282</sup>	WT	55	2	ND	
<i>Mutants nfxC</i>								
CJ1 0 (1)	0	1	Δ14 pb <sup>725-738</sup>	WT	456,4	4	4	
AJ1 3 (1)	0,03	1	Δ10 pb <sup>65-75</sup>	WT	491,7	2	2	
BJ1 3(3)			C <sub>398</sub> A→A <sub>133</sub> D	WT	45,9	1	2	
CJ1 3 (2)			Δ13 pb <sup>62-74</sup>	WT	504,7	4	4	
CJ1 3 (3)			+C <sub>733</sub>	WT	583,8	4	4	
AJ2 3 (1)			2	C <sub>994</sub> T→R <sub>332</sub> W	WT	170,9	0,5	2
BJ2 3 (5)				C <sub>398</sub> A→A <sub>133</sub> D	WT	68,0	2	2
BJ3 3 (2)		3	C <sub>398</sub> A→A <sub>133</sub> D	WT	189,2	1	2	
CJ3 3 (2)			Δ17 pb <sup>230-246</sup>	WT	426,3	2	4	
CJ4 3 (3)			ΔA <sub>914</sub>	WT	445,9	4	4	
CJ4 3 (4)			Δ6 pb <sup>911-916</sup>	WT	274,6	2	2	
CJ1 6 (3)	0,06	1	Δ14 pb <sup>353-366</sup>	WT	320,6	2	2	
CJ1 6 (1)			Δ4 pb <sup>124-127</sup>	WT	537,4	2	4	
CJ1 6 (2)			Δ14 pb <sup>809-822</sup>	WT	507,6	4	4	
AJ1 6 (1)			Δ13 pb <sup>857-869</sup>	WT	626,7	2	2	
AJ2 6 (2)			2	Δ13 pb <sup>74-86</sup>	WT	505,4	2	2
BJ3 6 (1)				3	C <sub>272</sub> A→A <sub>91</sub> D	WT	680,2	2
CJ4 6 (1)	4	+9 pb <sup>749-757</sup>	WT		338,3	2	2	
BJ4 6 (1)		+T <sub>318</sub>	WT	283,1	4	4		
AJ1 12 (1)	0,12	1	A <sub>823</sub> T→G <sub>275</sub> C	WT	280,8	2	2	
CJ1 12 (1)			ΔA <sub>355</sub>	WT	362,4	4	4	
CJ1 12 (2)			ΔA <sub>355</sub>	WT	452,3	4	4	
CJ3 12 (1)			3	Δ2 pb <sup>769-770</sup>	WT	514,0	4	4
CJ3 12 (2)				+5 pb <sup>907-911</sup>	WT	815,5	32	4
BJ3 12 (2)			4	ΔA <sub>275</sub>	WT	390,6	4	8
BJ4 12 (2)	ΔC <sub>270</sub>	WT		306,7	4	4		

ND : non déterminé. WT : identique à PA14 ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)). La traduction en acides aminés est indiquée (ex : C<sub>398</sub>A → A<sub>133</sub>D).

## 5 ARTICLE 4

**Chez les isolats cliniques *nfxC* de *Pseudomonas aeruginosa*, les altérations de MexS sont pour la plupart des substitutions.**

Charlotte Richardot, Paulo Juarez, Katy Jeannot, Isabelle Patry, Patrick Plésiat et Catherine Llanes.

Soumis à *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* en octobre 2015, en révision.

## 5.1 RÉSUMÉ

*Pseudomonas aeruginosa* est un germe dont la pathogénicité dans les infections chroniques et aiguës dépend de la production de tout un arsenal de facteurs de virulence et de sa résistance à de nombreux antibiotiques. Lorsqu'elles sont surproduites, les pompes d'efflux de type RND, participent largement à cette résistance qui peut toucher plusieurs familles d'antibiotiques différentes. L'un de ces systèmes, MexEF-OprN, est exprimé à un niveau basal très faible chez les souches sauvages et participe donc peu à la résistance naturelle de la bactérie. Chez les mutants *nfxC*, la surproduction de la pompe MexEF-OprN est responsable d'une augmentation (de 4 à 16 fois) des CMI du chloramphénicol, du triméthoprime et des fluoroquinolones, ainsi que de la résistance aux carbapénèmes en raison de la répression du gène *oprD* par le régulateur transcriptionnel MexT. Malgré cela, les mutants *nfxC*, tout du moins ceux sélectionnés *in vitro*, semblent accumuler des déficits pouvant altérer leur capacité à infecter les patients, tels que (i) leur sensibilité accrue à certains antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines et des aminosides (associée à la sous-expression de MexAB-OprM et MexXY(OprM), respectivement) mais surtout (ii) leur moindre virulence (élastase, pyocyanine, rhamnolipides, biofilm et *swarming*). L'expérience que nous avons au laboratoire de ces mutants nous laisse toutefois penser qu'ils pourraient être différents dans les souches cliniques et que leur faible prévalence est sous-estimée car leur détection est peu aisée. C'est pourquoi, nous avons criblé systématiquement, pendant un an, les souches isolées au CHRU de Besançon pour rassembler une collection substantielle de 43 mutants *nfxC*. L'analyse de 22 mutants non-redondants a révélé qu'ils étaient toujours capables de produire les facteurs de virulence précédemment cités. Par ailleurs, l'hypersensibilité aux  $\beta$ -lactamines et aux aminosides n'a pas été retrouvée chez ces isolats, suggérant l'existence éventuelle de mutations compensatrices permettant de maintenir l'activité des pompes MexAB-OprM et MexXY/OprM.

Contrairement à ce qui est observé *in vitro*, la surproduction de MexEF-OprN était rarement causée par l'inactivation totale du gène *mexS* et de son produit (4/22 isolats), mais due le plus souvent à des modifications mineures entravant l'activité de cette enzyme (8/22 isolats). L'analyse des variants de MexS chez une souche PA14 $\Delta$ *mexS* a montré que ces modifications, sélectionnées préférentiellement chez les patients, permettaient aux transformants de continuer à produire un certain nombre de facteurs de virulence. Enfin, de manière intéressante, 46% (10/22) des mutants *nfxC* n'ont pas présenté de modifications dans aucun des régulateurs connus (MexT, MexS, AmpR ou MvaT) du système d'efflux, suggérant l'existence d'autres voies de régulation à découvrir.

## 5.2 TEXTE DE L'ARTICLE

1 **Amino acid substitutions account for most MexS alterations in clinical *nfxC***  
2 **mutants of *Pseudomonas aeruginosa***

3  
4 Charlotte Richardot<sup>a</sup>, Paulo Juarez<sup>a</sup>, Katy Jeannot<sup>ab</sup>, Isabelle Patry<sup>b</sup>, Patrick Plésiat<sup>ab</sup>,  
5 Catherine Llanes<sup>a,\*</sup>.

6  
7  
8 <sup>a</sup>Laboratoire de Bactériologie EA4266, Faculté de Médecine-Pharmacie, Université de  
9 Franche-Comté, Besançon, France

10 <sup>b</sup>Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, France

11  
12  
13  
14 \*Corresponding author

15 Tel : (33) 3 63 08 22 76 ;

16 Fax : (33) 3 63 08 22 32 ;

17 E-mail : [cclanesb@univ-fcomte.fr](mailto:cclanesb@univ-fcomte.fr)

18  
19  
20 Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, efflux, MexEF-OprN, clinical strains, antibiotic  
21 resistance

22 Running title: *nfxC* clinical mutants of *P. aeruginosa*

23 **Abstract**

24

25 Multidrug resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* that overproduce the active efflux system  
26 MexEF-OprN (called *nfxC* mutants) have rarely been characterized in the hospital setting. Screening  
27 of 221 clinical strains exhibiting a reduced susceptibility to ciprofloxacin (a substrate of MexEF-OprN)  
28 and imipenem (a substrate of the negatively co-regulated porin OprD) led to the identification of 43  
29 (19.5%) *nfxC* mutants. Subsequent analysis of 22 non-redundant mutants showed that in contrast to  
30 *in vitro* selected counterparts only 3 of them (13.6%) harbored a disrupted gene *mexS*, which codes  
31 for oxydoreductase MexS whose inactivation is known to activate operon *mexEF-oprN* through LysR-  
32 type regulator MexT. Nine (40.9%) of the clinical *nfxC* mutants contained single amino acid mutations  
33 in MexS, associated with moderate effects on resistance and virulence factor production in 8/9  
34 strains. Finally, the remaining 10 (45.5%) *nfxC* mutants did not display mutations in any of the  
35 regulators known to control *mexEF-oprN* expression (genes *mexS*, *mexT*, *mvaT*, *ampR*), confirming  
36 that other loci are responsible for the pump upregulation in patients. Collectively, these data  
37 demonstrate that *nfxC* mutants are probably more frequent in the hospital than previously thought,  
38 and have genetic and phenotypic features somewhat different from those of *in vitro* selected  
39 mutants, especially in terms of virulence.

40

41

## 42 Introduction

43

44 *Pseudomonas aeruginosa* is a notorious cause of acute and chronic infections in vulnerable patients.

45 The ability of this environmental Gram-negative bacterium to produce a broad range of virulence

46 factors (Gellatly and Hancock 2013) and to become resistant to multiple antimicrobial agents is

47 considered as key to its success in the hospital setting. When overexpressed upon mutations, several

48 efflux systems belonging to the RND (Resistance Nodulation cell Division) family of drug transporters

49 are able to decrease the susceptibility of the pathogen to structurally-unrelated antibiotics (Poole

50 and Srikumar 2001). One of these systems, named MexEF-OprN, is quiescent in wild-type strains

51 grown under standard laboratory conditions. Its contribution to the intrinsic resistance of

52 *P. aeruginosa* is therefore minimal. In contrast, in so-called *nfxC* mutants stable overproduction of

53 the pump results in a significant increase in minimal inhibitory concentrations (MICs x 4-16-fold) of

54 chloramphenicol, trimethoprim, and fluoroquinolones (Köhler *et al.* 1997). Compared with wild-type

55 strains, typical *nfxC* mutants exhibit a hypersusceptibility to some antipseudomonal  $\beta$ -lactams

56 (penicillins, cephalosporins) and aminoglycosides, a phenotype possibly due to impaired activity of

57 two other RND pumps, namely MexAB-OprM and MexXY/OprM (Li *et al.* 2000). Furthermore, this

58 typical NfxC phenotype includes a decreased susceptibility to carbapenems, linked to down-

59 regulation of gene *oprD* that codes for the specific porin channel allowing the facilitated diffusion of

60 these antibiotics into the cell (Köhler *et al.* 1997).

61 In *P. aeruginosa*, while most RND pumps have their expression modulated by repressors (Schweizer

62 2003), transcription of operon *mexEF-oprN* is controlled by a LysR-type activator, MexT, encoded by

63 an adjacent gene (Köhler *et al.* 1999). In some drug-susceptible laboratory strains of the PAO1

64 lineage, *mexT* is inactivated by an 8-bp insert (Maseda *et al.* 2000). Spontaneous excision of this

65 intragenic fragment restores the ORF of *mexT* with concomitant overexpression of *mexEF-oprN* and

66 development of the typical NfxC phenotype (Köhler *et al.* 1999). In other strains, *mexEF-oprN*

67 transcription is triggered by mutations in another gene, *mexS*, which is divergently transcribed from  
68 *mexT* and encodes an oxidoreductase (Sobel *et al.* 2005). In any case, a functional MexT is mandatory  
69 for *in vitro* selection of MexEF-OprN overproducing mutants. This regulator has been reported to  
70 increase *mexS* expression (Köhler *et al.* 1999) even if the consensus *nod*-box DNA sequence,  
71 considered as the binding site of MexT, remains to be identified in the promoter region of *mexS* (Tian  
72 *et al.* 2009). To explain the MexS/MexT-dependent regulation of *mexEF-oprN*, it has been postulated  
73 that MexS is involved in detoxification of some endogenously-produced MexT-activating molecule(s)  
74 (Fargier *et al.* 2012 ; Frisk *et al.* 2004). In this scenario, if not processed by MexS, the toxic  
75 metabolite(s) would be exported out of the cell by MexEF-OprN as a rescue mechanism.

76 In clinical strains, *nfxC* mutations are difficult to characterize because of polymorphic variations in  
77 the MexS and MexT protein sequences (<http://pseudomonas.com>). Moreover, data suggest that still  
78 uncharacterized pathways might influence *mexEF-oprN* expression (Llanes *et al.* 2011). Supporting  
79 this notion, *in vitro* mutants with alterations in gene *mvaT*, *ampR*, or *mxtR* have been reported to  
80 overexpress *mexEF-oprN* and to exhibit a multidrug resistance phenotype (Balasubramanian *et al.*  
81 2012 ; Westfall *et al.* 2006 ; Zaoui *et al.* 2012). However, the relevance of such mutations in clinical  
82 strains awaits confirmation.

83 *In vitro*-selected *nfxC* mutants were also found to be deficient in production of several quorum  
84 sensing-dependent virulence factors (Köhler *et al.* 2001) without apparent loss of fitness (Olivares *et*  
85 *al.* 2012). The mutants derived from reference strain PAO1 typically produced less pyocyanin,  
86 rhamnolipids, and elastase than wild-type parents (Köhler *et al.* 1997 ; Köhler *et al.* 2001), and less  
87 Type-III Secretion System (T3SS) effector toxin ExoS (Linares *et al.* 2005). This phenotype was  
88 attributed to (i) reduced intracellular levels of PQS (Pseudomonas Quinolone Signal) caused by the  
89 shortage of a metabolic precursor (kynurenin or HHQ) exported by the pump (Lamarche and Deziel  
90 2011 ; Olivares *et al.* 2012), and (ii) MexT which acts as global regulator and indirectly impairs T3SS in  
91 a MexEF-OprN-independent way (Linares *et al.* 2005).

92 Information about the rates and traits of *nfxC* mutants in CF (Jalal *et al.* 2000 ; Llanes *et al.* 2013) and  
93 non-CF patients (Fukuda *et al.* 1990 ; Llanes *et al.* 2011 ; Oh *et al.* 2003 ; Pumbwe and Piddock 2000)  
94 remains scarce. As a plausible explanation, the low virulence of these mutants would be detrimental  
95 to their survival in the host or in the hospital setting, and would account for their unfrequent  
96 isolation from clinical samples. Alternatively, these mutants would be phenotypically and genetically  
97 distinct from their *in vitro* counterparts (i.e., keeping some degree of pathogenicity or persistence),  
98 and thus would be under-recognized. In this study, we show that most clinical *nfxC* mutants have  
99 mild defects in MexS and are still able to produce substantial amounts of virulence factors.

100

101

## 102 **Materials and Methods**

103

104 **Bacterial strains, plasmids and growth conditions.** The reference strains and cloning plasmids used  
105 in this study are listed in Table I. Twenty-two clinical *nfxC* mutants collected between May 2012 and  
106 May 2013 at the University Hospital of Besançon (Table S1) and 7 drug-susceptible strains of *P.*  
107 *aeruginosa* collected from surface waters (PE1, PE1346, PE1361, PE1393, PE1423, PE1446, and  
108 PE1450) were also investigated. All the bacterial cultures were grown in Mueller-Hinton broth (MHB)  
109 with adjusted concentrations of Ca<sup>2+</sup> (from 20 to 25 mg L<sup>-1</sup>) and Mg<sup>2+</sup> (from 10 to 12.5 mg L<sup>-1</sup>) (Becton  
110 Dickinson and Company, Cockeysville, MD), or on Mueller-Hinton agar (MHA) (Bio-Rad, Marnes-la-  
111 Coquette, France). *Escherichia coli* transformants were selected on MHA containing 50 µg mL<sup>-1</sup>  
112 kanamycin (marker of vector pCR-Blunt), 15 µg mL<sup>-1</sup> tetracycline (mini-CTX1), or 50 µg mL<sup>-1</sup>  
113 streptomycin (pKNG101). Recombinant plasmids were introduced into *P. aeruginosa* strains by  
114 triparental matings and mobilization with broad-host range vector pRK2013 in *E. coli* HB101, as a  
115 helper strain (Ditta *et al.* 1980). Transconjugants were selected on Pseudomonas Isolation Agar (PIA;  
116 Becton, Dickinson and Company) supplemented with 200 µg mL<sup>-1</sup> tetracycline, or 2,000 µg mL<sup>-1</sup>  
117 streptomycin, as required. Excision of pKNG101 was obtained by selection on M9 minimal medium  
118 (8.54mM NaCl, 25.18mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 18.68mM NH<sub>4</sub>Cl, 22mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2mM MgSO<sub>4</sub>, pH7.4)  
119 supplemented with 5% sucrose and 0.8% agar.

120

121 **Antibiotic susceptibility testing.** The Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of selected  
122 antibiotics were determined by the standard serial 2-fold dilution method in MHA with inocula of 10<sup>4</sup>  
123 CFU per spot, according to CLSI recommendations (Clinical and Laboratory Standards Institute 2009).  
124 Growth was assessed visually after 18h of incubation at 37°C.

125

126 **RT-qPCR experiments.** Specific gene expression levels were measured by Real-Time, quantitative PCR  
127 (RT-qPCR) after reverse transcription, as described previously (Dumas *et al.* 2006). Briefly, 2µg of  
128 total RNA were reverse transcribed with ImpromII reverse transcriptase as specified by the  
129 manufacturer (Promega; Madison, WI). The amounts of specific cDNA were assessed in a Rotor Gene  
130 RG6000 instrument (Qiagen, Courtaboeuf, France) by using the QuantiFast SYBR PCR green Kit  
131 (Qiagen). When not already published, the primers used for amplification were designed from the  
132 gene sequences available in the *Pseudomonas* Genome Database version 2, by using primer3  
133 software ([www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3\\_www.cgi](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi)) (Table II). The mRNA levels of  
134 target genes were normalized for each strain with those of housekeeping gene *rpsL*, and expressed  
135 as a ratio to wild-type reference strain PA14. Mean gene expression values were calculated from two  
136 independent bacterial cultures, each assayed in duplicate. Strain PA14ΔS was used as a positive  
137 control for gene *mexE* overexpression. As shown in preliminary experiments, transcript levels of  
138 *mexE* ≥ 20-fold above that of PA14 were considered as significant as all associated with a decreased  
139 susceptibility (≥ 2-fold) of strains to MexEF-OprN substrate antibiotics.

140

141 **Virulence assays.** Biofilm production was assessed by measuring bacterial adhesion to 96-well  
142 polystyrene plates (Vasseur *et al.* 2007). Cultures in triplicate were incubated in MHB medium  
143 overnight at 30°C and washed twice with 200µL of distilled water to eliminate planktonic  
144 bacteria. Attached bacteria were colored by 1% (wt/vol) crystal violet and solubilized by ethanol 99%  
145 (vol/vol). Attachment was evaluated at 600nm and considered as negative when OD < 1, as  
146 previously reported (Lamarche and Deziel 2011).

147 Swarming motility was tested on freshly prepared M8 medium (42.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,  
148 7.8 mM NaCl, pH 7.4) supplemented with 2mM MgSO<sub>4</sub>, 0.5 % casein, 0.5% agar, and 1% glucose  
149 (Köhler *et al.* 2000). After 15 min incubation of the plates at 37°C, 5 µL of culture (7.5 10<sup>5</sup> CFU) were  
150 spotted onto the medium surface, with strain PA14 as positive control. The formation of dendrites

151 after 24h of culture at 37°C was considered as a positive result (+), while a steady spot was  
152 considered negative (-).

153 Elastase activity was assessed by using MH plates supplemented with 4 mg mL<sup>-1</sup> elastin-Congo red  
154 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO), and inoculated with 5 µL volumes of bacterial suspension (7.5 10<sup>5</sup>  
155 CFU). Enzymatic degradation of the substrate formed clear halos around culture spots after 48h  
156 incubation at 37°C (Ohman *et al.* 1980). The absence of visible halo was considered as a negative  
157 result.

158 Rhamnolipid production was appreciated using a haemolysis assay. Briefly, after 18h of growth at  
159 37°C in agitated MHB, bacterial supernatants containing rhamnolipids were collected and mixed with  
160 defibrinated horse blood diluted 1/100 (vol/vol) in PBS. After 30 min of incubation at room  
161 temperature, the mixture was centrifuged for 10 min at 950 *g*. Concentration of haemoglobin in  
162 supernatants was determined spectrophotometrically at 405nm. OD values were expressed as  
163 percentage of complete haemolysis by Triton X100 (by definition 100%). The results presented are  
164 mean values from two independent experiments. Haemolytic activity was considered as significantly  
165 reduced when lower than 50% of the control.

166 Finally, pyocyanin assays were carried out on culture supernatants after 18h of  
167 growth at 37°C in a specific broth (120 mM Tris HCl pH 7.2, 0.1 % tryptones, 20 mM  
168 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.6 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 24 mM sodium citrate, and 50 mM glucose).  
169 The pigment was extracted from cultures with chloroform (1 volume) and mixed  
170 with 0.1M HCl (0.06 volume) before spectrophotometric measurement at 520 nm  
171 (Essar *et al.* 1990). Results are mean values from two independent experiments.  
172 Pyocyanin production was considered as significantly reduced when lower than 50%  
173 that of reference strain PA14 grown under the same conditions.

174 The virulence of individual clinical strains was rated by a global score, ranging from 0 to 5, that  
175 corresponds to the number of positive or significant results obtained with each of the 5 assays  
176 mentioned above.

177

178 **Construction of deletion mutants from strain PA14.** Single *mexS* and *mexT* deletion mutants were  
179 constructed by using overlapping PCRs and recombination events, as described by Kaniga *et al.*  
180 (Kaniga *et al.* 1991). First, the 5' and 3' regions flanking *mexS* (417 and 433 pb, respectively) and  
181 *mexT* (408 and 453 bp, respectively) were individually amplified by PCR with specific primers (Table  
182 II) under the following conditions: 3 min of denaturation at 98°C followed by 30 cycles of  
183 amplification each composed of 10s at 98°C, 30s at 60°C, and 30s at 72°C, with a final extension step  
184 of 7 min at 72°C. The resultant amplicons were used as templates for overlapping PCRs with external  
185 pairs of primers (Table II) to generate the mutagenic DNA fragments. The reaction mixtures  
186 contained: iProof™ HF Master Mix 1x, 3% DMSO and 0.5 μM of each primer (Bio-Rad). The amplified

187 products were cloned into plasmid pCR-Blunt according to the manufacturer's instructions  
188 (Invitrogen, Carlsbad, CA) and next subcloned as BamHI/ApaI fragments into the suicide vector  
189 pKNG101 in *E. coli* CC118 $\lambda$ pir (Kaniga *et al.* 1991). The recombinant plasmids were transferred into  
190 *P. aeruginosa* by conjugation and selected on PIA containing 2,000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  streptomycin. The excision  
191 of undesired pKNG101 sequence was performed by plating transformants on M9 plates containing  
192 5% (wt/vol) sucrose and 1% (wt/vol) glucose. Negative selection on streptomycin was carried out to  
193 confirm the loss of the plasmid. The allelic exchanges were confirmed by PCR. Nucleotide sequencing  
194 experiments confirmed deletion of 826 bp in *mexS* and 929 bp in *mexT*, yielding strains PA14 $\Delta$ S and  
195 PA14 $\Delta$ T, respectively.

196

197 **Chromosomal complementation with full-length *mexS* and *mexT*.** A search of mutations in genes  
198 *mexS* and *mexT*, as well as in intergenic regions *mexS-mexT* and *mexT-mexE* was performed on 43  
199 clinical strains by using primers listed in Table II. The mutated genes *mexS* and *mexT* along with their  
200 respective promoter regions were amplified by PCR from purified genomic DNA. The resulting DNA  
201 fragments were cloned into plasmid pCR-Blunt and next ligated to BamHI/HindIII linearized plasmid  
202 mini-CTX1 (Hoang *et al.* 2000). The recombinant plasmids were then transferred from *E. coli* CC118  
203 to *P. aeruginosa* strains PA14 $\Delta$ *mexS* or PA14 $\Delta$ *mexT* by conjugation with subsequent selection on PIA  
204 plates containing 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  tetracycline, to allow their chromosomal insertion into the *attB* site.  
205 Chromosomal integration was ascertained by PCR and sequencing.

## 206 **Results and Discussion**

207

208 **Wild-type genes *mexS* and *mexT*.** PAO1 (Köhler *et al.* 1997 ; Sobel *et al.* 2005 ; Tian *et al.* 2009),  
209 PA14 (Fargier *et al.* 2012), and PAK (Jin *et al.* 2011) have alternatively been used as "wild-type"  
210 reference strains in studies on efflux pump MexEF-OprN. However, genes *mexS* and *mexT* in these  
211 strains show a non-silent sequence polymorphism whose impact on functionality of encoded

212 proteins MexS and MexT remained to be clarified. For instance, in addition to carrying an 8-bp  
213 intragenic fragment inactivating *mexT* (Maseda *et al.* 2000), most of the laboratory strains of the  
214 PAO1 lineage differ from PA14 (or PAK) by an aspartic acid residue (D) at position 249 in MexS  
215 instead of an asparagine (N) (<http://pseudomonas.com>).

216 Because protein MexS-D249 was considered as either functional (Maseda *et al.* 2000) or non-  
217 functional (Jin *et al.* 2011), we deleted *mexS* in both PA14 and PAO1, and compared the effects of  
218 this deletion on *mexEF-oprN* expression and antibiotic resistance. In PA14, suppression of *mexS*  
219 (strain PA14ΔS) resulted in a strong increase in *mexE* transcription (427-fold) and a 16- to 32-fold  
220 higher resistance to MexEF-OprN substrates, as in typical *nfxC* mutants (Table III). As expected,  
221 complementation of PA14ΔS with the PA14 *mexS* allele (PA14ΔS<sub>PA14</sub>) restored the drug-susceptible  
222 phenotype. In contrast, the PAO1 *mexS* allele had virtually no impact on the resistance levels of  
223 strain PA14ΔS (strain PA14ΔS<sub>PAO1</sub>), and failed to reverse overexpression of *mexE*, whose transcripts  
224 remained 87-fold more abundant than in PA14. Consistent with PAO1 producing both MexS (D249)  
225 and MexT inactive peptides, spontaneous excision of the 8-bp extra-sequence inserted in *mexT* is  
226 known to trigger MexEF-OprN production in this strain, with MexT recovering its functionality in a  
227 non-functional MexS background (Kumar and Schweizer 2011). Confirming that MexS-N249 is  
228 functional (and not MexS-D249), analysis of 7 drug-susceptible strains of *P. aeruginosa* collected  
229 from surface waters (PE1, PE1346, PE1361, PE1393, PE1423, PE1446 and PE1450) showed that all of  
230 them encoded MexS-N249 together with an active MexT (without any insertion in gene *mexT*) (data  
231 not shown). Based on these results, we therefore used strain PA14 instead of PAO1 in further  
232 experiments to investigate the functionality of MexS and MexT from clinical *nfxC* mutants.

233

234 **Selection of clinical *nfxC* mutants.** We screened a collection of 221 clinical isolates of *P. aeruginosa*  
235 exhibiting a reduced susceptibility to ciprofloxacin, a substrate of MexEF-OprN, and imipenem, a  
236 substrate of porin OprD whose expression is inversely co-regulated with MexEF-OprN (Köhler *et al.*

237 1999). The drug concentrations used in the screening were equal to the MIC values for reference  
238 strain PA14 (0.125  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively; Table III). As resistance to these antibiotics  
239 may also be due to other efflux pumps (e.g., MexXY/OprM, MexCD-OprJ, MexAB-OprM) or other  
240 mechanisms (e.g., fluoroquinolone target alterations, mutational loss of porin OprD), levels of *mexE*  
241 transcripts were determined in all the strains by RT-qPCR. Forty-three (19.5%) of the 221 selected  
242 isolates were found to significantly overexpress *mexE* ( $\geq 20$ -fold) compared with PA14 (data not  
243 shown). According to available clinical data, these 43 *nfxC* mutants were involved in colonization or  
244 infection of 17 patients (from 1 to 12 isolates per patient) admitted to various medical and surgical  
245 units of Besançon University Hospital, France. Most of these patients (12/17) were treated with  
246 antibiotics prior to isolation of *nfxC* strains, including 7/12 treated with fluoroquinolones known to  
247 easily select *nfxC* mutants (Fukuda *et al.* 1990 ; Köhler *et al.* 1997). Sequencing of genes *mexS* and  
248 *mexT* (data not shown) allowed us to identify the redundant mutants in individual patients, and to  
249 eventually retain 22 strains (1, 2 or 3 different mutant(s) per patient) for further investigations (Table  
250 S1).

251

252 **Resistance and virulence of clinical *nfxC* mutants.** Overexpression of gene *mexE* was found to vary  
253 greatly among the 22 clinical mutants (from 20- to 825-fold the levels of PA14; Table III). These  
254 elevated values were associated with an increased resistance of the strains (except 1711) to MexEF-  
255 OprN substrates chloramphenicol (MICs from 2- to 32-fold that for PA14) and ciprofloxacin (from 2- to  
256 512-fold), though it cannot be excluded that additional mechanisms may have influenced drug MICs.  
257 For unclear reasons, one strain, 1711, turned out to be more susceptible (2-fold) to chloramphenicol  
258 than PA14 despite strong upregulation of its *mexE* gene (825-fold). Twenty strains exhibited a  
259 decreased susceptibility to imipenem (MICs x 2- to 16-fold) compared with PA14, resulting from  
260 either *nfxC*-dependent or independent down-regulation of porin OprD (not investigated in this  
261 study). Finally, the reported hypersusceptibility of typical *in vitro nfxC* mutants to MexAB-OprM

262 substrate ticarcillin and to MexXY(OprM) substrate amikacin (Li *et al.* 2000) was observed in only 7  
263 and 1 strains, respectively, suggesting that this hypersusceptible phenotype either arises in specific  
264 genetic backgrounds such as PAO1 and PA14, or is masked in most clinical *nfxC* strains by additional  
265 mechanisms. It should be noted that because of this phenotypic variability MexEF-OprN-  
266 overproducing mutants may be difficult to recognize at the medical laboratory unless molecular  
267 biology techniques are used.

268 *In vitro*-selected *nfxC* mutants are typically deficient in swarming motility, produce less rhamnolipids  
269 and pyocyanin, and form less biofilm than wild-type strains (Köhler *et al.* 2001). In agreement with  
270 this, *nfxC* mutants PAO7H and PA14ΔS were rated 0 and 1 respectively for their virulence on a scale  
271 ranging from 0 to 5, while their parents PAO1 and PA14 both had a score of 5 (Table III). Analysis of  
272 our clinical strains gave contrasted results, with individual scores going from 0 to 5. Only 8/22 clinical  
273 isolates had a virulence score < 2 evoking an impaired virulence (Table III). Interestingly, 3 of these 8  
274 strains were involved in clinically-confirmed cases of infection and thus likely retain enough virulence  
275 to be pathogenic. Elastase, a proteolytic enzyme known to cause tissue damage during infection, was  
276 still produced significantly in 14/22 isolates, while pyocyanin was secreted quantitatively by 8/22.  
277 The fact that multiple global regulators (e.g. QS signaling molecules, GAC system, secondary  
278 messengers...) in addition to MexT control the production of virulence factors in *P. aeruginosa* might  
279 explain the differences observed between *in vitro* and clinical mutants (i.e., with MexT-dependent  
280 effects on virulence being counterbalanced by other regulators) (Jimenez *et al.* 2012).

281

282 **Amino acid variations in regulator MexT.** MexT needs to be functional to activate operon *mexEF-*  
283 *oprN* expression in *nfxC* mutants (Köhler *et al.* 1999). Concordant with this, DNA sequencing revealed  
284 that 20/22 strains (91%) produced a MexT protein identical to that of PA14 (Table III). Interestingly,  
285 2/22 strains (9%) harbored *mexT* genes with point mutations resulting in one (G<sub>258</sub>D; strain 0810) or  
286 two (Y<sub>138</sub>D + G<sub>258</sub>D; strain 1510) amino acid substitutions in the effector-binding domain of MexT. In

287 these isolates, the sequence of *mexS*, as well as intergenic regions *mexS-mexT* and *mexT-mexE* were  
288 identical to that of PA14. To investigate the impact of substitutions G<sub>258</sub>D and Y<sub>138</sub>D+ G<sub>258</sub>D on MexT  
289 activity, we complemented PA14ΔT with the *mexT* alleles of 0810 and 1510. The expression of gene  
290 *mexE*, the drug resistance, and virulence score of PA14ΔT were unaffected by the complementation  
291 (data not shown), indicating that neither Y<sub>138</sub>D or G<sub>258</sub>D influence MexT activity, as the mutational  
292 activation of MexT would have induced *mexEF-oprN* expression in a functional MexS background.  
293 Also, these results indirectly imply that still unknown mutations are involved in the NfxC phenotype  
294 of isolates 0810 and 1510.

295

296 **Impact of alterations in *mexS* on resistance and virulence.** Experimental results from our  
297 laboratory (unpublished data) or other research groups (Sobel *et al.* 2005) have indicated that  
298 most *nfxC* mutants selected *in vitro* on MexEF-OprN substrates, such as ciprofloxacin and  
299 chloramphenicol, harbor (in about 70%) nucleotide deletions or insertions in gene *mexS*, that  
300 are predicted to result in inactive MexS peptides. In the present study, intriguingly only 13.6%  
301 (*n*=3/22) of the strains turned out to carry such indels in *mexS* whereas 45.5% (*n*=10/22) exhibited  
302 point mutations resulting in one (*n*=9) or two (*n*=1) amino acid substitutions in oxidoreductase MexS.  
303 The remaining 41% (*n*=9/22) harbored a PA14-like, wild-type MexS (Table III). These latter 9 strains  
304 were found to produce a MexT identical to that of PA14 (*n*=7) or harboring the non-significant amino  
305 acid variations Y<sub>138</sub>D and G<sub>258</sub>D (*n*=2, see above). As the intergenic regions *mexS-mexT* and *mexT-*  
306 *mexE* were 100% identical between the 9 strains and PA14, these results unambiguously demonstrate  
307 that mutations in still unknown loci (other than *mexS* and *mexT*) are able to upregulate *mexEF-oprN*  
308 expression in clinical strains.

309 Because amino acid substitutions may have less dramatic effects on MexS activity than disruption of  
310 gene *mexS*, we cloned the 13 mutated *mexS* alleles in plasmid mini-CTX and complemented mutant  
311 PA14ΔS by chromosomal insertion of the cloned genes into the *attB* site. RT-qPCR experiments

312 showed that all the transconjugants except one (complemented with MexS-V<sub>104</sub>A from 1307)  
313 significantly overexpressed the efflux operon (Table IV). This overexpression was roughly correlated  
314 with the relative increase in ciprofloxacin resistance of transcompleted mutants (Figure 1A). As  
315 expected, complementation with disrupted *mexS* alleles (from 1709, 1711, and 0607) failed to  
316 decrease the expression levels of *mexE* as well as MICs of chloramphenicol (2,048 µg mL<sup>-1</sup>) and  
317 ciprofloxacin (4 µg mL<sup>-1</sup>) (compared with PA14ΔS; Table IV). Wild-type resistance levels to imipenem,  
318 ticarcillin, and amikacin were not restored either in the mutant upon complementation. Similar  
319 results were obtained with MexS- L<sub>263</sub>Q, supporting the notion that this mutation is strongly  
320 detrimental to MexS activity. As an indication that the remaining mutations (except the well-  
321 tolerated variation V<sub>104</sub>A from 1307) partially compromise but not abolish MexS activity,  
322 complementation of PA14ΔS with other MexS variants reduced *mexE* expression from 1.9- to 20.3-  
323 fold, and resistance to both chloramphenicol and ciprofloxacin from 2- to 8-fold (Table IV). This was  
324 accompanied by restoration of wild-type susceptibility to imipenem, ticarcillin, and amikacin in 1  
325 (MexS-F<sub>253</sub>L from 2310), 8, and 0 complemented mutants, respectively. Upon complementation with  
326 MexS-F<sub>253</sub>L, gene *oprD* expression was increased up to wild-type levels (0.9-fold that of PA14) while  
327 *mexE* was strongly repressed (20.3-fold), suggesting that F<sub>253</sub>L only weakly affects MexS activity. The  
328 mRNA levels of gene *oprD* in PA14ΔS were not or marginally impacted by expression of disrupted  
329 *mexS* genes or alleles encoding amino acid variations other than V<sub>104</sub>A and F<sub>253</sub>L, consistent with the  
330 unchanged resistance of PA14ΔS to imipenem upon complementation. Hypersusceptibility of *in vitro*  
331 *nfxC* mutants to some β-lactam antibiotics such as ticarcillin has been proposed to result from *nfxC*-  
332 dependent repression of operon *mexAB-oprM* (Maseda *et al.* 2004). In agreement with our MIC data,  
333 strong defects in oxidoreductase MexS due to indels or L<sub>263</sub>Q failed to restore wild-type *mexB* levels  
334 in PA14ΔS (from 0.6- to 0.8-fold that of PA14), while less severe alterations did (from 1- to 1.4-fold).  
335 None of the *mexS* alleles except those encoding the V<sub>104</sub>A substitution was able to increase *mexY*

336 expression and amikacin MICs up to wild-type levels in PA14ΔS (Table IV). However, a slight effect  
337 (MIC x 2-fold) visible with mild alleles, was absent with severe alleles.

338 As for resistance, virulence traits of transcomplemented PA14ΔS mutants varied greatly  
339 according to the different *mexS* alleles. Similarly to PA14ΔS, mutations leading to complete  
340 inactivation of MexS and strong *mexE* upregulation (alleles from 2609, 1709, 1711, 0607) were  
341 associated with a low virulence score of 1 (Figure 1B). Biofilm formation, swarming motility  
342 (Figure 2), haemolysin activity, pyocyanin production except elastase activity were all markedly  
343 impaired in the complemented mutants compared with PA14 (Table IV). Complementation with  
344 the other alleles (from 2310, 2505, 3005, 0911, 1009, 0801, 1409, 2311) partially restored the  
345 virulence in PA14ΔS, yielding scores of 4 and 5. Consistent with our previous conclusions, the  
346 *mexS* allele encoding the well-tolerated substitution V<sub>104</sub>A provided PA14ΔS with a wild-type  
347 phenotype of resistance and virulence (Figure 2), indicating that *mexEF-oprN* overexpression in  
348 strain 1307 is due to *mexS*- (and also *mexT*-)independent genetic events.

349

350 **Other regulatory genes in *nfxC* mutants.** As reported above, 10/22 clinical strains appeared to  
351 produce functional MexS and MexT proteins (2502, 1206, 0708, 0309, 2607, 0712, 0608, 1307, 0810,  
352 1510). Since mutations in genes coding for global regulators MvaT and AmpR have been reported to  
353 activate operon *mexEF-oprN* in *in vitro*-selected *nfxC* mutants (Balasubramanian *et al.* 2012 ; Westfall  
354 *et al.* 2006), we carried out sequencing experiments which failed to reveal alterations in these genes.  
355 Again, these results indicate clearly that other loci are implicated in pump MexEF-OprN  
356 overproduction in the clinical setting.

357

358

## 359 **Conclusion**

360

361 This study provides an insight into the genetic events leading to MexEF-OprN overproduction in  
362 clinical *nfxC* isolates. None of the amino acid variations found in *mexT* (2 out of 22 isolates, 9%)  
363 proved to be significant, a result consistent with the observation that LysR regulators are rarely  
364 constitutively activated by mutations (e.g., BenM in *Acinetobacter baylyi* and CysB in *Salmonella*  
365 Typhimurium) (Colyer and Kredich 1996 ; Craven *et al.* 2009). Actually, single point mutations in  
366 oxydoreductase MexS (9/22, 40.9%) represent a significant cause of MexEF-OprN upregulation in  
367 clinical *P. aeruginosa*. Consistent with these findings, a previous study demonstrated that the MexS  
368 mutation R<sub>267</sub>H results in multidrug resistance and overexpression of T3SS (Klockgether *et al.* 2013).  
369 Several lines of evidence strongly suggest here that most of these mutated MexS proteins (8/9) are  
370 only partially deficient in enzymatic activities. Mutants harboring these presumed “mild” mutations  
371 display resistance and virulence traits intermediate between wild-type strains and *mexS* null mutants  
372 (3/22, 13.6%), likely accounting for their emergence *in vivo*. However, the virulence of *P. aeruginosa*  
373 is multifactorial and factors other than those tested in this study may well contribute to the  
374 pathogenicity of strongly deficient *mexS* mutants, some of which are still able to cause infections.  
375 Finally, this work demonstrates that still unknown regulators are involved in the activation of  
376 *mexEF-oprM* in 10/22 (45.5%) clinical *nfxC* mutants. We are currently implicated in the  
377 comprehension of such regulatory pathways.

378

## 379 **Acknowledgments**

380 The authors wish to thank Fabrice Poncet and Amandine Mariot (SFR FED 4234, Besançon,  
381 France) for DNA sequencing data and Loïs Andrey for technical assistance. They also thank the

382 Centre National de Référence (CNR) de la Résistance aux Antibiotiques for the provision of  
383 clinical NfxC isolates.

384

385 **Funding** : This work was supported by a grant from the French “Ministère de l’enseignement  
386 supérieur et de la recherche”.

387

388 **Competing interests** : None declared.

389

390 **Ethical approval** : Not required.

391

## 392 References

- 393 1. **Balasubramanian, D., L. Schneper, M. Merighi, R. Smith, G. Narasimhan, S. Lory, and**  
394 **K. Mathee.** 2012. The regulatory repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC ss-  
395 lactamase regulator AmpR includes virulence genes. PLoS One **7**:e34067.
- 396 2. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2009. Methods for dilution antimicrobial  
397 susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard - 8th edition. In  
398 Wayne (ed.), M07-A8, vol. 29, USA.
- 399 3. **Colyer, T. E., and N. M. Kredich.** 1996. In vitro characterization of constitutive CysB  
400 proteins from *Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol **21**:247-56.
- 401 4. **Craven, S. H., O. C. Ezezika, S. Haddad, R. A. Hall, C. Momany, and E. L. Neidle.** 2009.  
402 Inducer responses of BenM, a LysR-type transcriptional regulator from *Acinetobacter*  
403 *baylyi* ADP1. Mol Microbiol **72**:881-94.
- 404 5. **Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin, and D. R. Helinski.** 1980. Broad host range DNA  
405 cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium*  
406 *meliloti*. Proc Natl Acad Sci U S A **77**:7347-51.
- 407 6. **Dumas, J. L., C. van Delden, K. Perron, and T. Köhler.** 2006. Analysis of antibiotic  
408 resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR.  
409 FEMS Microbiol Lett **254**:217-25.
- 410 7. **Essar, D. W., L. Eberly, A. Hadero, and I. P. Crawford.** 1990. Identification and  
411 characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*:

- interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol* **172**:884-900.
- 414 8. **Fargier, E., M. Mac Aogain, M. J. Mooij, D. F. Woods, J. P. Morrissey, A. D. Dobson, C.**  
415 **Adams, and F. O'Gara.** 2012. MexT functions as a redox-responsive regulator  
416 modulating disulfide stress resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **194**:3502-  
417 11.
- 418 9. **Frisk, A., J. R. Schurr, G. Wang, D. C. Bertucci, L. Marrero, S. H. Hwang, D. J. Hassett,**  
419 **and M. J. Schurr.** 2004. Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* after  
420 interaction with human airway epithelial cells. *Infect Immun* **72**:5433-8.
- 421 10. **Fukuda, H., M. Hosaka, K. Hirai, and S. Iyobe.** 1990. New norfloxacin resistance gene in  
422 *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Antimicrob Agents Chemother* **34**:1757-61.
- 423 11. **Gellatly, S. L., and R. E. Hancock.** 2013. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into  
424 pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* **67**:159-73.
- 425 12. **Hoang, T. T., A. J. Kutchma, A. Becher, and H. P. Schweizer.** 2000. Integration-  
426 proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for  
427 engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* **43**:59-72.
- 428 13. **Jalal, S., O. Ciofu, N. Hoiby, N. Gotoh, and B. Wretling.** 2000. Molecular mechanisms of  
429 fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis  
430 patients. *Antimicrob Agents Chemother* **44**:710-2.
- 431 14. **Jimenez, P. N., G. Koch, J. A. Thompson, K. B. Xavier, R. H. Cool, and W. J. Quax.** 2012.  
432 The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*.  
433 *Microbiol Mol Biol Rev* **76**:46-65.
- 434 15. **Jin, Y., H. Yang, M. Qiao, and S. Jin.** 2011. MexT regulates the type III secretion system  
435 through MexS and PtrC in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **193**:399-410.
- 436 16. **Kaniga, K., I. Delor, and G. R. Cornelis.** 1991. A wide-host-range suicide vector for  
437 improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of  
438 *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**:137-41.
- 439 17. **Klockgether, J., N. Miethke, P. Kubesch, Y. S. Bohn, I. Brockhausen, N. Cramer, L.**  
440 **Eberl, J. Greipel, C. Herrmann, S. Herrmann, S. Horatzek, M. Lingner, L. Luciano, P.**  
441 **Salunkhe, D. Schomburg, M. Wehsling, L. Wiehlmann, C. F. Davenport, and B.**  
442 **Tummler.** 2013. Intracolonial diversity of the *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis  
443 airway isolates TBCF10839 and TBCF121838: distinct signatures of transcriptome,  
444 proteome, metabolome, adherence and pathogenicity despite an almost identical  
445 genome sequence. *Environ Microbiol* **15**:191-210.
- 446 18. **Köhler, T., L. K. Curty, F. Barja, C. van Delden, and J. C. Pechere.** 2000. Swarming of  
447 *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and  
448 pili. *J Bacteriol* **182**:5990-6.
- 449 19. **Köhler, T., S. F. Epp, L. K. Curty, and J. C. Pechère.** 1999. Characterization of MexT, the  
450 regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J*  
451 *Bacteriol* **181**:6300-5.
- 452 20. **Köhler, T., M. Michea-Hamzhepour, U. Henze, N. Gotoh, L. K. Curty, and J. C. Pechère.**  
453 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux  
454 system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **23**:345-54.
- 455 21. **Köhler, T., M. Michea-Hamzhepour, P. Plesiat, A. L. Kahr, and J. C. Pechere.** 1997.  
456 Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas*  
457 *aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**:2540-3.
- 458 22. **Köhler, T., C. van Delden, L. K. Curty, M. M. Hamzhepour, and J. C. Pechere.** 2001.  
459 Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling  
460 in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**:5213-22.

- 461 23. **Kumar, A., and H. P. Schweizer.** 2011. Evidence of MexT-independent overexpression  
462 of MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* in presence of  
463 metabolic stress. PLoS One **6**:e26520.
- 464 24. **Lamarche, M. G., and E. Deziel.** 2011. MexEF-OprN efflux pump exports the  
465 *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) precursor HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline).  
466 PLoS One **6**:e24310.
- 467 25. **Li, X. Z., N. Barre, and K. Poole.** 2000. Influence of the MexA-MexB-oprM multidrug  
468 efflux system on expression of the MexC-MexD-oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug  
469 efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother **46**:885-93.
- 470 26. **Linares, J. F., J. A. Lopez, E. Camafeita, J. P. Albar, F. Rojo, and J. L. Martinez.** 2005.  
471 Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is  
472 associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol  
473 **187**:1384-91.
- 474 27. **Llanes, C., T. Köhler, I. Patry, B. Dehecq, C. van Delden, and P. Plésiat.** 2011. Role of  
475 the Efflux System MexEF-OprN in Low Level Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to  
476 Ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother **55**:5676-84.
- 477 28. **Llanes, C., C. Pourcel, C. Richardot, P. Plesiat, G. Fichant, J. D. Cavallo, A. Merens, and  
478 G. S. Group.** 2013. Diversity of beta-lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis  
479 isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study. J Antimicrob Chemother  
480 **68**:1763-71.
- 481 29. **Maseda, H., K. Saito, A. Nakajima, and T. Nakae.** 2000. Variation of the mexT gene, a  
482 regulator of the MexEF-oprN efflux pump expression in wild-type strains of  
483 *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett **192**:107-12.
- 484 30. **Maseda, H., I. Sawada, K. Saito, H. Uchiyama, T. Nakae, and N. Nomura.** 2004.  
485 Enhancement of the *mexAB-oprM* efflux pump expression by a quorum-sensing  
486 autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the *mexEF-oprN* efflux pump  
487 operon in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother **48**:1320-8.
- 488 31. **Oh, H., J. Stenhoff, S. Jalal, and B. Wretling.** 2003. Role of efflux pumps and mutations  
489 in genes for topoisomerases II and IV in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas*  
490 *aeruginosa* strains. Microb Drug Resist **9**:323-8.
- 491 32. **Ohman, D. E., S. J. Cryz, and B. H. Iglewski.** 1980. Isolation and characterization of  
492 *Pseudomonas aeruginosa* PAO mutant that produces altered elastase. J Bacteriol  
493 **142**:836-42.
- 494 33. **Olivares, J., C. Alvarez-Ortega, J. F. Linares, F. Rojo, T. Kohler, and J. L. Martinez.**  
495 2012. Overproduction of the multidrug efflux pump MexEF-OprN does not impair  
496 *Pseudomonas aeruginosa* fitness in competition tests, but produces specific changes in  
497 bacterial regulatory networks. Environ Microbiol **14**:1968-81.
- 498 34. **Poole, K., and R. Srikumar.** 2001. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*:  
499 components, mechanisms and clinical significance. Curr Top Med Chem **1**:59-71.
- 500 35. **Pumbwe, L., and L. J. Piddock.** 2000. Two efflux systems expressed simultaneously in  
501 multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother **44**:2861-4.
- 502 36. **Schweizer, H. P.** 2003. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in  
503 *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. Genet Mol Res  
504 **2**:48-62.
- 505 37. **Sobel, M. L., D. Hocquet, L. Cao, P. Plesiat, and K. Poole.** 2005. Mutations in PA3574  
506 (*nalD*) lead to increased MexAB-OprM expression and multidrug resistance in laboratory  
507 and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother **49**:1782-  
508 6.
- 509 38. **Tian, Z. X., E. Fargier, M. Mac Aogain, C. Adams, Y. P. Wang, and F. O'Gara.** 2009.  
510 Transcriptome profiling defines a novel regulon modulated by the LysR-type

- 511 transcriptional regulator MexT in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res* **37**:7546-  
512 59.
- 513 39. **Tian, Z. X., M. Mac Aogain, H. F. O'Connor, E. Fargier, M. J. Mooij, C. Adams, Y. P.**  
514 **Wang, and F. O'Gara.** 2009. MexT modulates virulence determinants in *Pseudomonas*  
515 *aeruginosa* independent of the MexEF-OprN efflux pump. *Microb Pathog* **47**:237-41.
- 516 40. **Vasseur, P., C. Soscia, R. Voulhoux, and A. Filloux.** 2007. PelC is a *Pseudomonas*  
517 *aeruginosa* outer membrane lipoprotein of the OMA family of proteins involved in  
518 exopolysaccharide transport. *Biochimie* **89**:903-15.
- 519 41. **Westfall, L. W., N. L. Carty, N. Layland, P. Kuan, J. A. Colmer-Hamood, and A. N.**  
520 **Hamood.** 2006. *mvaT* mutation modifies the expression of the *Pseudomonas aeruginosa*  
521 multidrug efflux operon *mexEF-oprN*. *FEMS Microbiol Lett* **255**:247-54.
- 522 42. **Zaoui, C., J. Overhage, D. Lons, A. Zimmermann, M. Musken, P. Bielecki, C. Pustelny,**  
523 **T. Becker, M. Nimtz, and S. Haussler.** 2012. An orphan sensor kinase controls  
524 quinolone signal production via MexT in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*  
525 **83**:536-47.

526

527 Table SI: Origin of the 22 *nfxC* clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*.

Strains	Patient numbers <sup>a</sup>	Dates of isolation	Hospital Units	Samples	Infection / Colonization	Antibiotic courses <sup>c</sup>
<b>Isolates with no mutation in <i>mexS</i> and <i>mexT</i></b>						
2502	17	02/25/13	Hepatology	Urine	Infection	β-Lact, MCL, <b>FQ</b>
1206	2	06/12/12	Neurosurgery	Tracheal aspirate	ND <sup>b</sup>	β-Lact, OXZ, <b>FQ</b>
0708	2	08/07/12	Neurosurgery	Urine	ND <sup>b</sup>	β-Lact, OXZ, <b>FQ</b>
0309	8	09/03/12	Haematology	Bronchial aspirate	Infection	β-Lact, MCL
2607	6	07/26/12	Intensive Care	Peritoneal fluid	Infection	β-Lact, CBP, <b>FQ</b> , AG
0712	4	07/13/12	Vascular Surgery	Fascia of scarpa	Colonization	No antibiotic
0608	7	08/06/12	Haematology	Mouth	Colonization	β-Lact, <b>FQ</b>
<b>Isolates with mutations in <i>mexS</i></b>						
1307	5	07/13/12	Pneumology	Sputum	ND <sup>b</sup>	PMX
2310	13	10/23/12	Intensive Care	Urine	Infection	β-Lact
2505	1	05/25/12	Thoracic Surgery	Mediastinal fluid	Infection	β-Lact
3005	2	05/30/12	Neurosurgery	Tracheal aspirate	ND <sup>b</sup>	β-Lact, OXZ, <b>FQ</b>
0911	14	11/09/12	Gynecology	Breast scare	Colonization	No antibiotic
1009	9	09/10/12	Intensive Care	Tracheal aspirate	Infection	SUL
0801	16	01/08/13	Pneumology	Sputum (CF)	Colonization	PMX, <b>FQ</b>
1409	10	09/14/12	Nephrology	Bone biopsy	Infection	β-Lact, AG
2311	14	11/23/12	Oncology	Breast scare	Colonization	No antibiotic
2609	11	09/26/12	Otolaryngology	Cervical wound	Colonization	No antibiotic
1709	11	09/17/12	Otolaryngology	Cervical wound	Colonization	No antibiotic
1711	15	11/17/12	Neurosurgery	Urine	Colonization	No antibiotic
0607	3	07/06/12	Urologic Surgery	Wound	Colonization	No antibiotic
<b>Isolates with mutations in <i>mexT</i></b>						
0810	12	10/08/12	Intensive Care	Tracheal aspirate	Infection	CBP, GLP
1510	12	10/15/12	Intensive Care	Tracheal aspirate	Infection	CBP, GLP

528 <sup>a</sup> patients 2, 11, 12 and 14 harbored more than one isolate, but with a same sequence of *mexS* or *mexT*

529 <sup>b</sup> ND : not determined.

530 <sup>c</sup> before the isolation of *P. aeruginosa*. β-Lact: non-carbapenem β-lactams, CBP: carbapenems, AG:

531 aminoglycosides, **FQ: fluoroquinolones**, MCL: macrolides, OXZ: oxazolidinones, PMX: polymyxins, SUL: sulfamides,

532 GLP: glycopeptides.

533 Strains 1206 and 0708 were included in the study because they exhibited different serotypes.

534 Table I: Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strains / plasmids	Relevant characteristics	Sources
<b>Strains</b>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	Wild-type reference strain PAO1-UW (University of Washington)	B. Holloway
PAO7H	<i>nfxC</i> -mutant derived from wild-type strain PAO1-UW	(Köhler <i>et al.</i> 1997)
PA14	Wild-type reference strain PA14	B. Ausubel
PA14ΔS	PA14 deleted in <i>mexS</i> ( <i>nfxC</i> -type)	This study
PA14ΔT	PA14 deleted in <i>mexT</i>	This study
PA14ΔS <sub>PA14</sub>	PA14Δ <i>mexS</i> transcomplemented with <i>mexS</i> from reference strain PA14	This study
PA14ΔS <sub>PAO1</sub>	PA14Δ <i>mexS</i> transcomplemented with <i>mexS</i> from reference strain PAO1	This study
PA14ΔS <sub>1307</sub>	PA14Δ <i>mexS</i> transcomplemented with <i>mexS</i> from clinical strain 1307	This study
PA14ΔS <sub>2310</sub>	PA14Δ <i>mexS</i> transcomplemented with <i>mexS</i> from clinical strain 2310	This study
PA14ΔS <sub>2505</sub>	PA14Δ <i>mexS</i> transcomplemented with <i>mexS</i> from clinical strain 2505	This study
PA14ΔS <sub>3005</sub>	PA14Δ <i>mexS</i> transcomplemented with <i>mexS</i> from clinical strain 3005	This study
PA14ΔS <sub>0911</sub>	PA14Δ <i>mexS</i> transcomplemented with <i>mexS</i> from clinical strain 0911	This study
PA14ΔS <sub>1009</sub>	PA14Δ <i>mexS</i> transcomplemented with <i>mexS</i> from clinical strain 1009	This study
PA14ΔS <sub>0801</sub>	PA14Δ <i>mexS</i> transcomplemented with <i>mexS</i> from clinical strain 0801	This study
PA14ΔS <sub>1409</sub>	PA14Δ <i>mexS</i> transcomplemented with <i>mexS</i> from clinical strain 1409	This study
PA14ΔS <sub>2311</sub>	PA14Δ <i>mexS</i> transcomplemented with <i>mexS</i> from clinical strain 2311	This study
PA14ΔS <sub>2609</sub>	PA14Δ <i>mexS</i> transcomplemented with <i>mexS</i> from clinical strain 2609	This study
PA14ΔS <sub>1709</sub>	PA14Δ <i>mexS</i> transcomplemented with <i>mexS</i> from clinical strain 1709	This study
PA14ΔS <sub>1711</sub>	PA14Δ <i>mexS</i> transcomplemented with <i>mexS</i> from clinical strain 1711	This study
PA14ΔS <sub>0607</sub>	PA14Δ <i>mexS</i> transcomplemented with <i>mexS</i> from clinical strain 0607	This study
PA14ΔT <sub>0810</sub>	PA14Δ <i>mexT</i> transcomplemented with <i>mexT</i> from clinical strain 0810	This study
PA14ΔT <sub>1510</sub>	PA14Δ <i>mexT</i> transcomplemented with <i>mexT</i> from clinical strain 1510	This study
<i>Escherichia coli</i>		
CC118	Δ( <i>ara-leu</i> ) <i>araD</i> Δ <i>lacX74 galE galk phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE</i> (Am) <i>recA1</i>	(Manoil and Beckwith 1985)
CC118λ <i>pir</i>	CC118 lysogenized with λ <i>pir</i> phage	(Herrero <i>et al.</i> 1990)
DH5α	F- <i>supE44 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> m <sub>k</sub> <sup>-</sup> ) <i>thi-1 recA1</i> Δ ( <i>argF-lacZYA</i> )U169 φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 <i>phoA gyrA96 relA1 deoR</i> λ <sup>-</sup>	Invitrogen
HB101	<i>supE44 hsd</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>recA13 ara-14 pro A2 lacY1 galk2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 leuB6 thi-1</i>	(Lacks and Greenberg 1977)
<b>Plasmids</b>		
pCR-Blunt	Cloning vector for blunt-end PCR products, <i>lacZ</i> ΔColE1 f1 <i>ori</i> , Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Invitrogen
pRK2013	Helper plasmid, ColE1 <i>ori</i> , Tra <sup>+</sup> Mob <sup>+</sup> Km <sup>r</sup>	(Ditta <i>et al.</i> 1980)
mini-CTX1	Self-proficient integration vector, <i>tet</i> Ω- <i>FRT-attP</i> -MCS <i>ori int oriT</i> , Tc <sup>r</sup>	(Hoang <i>et al.</i> 2000)
pKNG101	Suicide vector in <i>P. aeruginosa</i> ; <i>sacB</i> Sm <sup>r</sup>	(Kaniga <i>et al.</i> 1991)

535

536 Table II: Primers used for DNA sequencing, gene cloning, and RT-qPCR.

Primer	Sequence (5' --> 3')	Source
<b>Sequencing</b>		
Seq-mexS-Ch1	GAACAGGATCAGCAGGTTCA	this study
Seq-mexS-Ch2	CCACCGGGGTGAGTACCT	this study
Seq-mexS-Ch3	GTCTCGGCTTCGAACTGG	this study
Seq-mexS-Ch4	GGTGAAATCCATCAGGCAGT	this study
Seq-mexS-Ch5	GCAAGCTGGTCTGTATGG	this study
Seq-mexS-Ch6	GAAGGCGACTTCGTCTGG	this study
Seq-mexS-Ch8	TCGAACTGTCCCTTTGCTCT	this study
seqmexT-1	CTATTGATGCCGAACCTGCT	(Llanes <i>et al.</i> 2011)
seqmexT-2	AATAGTCGTGAGGGTCAGC	(Llanes <i>et al.</i> 2011)
seqmexT-3	TGATGAAAACGGATCACTCG	(Llanes <i>et al.</i> 2011)
seqmexT-4	GGGAACTAATCGAACGACGA	(Llanes <i>et al.</i> 2011)
Seq-mexT-mexE-Ch1	AAGCGCAAGGTGGTCCTG	this study
MvaT-1	CGCGGTTTACTTACAGTTTCG	(Llanes <i>et al.</i> 2011)
MvaT-2	AACGCTATTCGCTGGAGACT	(Llanes <i>et al.</i> 2011)
<b>Inactivation of mexS and mexT</b>		
Inac-MexS-Ch1	GACAGGTGGGCGAAGATTT	this study
Inac-MexS-Ch2	ATCCATCCATCACGGGGTGAATAACCT	this study
Inac-MexS-Ch3	CGTGATGGATGGATTTACCGGTCATC	this study
Inac-MexS-Ch4	CGGCGAGATGTATGTGGTG	this study
Inac-MexT-Ch1	AGCACATCCTTCCAGCTCAC	this study
Inac-MexT-Ch2	ATAAGCCGAACACGATCAGCAGGTTCA	this study
Inac-MexT-Ch3	CGTGTTGCGCTTATTCCATCGAAAGCA	this study
Inact-MexT-Ch4	GTCGATCTGGAACAGCAGGT	this study
<b>Complementation of mexS and mexT</b>		
Int-mexS-P1	CGGGGATCCGGGGCATAGGATCACTGACA	this study
Int-mexS-P2	GCCAAGCTTGGTCAACGATCTGTGGATCTG	this study
Int-mexS-Ch2	GCCAAGCTTCGAACTGTCCCTTTGCTCTC	this study
Int-mexT-P1	CGGGGATCCCATCACGGGGTGAATAACCT	this study
Int-mexT-P2	GCCAAGCTTCGATCGATTTTCCCGTTG	this study
<b>RT-qPCR</b>		
rpsL3	CAACTATCAACCAGCTGGTG	(Dumas <i>et al.</i> 2006)
rpsL5	CTGTGCTTTGCAGGTTGTG	(Dumas <i>et al.</i> 2006)
mexE4	CCAGGACCAGCACGAACTTCTTGC	(Dumas <i>et al.</i> 2006)
mexE5	CGACAACGCCAAGGGCGAGTTACCC	(Dumas <i>et al.</i> 2006)
MexSP1	CAAGGGCGTCAATGTCATCC	this study
MexSP2	GACCGGTGAAATCCATCAGG	this study
MexT1	ATCTGAACCTGCTGATCGTG	this study
MexT2	GTCCGGTACGGACGAACA	this study

537 Table III: Genotype and phenotype of *nfxC* mutants.

Strains	Sequence		Transcript levels	MICs ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) <sup>d</sup>					Virulence traits <sup>e</sup>					
	MexS (339 aa) <sup>a</sup>	MexT (304 aa) <sup>b</sup>	<i>mexE</i> <sup>c</sup>	CHL	CIP	IMP	TIC	AMK	Biofilm production (OD <sub>600</sub> )	Swarming motility (+/-)	Elastase activity (mm)	Haemolytic activity (%)	Pyocyanin production (%)	Virulence score (/5) <sup>f</sup>
<b>Reference strains</b>														
PA14	WT	WT	1	64	0.12	1	16	2	<b>2.6</b>	+	<b>18</b>	<b>72</b>	<b>100</b>	5
PA14 $\Delta$ S	$\Delta$ 809bp <sub>1-809</sub>	WT	<b>427</b>	2048	2	2	8	0.5	0.4	-	<b>12</b>	22	13	1
PA14 $\Delta$ S <sub>PA14</sub>	WT	WT	1.9	64	0.12	1	16	2	<b>2.7</b>	+	<b>18</b>	<b>79</b>	<b>92</b>	5
PA14 $\Delta$ S <sub>PAO1</sub>	N <sub>249</sub> D	WT	<b>87</b>	2048	2	2	8	1	0.9	-	<b>13</b>	<b>55</b>	13	2
PA14 $\Delta$ T	WT	$\Delta$ 883bp <sub>32-915</sub>	0.4	64	0.12	1	16	2	<b>1.9</b>	+	<b>16</b>	<b>78</b>	<b>86</b>	5
PA14 $\Delta$ T <sub>PA14</sub>	WT	WT	6.2	64	0.12	1	16	2	<b>2</b>	+	<b>18</b>	<b>76</b>	<b>87</b>	5
PAO1	N <sub>249</sub> D	+ 8bp <sub>118</sub>	0.2	16	0.12	1	16	8	0.5	+	<b>16</b>	<b>77</b>	<b>168</b>	5
PAO7H	N <sub>249</sub> D	WT	<b>265</b>	2048	2	4	8	4	0.6	-	0	50	17	0
<b>Clinical strains with no mutation in <i>mexS</i> and <i>mexT</i></b>														
2502	WT	WT	<b>35</b>	256	0.25	8	64	2	0.5	+	<b>15</b>	<b>62</b>	<b>54</b>	4
1206	WT	WT	<b>41</b>	512	0.5	2	64	4	0.5	+	<b>15</b>	<b>69</b>	<b>87</b>	4
0708	WT	WT	<b>53</b>	256	0.25	1	64	4	0.5	-	0	29	24	0
0309	WT	WT	<b>28</b>	128	1	1	64	2	0.4	+	<b>16</b>	<b>63</b>	<b>90</b>	4
2607	WT	WT	<b>39</b>	256	0.5	2	64	4	0.5	-	<b>15</b>	<b>54</b>	15	2
0712	WT	WT	<b>325</b>	2048	2	4	16	16	0.3	+	<b>15</b>	42	13	2
0608	WT	WT	<b>25</b>	256	0.25	2	64	8	<b>1.3</b>	+	<b>17</b>	<b>74</b>	<b>168</b>	5
<b>Clinical strains with mutations in <i>mexS</i></b>														
1307	V <sub>104</sub> A	WT	<b>29</b>	256	16	2	64	8	<b>2.2</b>	-	0	20	13	1
2310	F <sub>253</sub> L	WT	<b>183</b>	1024	0.5	4	32	8	<b>1.2</b>	-	<b>11</b>	<b>69</b>	<b>172</b>	4
2505	D <sub>44</sub> E	WT	<b>212</b>	512	64	16	32	4	<b>1.3</b>	-	0	<b>60</b>	12	2
3005	S <sub>60</sub> F	WT	<b>259</b>	2048	1	4	8	4	0.5	+	<b>16</b>	<b>68</b>	13	3
0911	F <sub>185</sub> L	WT	<b>133</b>	1024	0.5	4	8	2	0.3	+	<b>16</b>	<b>57</b>	<b>100</b>	4
1009	V <sub>73</sub> A+ L <sub>270</sub> Q	WT	<b>312</b>	1024	32	8	128	8	<b>1.7</b>	-	0	29	11	1
0801	C <sub>245</sub> G	WT	<b>81</b>	256	0.5	4	128	64	0.1	-	0	15	12	0
1409	A <sub>166</sub> P	WT	<b>179</b>	1024	2	4	8	2	0.3	+	<b>16</b>	<b>66</b>	<b>149</b>	4
2311	S <sub>60</sub> P	WT	<b>455</b>	1024	1	4	4	2	0.5	+	<b>16</b>	<b>64</b>	11	3
2609	L <sub>263</sub> Q	WT	<b>534</b>	2048	1	4	8	2	<b>1.8</b>	-	<b>11</b>	<b>58</b>	12	3

1709	$\Delta 8\text{bp}_{710-718}$	WT	<b>552</b>	2048	2	4	8	2	0.4	-	<b>13</b>	47	12	1
1711	$\Delta C_{293}$	WT	<b>825</b>	32	1	2	32	8	0.3	+	<b>11</b>	41	<b>245</b>	3
0607	$\Delta 30\text{bp}_{927-956}$	WT	<b>556</b>	512	1	8	4	2	0.5	-	0	47	11	0
<b><i>Clinical strains with mutations in mexT</i></b>														
0810	WT	$\widehat{G}_{258}D$	<b>254</b>	512	8	4	128	2	<b>1.4</b>	-	0	28	16	1
1510	WT	$Y_{138}D+G_{258}D$	<b>20</b>	256	0.25	16	128	1	<b>1.4</b>	-	0	37	11	1

538 <sup>a</sup> MexS of PA14 is functional ( $N_{249}$ ) and considered as WT contrary to that of PAO1-UW ( $D_{249}$ ) ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)).

539 <sup>b</sup> MexT of PA14 is functional and considered as WT, contrary to that of PAO1-UW (+8bp<sub>118</sub>) ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)).

540 <sup>c</sup> Expressed as a ratio to that of wild-type reference strain PA14. *NfxC* mutants (in bold) have a transcript level  $\geq 20$ .

541 <sup>d</sup> CHL, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; IMP, imipenem; MEM, meropenem; TIC, ticarcillin; AMK, amikacin.

542 <sup>e</sup> Virulence traits are in bold when positive or considered significant.

543 <sup>f</sup> Results from each virulence test (biofilm/1, swarming/1, elastase/1, haemolysis/1, pyocyanin/1).

544

545 Table IV: Genotype and phenotype of PA14ΔS complemented with mutated *mexS* alleles from clinical isolates.

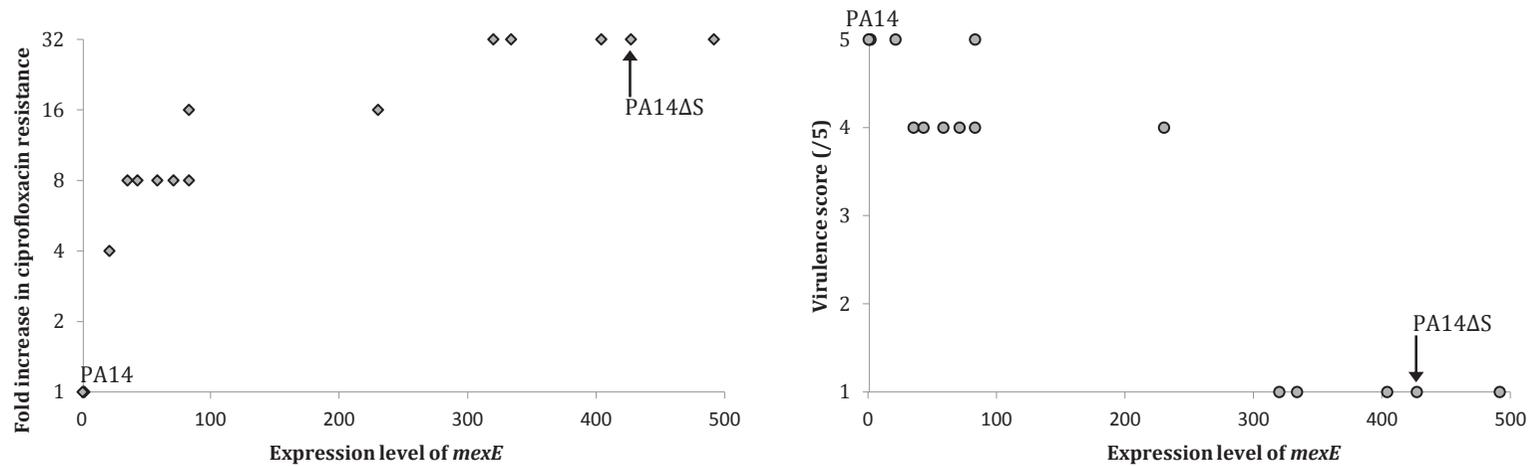
Strains	Sequence	Transcript levels <sup>a</sup>						MICs (mg ml <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>						Virulence traits <sup>c</sup>					
		MexS (339 aa)	<i>mexE</i>	<i>mexS</i>	<i>mexT</i>	<i>oprD</i>	<i>mexB</i>	<i>mexY</i>	CHL	CIP	IMP	MEM	TIC	AMK	Biofilm production (OD <sub>600</sub> )	Swarming motility (+/-)	Elastase activity (mm)	Hemolytic activity (%)	Pyocyanin production (%)
PA14	WT	1	1	1	1	1	1	64	0.12	1	0.5	16	2	<b>2.6</b>	+	<b>18</b>	<b>72</b>	<b>100</b>	5
PA14ΔS	Δ809bp <sub>1-809</sub>	<b>427</b>	ND	0.9	0.3	0.4	0.4	2048	4	2	1	8	0.5	0.4	-	<b>12</b>	22	13	1
PA14ΔS <sub>PA14</sub>	WT	1.9	1.3	1.5	1	1	1	64	0.12	1	0.5	16	2	<b>2.7</b>	+	<b>18</b>	<b>79</b>	<b>92</b>	5
<b>Tolerated substitutions in MexS</b>																			
PA14ΔS <sub>1307</sub>	V <sub>104</sub> A	0.8	1.2	1.4	1.8	1.1	1.2	64	0.12	1	0.5	16	2	<b>4.4</b>	+	<b>16</b>	<b>70</b>	<b>114</b>	5
<b>Mild substitutions in MexS</b>																			
PA14ΔS <sub>2310</sub>	F <sub>253</sub> L	<b>21</b>	4	1	0.9	1	0.8	256	0.5	1	0.5	16	1	<b>2.8</b>	+	<b>16</b>	<b>70</b>	<b>84</b>	5
PA14ΔS <sub>2505</sub>	D <sub>44</sub> E	<b>35</b>	5.2	1.2	0.4	0.7	0.7	512	1	2	1	16	1	<b>1.7</b>	+	<b>17</b>	<b>70</b>	18	4
PA14ΔS <sub>3005</sub>	S <sub>60</sub> F	<b>71</b>	4.8	1.2	0.4	1	0.7	512	1	2	1	16	1	<b>1.7</b>	+	<b>16</b>	<b>68</b>	18	4
PA14ΔS <sub>0911</sub>	F <sub>185</sub> L	<b>59</b>	3.7	1.5	0.6	1.4	0.8	512	1	2	1	16	1	<b>2.2</b>	+	<b>17</b>	<b>58</b>	40	4
PA14ΔS <sub>1009</sub>	V <sub>73</sub> A+ L <sub>270</sub> Q	<b>43</b>	5.8	1.4	0.5	1.2	0.8	512	1	2	1	16	1	<b>1.8</b>	+	<b>16</b>	<b>53</b>	21	4
PA14ΔS <sub>0801</sub>	C <sub>245</sub> G	<b>83</b>	4	1.7	0.5	1.1	0.8	512	1	2	1	16	1	<b>2.3</b>	+	<b>16</b>	<b>71</b>	<b>70</b>	5
PA14ΔS <sub>1409</sub>	A <sub>166</sub> P	<b>83</b>	5.1	1.9	0.4	1.2	0.8	1024	2	2	1	16	1	<b>1.6</b>	+	<b>16</b>	<b>67</b>	22	4
PA14ΔS <sub>2311</sub>	S <sub>60</sub> P	<b>230</b>	9.1	1.7	0.4	1	0.8	1024	2	2	1	16	1	<b>1.2</b>	+	<b>16</b>	<b>59</b>	33	4
<b>Inactivation of MexS</b>																			
PA14ΔS <sub>2609</sub>	L <sub>263</sub> Q	<b>320</b>	6.9	1.1	0.2	0.8	0.5	2048	4	2	1	8	0.5	0.2	+/-	<b>16</b>	21	14	1
PA14ΔS <sub>1709</sub>	Δ8bp <sub>710-718</sub>	<b>334</b>	5.1	1.7	0.5	0.6	0.4	2048	4	2	1	8	0.5	0.6	-	<b>13</b>	32	17	1
PA14ΔS <sub>1711</sub>	ΔC <sub>293</sub>	<b>404</b>	2.6	1.7	0.7	0.6	0.6	2048	4	2	1	8	0.5	0.7	-	<b>11</b>	37	13	1
PA14ΔS <sub>0607</sub>	Δ30bp <sub>927-956</sub>	<b>492</b>	8	1.9	0.5	0.8	0.6	2048	4	2	1	8	0.5	0.6	-	<b>13</b>	20	21	1

546 <sup>a</sup>: Expressed as a ratio to that of wild-type reference strain PA14. *NfxC* mutants (in bold) have a transcript level of *mexE* ≥ 20.

547 <sup>b</sup>: CHL, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin; IMP, imipenem; MEM, meropenem; TIC, ticarcillin; AMK, amikacin.

548 <sup>c</sup>: Virulence traits are in bold when positive or considered significant.

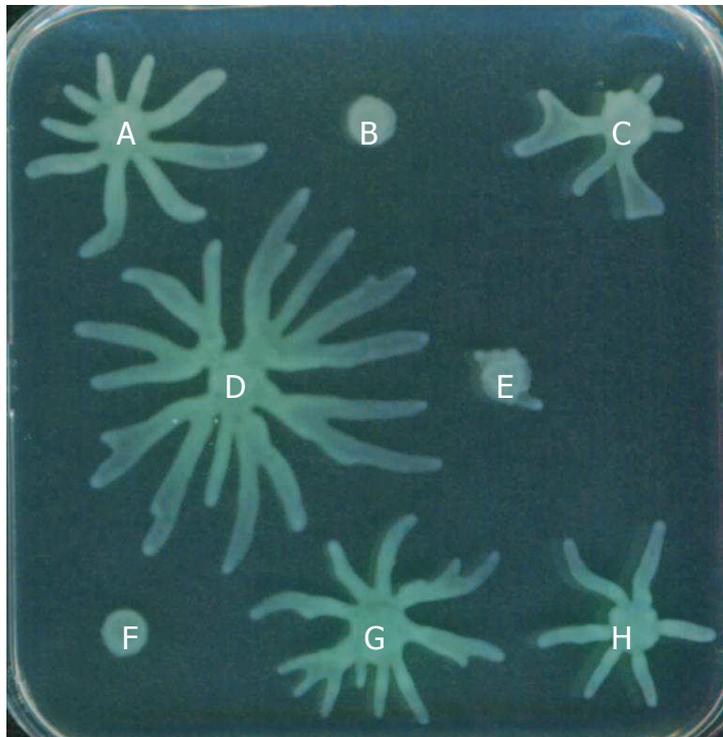
549 <sup>d</sup>: Results from the addition of each virulence test (biofilm/1, swarming/1, elastase/1, hemolysis/1, pyocyanin/1)



550

551 **Figure 1: Correlation between levels of *mexE* expression, resistance and virulence factors in PA14ΔS complemented with *mexS* alleles from 13**  
 552 **clinical isolates.** The expression levels of operon *mexEF-oprN*, as assessed by RT-qPCR of gene *mexE*, are expressed as ratios to that of wild-type  
 553 PA14 (set a 1 by definition). Ciprofloxacin MICs (diamonds) are expressed as ratios relative to PA14 values. The virulence score (circles) is  
 554 determined by the number of positive results to different 5 virulence tests (biofilm formation, swarming motility, elastase production,  
 555 haemolysis activity, and pyocyanin secretion) as indicated in Table IV. The negative and positive controls PA14 and PA14ΔS, respectively are  
 556 indicated.

557 **Figure 2: Swarming motility of PA14ΔS complemented with different mutated *mexS* alleles from**  
558 **clinical isolates.** Swarming motility was evaluated as the capacity to give rise to dendritic-like patterns.  
559 PA14, PA14ΔS<sub>PA14</sub> (A and C, positive controls) and PA14ΔS (B, negative control) are indicated.  
560 Inactivation leading to aberrant protein MexS (in PA14ΔS<sub>1711</sub> for example) abolished the swarming (F). In  
561 most cases, substitutions in MexS did not affect the ability of bacteria to swarm, for example, V<sub>104</sub>A (D),  
562 F<sub>185</sub>L (G) and D<sub>44</sub>E (H), except the L<sub>263</sub>Q substitution leading to about complete loss of motility (E).  
563  
564



- 565 1. **Ditta, G., S. Stanfield, D. Corbin, and D. R. Helinski.** 1980. Broad host range DNA cloning  
566 system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. Proc  
567 Natl Acad Sci U S A **77**:7347-51.
- 568 2. **Dumas, J. L., C. van Delden, K. Perron, and T. Köhler.** 2006. Analysis of antibiotic  
569 resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. FEMS  
570 Microbiol Lett **254**:217-25.
- 571 3. **Herrero, M., V. de Lorenzo, and K. N. Timmis.** 1990. Transposon vectors containing non-  
572 antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of  
573 foreign genes in gram-negative bacteria. J Bacteriol **172**:6557-67.
- 574 4. **Hoang, T. T., A. J. Kutchma, A. Becher, and H. P. Schweizer.** 2000. Integration-proficient  
575 plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of  
576 reporter and expression strains. Plasmid **43**:59-72.
- 577 5. **Kaniga, K., I. Delor, and G. R. Cornelis.** 1991. A wide-host-range suicide vector for  
578 improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of  
579 *Yersinia enterocolitica*. Gene **109**:137-41.
- 580 6. **Köhler, T., M. Michea-Hamzehpour, U. Henze, N. Gotoh, L. K. Curty, and J. C. Pechère.**  
581 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system  
582 of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol **23**:345-54.
- 583 7. **Lacks, S., and B. Greenberg.** 1977. Complementary specificity of restriction endonucleases  
584 of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. J Mol Biol **114**:153-68.
- 585 8. **Llanes, C., T. Köhler, I. Patry, B. Dehecq, C. van Delden, and P. Plésiat.** 2011. Role of the  
586 Efflux System MexEF-OprN in Low Level Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to  
587 Ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother **55**:5676-84.
- 588 9. **Manoil, C., and J. Beckwith.** 1985. TnpHoA: a transposon probe for protein export signals.  
589 Proc Natl Acad Sci U S A **82**:8129-33.
- 590

## 6 RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES À L'ARTICLE 4

### 6.1 SEQUENÇAGE A HAUT DEBIT POUR IDENTIFIER UN NOUVEAU REGULATEUR DE MEXEF-OPRN

#### 6.1.1 Sélection des souches cliniques surproductrices de MexEF-OprN

Le travail effectué sur la collection de mutants *nfxC* 2012-2013 (article 4) a finalement montré que (i) 4 souches possèdent des altérations délétères au sein du gène *mexS* responsables d'une augmentation de la résistance aux substrats de la pompe et d'une diminution de la virulence, (ii) 8 souches présentent des substitutions d'acide aminé dans la protéine MexS conduisant à un phénotype résistant et à une virulence préservée et (iii) pour 10 isolats, la surexpression de la pompe n'est due à des mutations, ni dans *mexS*, ni dans *mexT*, suggérant l'existence d'autres régulateurs du système d'efflux.

Afin d'identifier ces régulateurs potentiels, nous avons recherché dans la base informatique du laboratoire de Bactériologie du CHRU de Besançon, si des souches de phénotype sauvage, avaient été isolées précédemment ou conjointement chez les patients colonisés/infectés par des mutants *nfxC*. L'objectif était de sélectionner des couples d'isolats WT/*nfxC* d'origine clonale et de comparer leurs génomes. La comparaison des SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) devait permettre d'identifier le(s) événement(s) génétique(s) à l'origine de la surproduction de la pompe. Ainsi, au cours de la période d'étude (mai 2012 à mai 2013), 4 groupes de souches ont été sélectionnés chez 4 patients : un groupe composé de 6 isolats (3 WT / 3 *nfxC*) et trois groupes composés d'un couple WT/*nfxC* (*Tableau 12*). Afin de vérifier la clonalité des isolats au sein de chaque groupe, un génotypage par MLVA (*Multiple Loci VNTR Analysis*) a été réalisé par le CNR de la résistance aux antibiotiques (*Figure 38*).

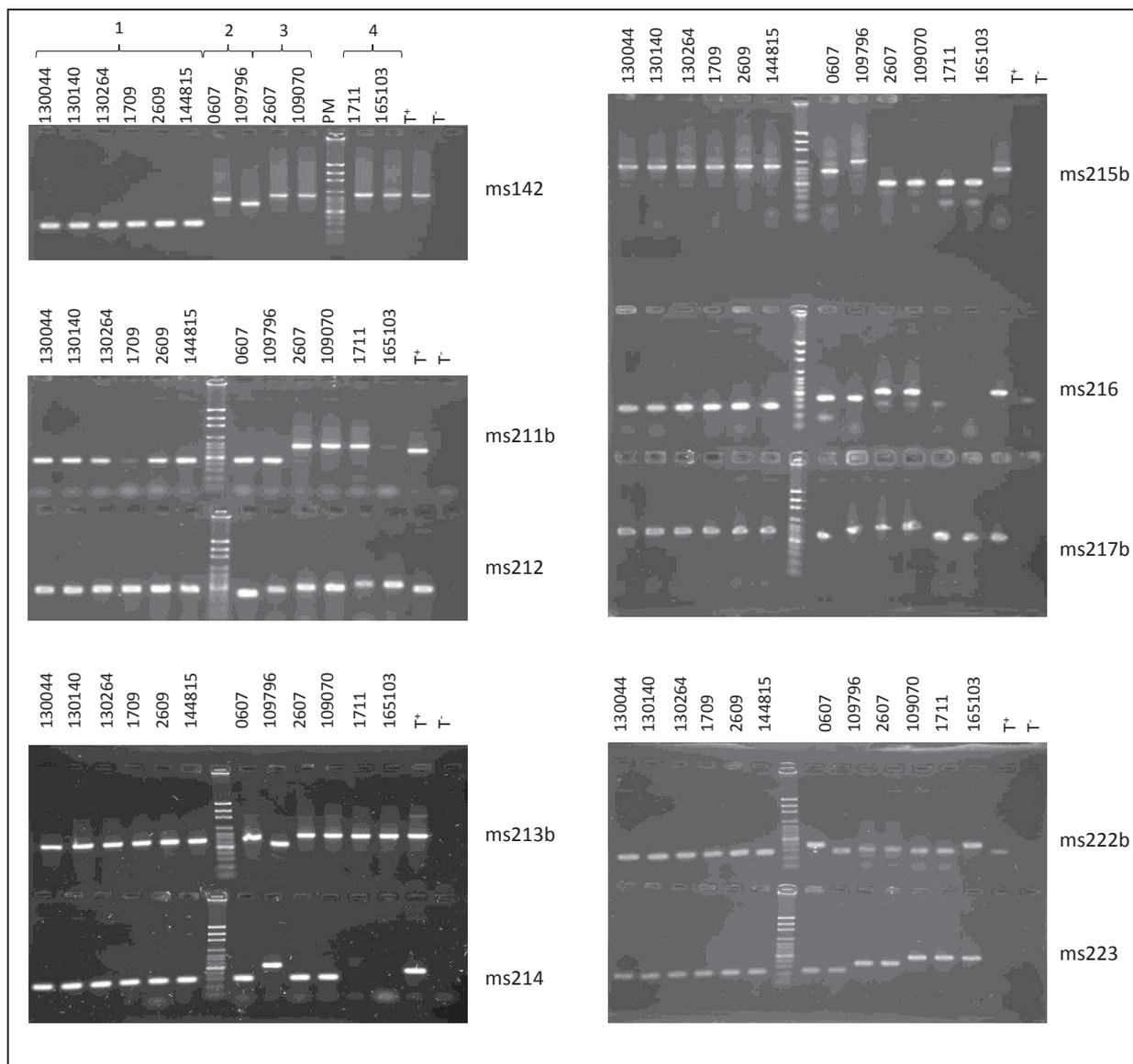


Figure 38 : Profils électrophorétiques réalisés pour le génotypage des souches des 4 groupes *nfxC/WT* par PCR MLVA. En dehors du groupe 2 pour lequel les profils sont différents, les groupes 1, 3 et 4 sont constitués de souches isogéniques.

Tous les groupes, à l'exception du couple 0607/109796 (groupe 2), sont isogéniques et présentent le même nombre de répétitions de VNTR (Figure 38). Les groupes 1, 3 et 4 ont donc été retenus pour la suite de l'étude. Le séquençage ultérieur des gènes *mexS* et *mexT* nous a permis de constater que les isolats *nfxC* du groupe 1 et du groupe 4 présentent des altérations dans la séquence protéique de MexS par comparaison à celles des isolats WT (Tableau 12). Seul le couple 3, au sein duquel aucune altération,

ni dans MexS, ni dans MexT, MvaT ou AmpR n'a été noté, nous a semblé un bon candidat pour une analyse génomique.

**Tableau 12 : Caractéristiques des groupes de souches *nfxC*/WT isolées au CHRU de Besançon.**

Groupe	Souche	Date d'isolement	Type de prélèvement	Traitement antibiotique <sup>a</sup>	Expression de <i>mexE</i> <sup>b</sup>	WT/ <i>nfxC</i>	Séquence protéique <sup>c</sup>	
							MexS <sup>d</sup>	MexT
1	130044	09/09/12	Urine	Aucun	1,50	WT	WT	WT
	130140	10/09/12	Aspiration trachéale		0,75	WT	WT	WT
	130264	10/09/12	Aspiration trachéale		1,49	WT	WT	WT
	1709	17/09/12	Plaie cervicale		552	<i>nfxC</i>	FS	WT
	2609	29/09/12	Plaie cervicale		534	<i>nfxC</i>	L <sub>263</sub> Q	WT
	144815	08/10/12	Plaie cervicale		234	<i>nfxC</i>	L <sub>263</sub> Q	WT
2	109796	27/07/12	Liquide péritonéal	IPM, AMK	2,02	WT	WT	WT
	0607	06/07/12	Matériel implantable		556	<i>nfxC</i>	FS	WT
3	109070	26/07/12	Aspiration trachéale	OFL, IPM, CAZ, AMK	1,79	WT	WT	WT
	2607	26/07/12	Liquide péritonéal		39	<i>nfxC</i>	WT	WT
4	165103	17/11/12	Plaie vertébrale	Aucun	1,36	WT	WT	WT
	1711	17/11/12	Urine		825	<i>nfxC</i>	FS	WT

<sup>a</sup> Précédant l'isolement de la souche ; <sup>b</sup> en comparaison à PA14 dont l'expression est arbitrairement définie à 1. <sup>b</sup> Les protéines sont considérées WT lorsque la séquence correspond exactement à celle de PA14 ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)). <sup>c</sup> FS (*Frameshift*): délétion d'un ou plusieurs nucléotides entraînant un décalage du cadre de lecture. IPM : imipénème, AMK : amikacine, OFL : ofloxacine (fluoroquinolone), CAZ : ceftazidime.

### 6.1.2 Analyse du séquençage à haut débit

Les génomes des deux isolats WT/*nfxC* (109070/2607, respectivement) ont donc été séquencés par une technique à haut débit dans le but de comparer leurs séquences. Le séquençage a été réalisé par la plateforme séquençage de la SFR-FED 4234 (Besançon) avec la technologie PGM Ion Torrent.

Après alignement des séquences avec la souche PAO1 ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)), une première analyse (logiciel *Bionumerics* version 7.5) a identifié 22882 mutations chez la souche WT et 17753 chez le mutant *nfxC*. La comparaison de ces mutations deux à deux a permis d'en conserver 660, retrouvées uniquement chez le mutant *nfxC*. Afin de s'affranchir des erreurs liées au séquençage, seules les variations nucléotidiques identifiées dans au moins 75% des lectures ont été considérées comme

probables (fréquence de variation  $\geq 75\%$ ) (soit 443 mutations). La technologie PGM Ion Torrent n'étant pas appropriée pour identifier des *indels*, nous n'avons retenu au final que 332 SNP entre le WT et le mutant *nfxC* (Figure 39), un nombre étonnamment important pour des souches « isogéniques ». Une nouvelle version du logiciel (*Bionumerics Variant caller 4.4.3.3*) permettant d'éliminer directement les *indels* et tous les SNPs dont la couverture est inférieure à 5, a conduit à la sélection de 26507 SNP chez la souche WT et 23995 chez le mutant *nfxC* par comparaison avec PAO1. Au final, seules 494 SNP étaient propres au mutant. Après avoir filtré les mutations dont la fréquence de variation était  $< 75\%$  et celles identifiées sur un seul des deux brins de l'ADN, 213 SNP ont été retenues pour cette deuxième analyse (Figure 39).

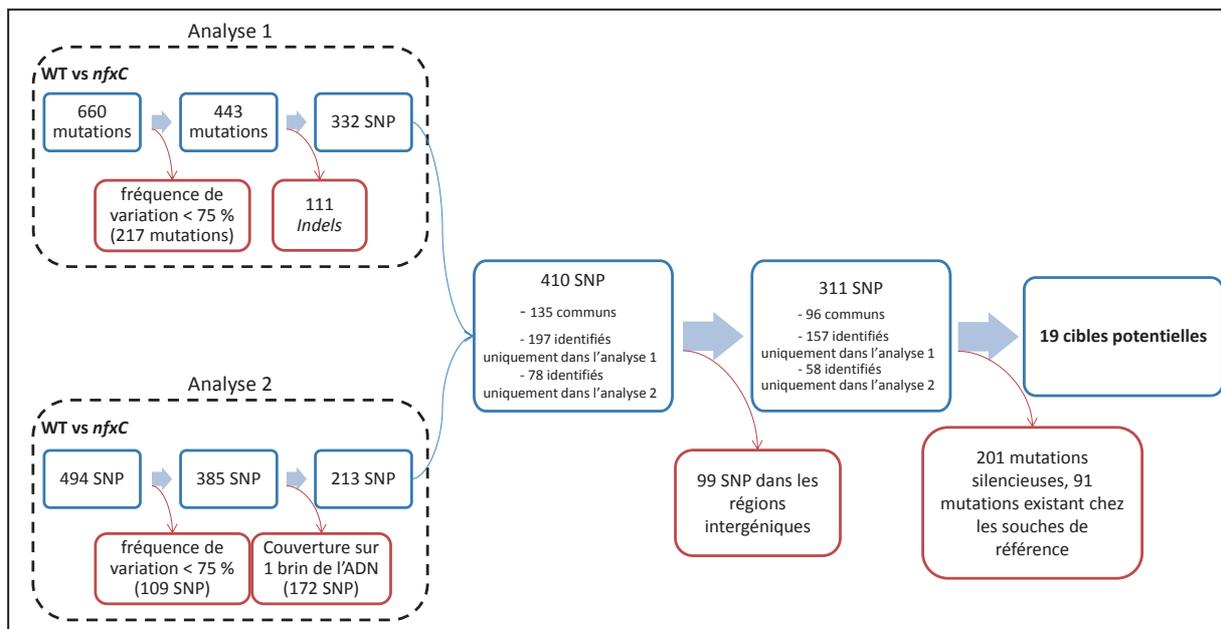


Figure 39 : Stratégie d'analyse du séquençage à haut débit des souches 109070/2607 (WT/*nfxC*). Les cadres colorés représentent les SNPs qui ont été éliminés de l'étude (rouges) et ceux qui ont été conservés (bleus).

Au final, ces deux analyses ont permis d'identifier 410 gènes potentiellement intéressants (dont 135 communs aux deux analyses) (Figure 39). Après avoir éliminé 99 SNP localisés dans les régions intergéniques, 201 SNP silencieux, et 91 SNP présents chez d'autres souches de référence sauvages (PA14, PACS2, LESB58) et donc jugés comme non significatifs, restaient 19 cibles potentielles (Tableau 13).

Parmi ces 19 cibles, se trouvent des gènes codant pour (i) des protéines hypothétiques (n=11), (ii) des enzymes du métabolisme (n=3), (iii) des protéines de systèmes d'efflux (n=3), (iv) une protéine impliquée dans la synthèse des pili de type IV et dans la virulence et (v) un probable régulateur transcriptionnel de la famille AraC (*Tableau 13*). Nous avons choisi d'analyser 7 mutations pour lesquelles le score était supérieur à 2000, ce qui correspond à une couverture supérieure à 20 et une fréquence de variation supérieure à 90 %. Bien que ne répondant pas à ces critères, le gène *PA3215*, le seul à coder pour un régulateur transcriptionnel potentiel (AraC), a été ajouté à cette analyse. Pour les 8 cibles, la mutation a été confirmée par séquençage Sanger chez le mutant *nfxC* mais également chez la souche WT, ce qui ne nous a pas permis d'exploiter plus en avant les données de ce couple WT/*nfxC*.

Au final, cette stratégie s'est révélée infructueuse pour identifier de nouveaux gènes régulateurs de l'opéron *mexEF-oprN*, en raison des multiples SNP non-significatifs présents dans les souches 2607 et 109070, et ce en dépit du fait que les bactéries aient été isolées le même jour, du même patient. Afin de s'affranchir des contraintes que peuvent subir les souches à l'hôpital, une stratégie basée sur la sélection *in vitro* en une seule étape de mutants *nfxC* aura probablement plus de chance d'aboutir (thèse Paulo Jaurez).

**Tableau 13 : Résultats du séquençage à haut débit : gènes mutés chez le mutant 2607 et potentiellement impliqués dans la régulation de mexEF-oprN.**

Position	Mutation	Substitution	Fréquence de variation (%)	Couverture	Score	Nom du gène	Rôle*
<i>Protéines de fonction inconnue</i>							
1031957	C → G	G <sub>49</sub> A	97	109	10600	PA0943	Protéine hypothétique
4396927	C → T	S <sub>374</sub> N	100	52	5200	PA3923	Protéine hypothétique
2624852	A → T	S <sub>217</sub> C	100	47	4700	PA2373	Protéine hypothétique conservée
296814	T → G	K <sub>16</sub> N	96	25	2400	PA0262	Protéine hypothétique conservée
2328887	G → C	D <sub>90</sub> E	84	19	1599	PA2117	Protéine hypothétique
120416	C → G	P <sub>85</sub> A	86	14	1199	PA0099	Protéine hypothétique
6148560	G → C	S <sub>81</sub> T	80	10	800	PA5457	Protéine hypothétique
4358188	C → G	Q <sub>296</sub> H	100	7	700	PA3892	Protéine hypothétique conservée
5727627	G → C	A <sub>617</sub> G	100	7	700	PA5089	Protéine hypothétique
4284814	C → G	R <sub>224</sub> P	100	5	500	PA3827	Protéine hypothétique conservée
5406361	C → T	A <sub>66</sub> V	100	5	500	PA4816	Protéine hypothétique
<i>Protéines du métabolisme</i>							
4788141	G → C	A <sub>92</sub> G	100	39	3900	PA4280 <i>birA</i>	Protéine bifonctionnelle BirA, synthèse de cofacteurs
3389037	C → A	G <sub>132</sub> W	78	9	700	PA3025	Probable glycérol-3-phosphate déshydrogénase FAD dépendante
6136680	G → C	A <sub>145</sub> G	100	5	500	PA5447 <i>wbpZ</i>	Glycosyltransférase WbpZ
<i>Transporteurs</i>							
272536	C → G	E <sub>232</sub> Q	81	64	5196	PA0241	Probable transporteur de la famille MFS
1206651	T → C	V <sub>294</sub> A	80	5	400	PA1113	Probable ligand de l'ATP/perméase d'un système de type ABC
2212018	C → A	E <sub>165</sub> D	80	5	400	PA2019 <i>mexX</i>	Précurseur de la protéine de fusion du système RND MexXY
<i>Protéine de la synthèse des pili</i>							
5070090	G → A	A <sub>110</sub> T	87	46	4000	PA4526 <i>pilB</i>	Protéine de biosynthèse des pili de type IV, PilB
<i>Régulateur transcriptionnel</i>							
3604474	C → A	E <sub>178</sub> D	100	6	600	PA3215	Probable régulateur transcriptionnel de la famille AraC

\* Les cibles en gras ont été vérifiées par séquençage Sanger.

## *D. Discussion*

---

Les carbapénèmes, sont encore aujourd'hui des molécules de choix pour le traitement des infections à *P. aeruginosa* (Goulenok *et al.*, 2011). Leur large spectre antibactérien et leur grande stabilité vis-à-vis de nombreuses  $\beta$ -lactamases expliquent pourquoi ces médicaments sont largement prescrits à l'hôpital dans les infections à bactéries multirésistantes (BMR). Cette utilisation fréquente, notamment dans les services de soins intensifs, s'accompagne de la sélection de souches résistantes, en particulier chez *P. aeruginosa* (Castanheira *et al.*, 2014a; Davies *et al.*, 2011; Giske *et al.*, 2008; Hammami *et al.*, 2009; Pai *et al.*, 2001; Riera *et al.*, 2011). En 2006, le réseau Mystic, regroupant 40 centres européens, évaluait à 24,6 % le pourcentage de souches de *P. aeruginosa* résistantes à l'imipénème, et 18 % celui au méropénème (Turner, 2009). Toutefois deux études multicentriques françaises ont montré que seulement 0,2 à 0,5 % des souches isolées produisaient une carbapénémase (Cavallo *et al.*, 2007; Hocquet *et al.*, 2010). En fait, le mécanisme majeur responsable de la résistance aux carbapénèmes est incontestablement la « perte » de la porine spécifique OprD, bien que la cause n'en soit pas toujours connue. Dans ce contexte, notre travail a permis de faire le point sur la résistance aux carbapénèmes grâce à deux études multicentriques française (Fournier *et al.*, 2013; Llanes *et al.*, 2013). Les mécanismes à l'origine de cette résistance (production de carbapénémases, de pompes d'efflux, et/ou perte de la porine OprD) ont été retrouvés dans les mêmes proportions chez les souches CF et non-CF, suggérant que le contexte particulier de la mucoviscidose ne sélectionne pas un type de mutants préférentiellement. En revanche, les niveaux de résistance atteints par les isolats CF peuvent être plus élevés, en particulier chez les souches hypermutatrices (Oliver *et al.*, 2000). Comme déjà noté dans une étude antérieure (Tomás *et al.*, 2010), la résistance à l'imipénème des souches CF et non-CF est essentiellement due à des altérations de la porine OprD (109/109 souches non-CF et 41/42 souches CF) et plus rarement à la production de carbapénémase : VIM-1, VIM-2, VIM-4 ou IMP-29 (dans 7/109 souches non-CF et 1/42 souches CF).

Pour la première fois, des substitutions d'acides aminés au sein de la porine ont été rendues responsables d'un défaut de fonctionnalité ou d'une altération de la structure de la porine et ce, chez 9,5% et 7,7% des souches CF et non-CF non-sensibles à l'imipénème, respectivement (Fournier *et al.*, 2013; Llanes *et al.*, 2013; Richardot *et al.*, 2015). Récemment, les acides aminés essentiels au passage des substrats ont été identifiés. Il s'agit des résidus S<sub>302</sub>, D<sub>307</sub> et Y<sub>282</sub> de la boucle L7 et ceux du rail électrophorétique (R<sub>30</sub>, R<sub>39</sub>, K<sub>375</sub>, R<sub>389</sub>, R<sub>391</sub> et R<sub>410</sub>) (Parkin & Khalid, 2014). Cependant, aucun de ces résidus n'était modifié dans nos isolats cliniques résistants. Les substitutions étaient localisées ailleurs, dans le tonneau  $\beta$  ou dans les boucles périplasmiques, et conduisaient le plus souvent à la disparition de la porine de la membrane externe plutôt qu'à un défaut de fonctionnalité. Il est intéressant de noter que l'absence de la porine ne semble pas désavantager la bactérie en terme de vitalité (Tamber & Hancock, 2006), et qu'elle pourrait même lui conférer un avantage sélectif en plus de la résistance aux traitements antibiotiques (Skurnik *et al.*, 2013). D'ailleurs, le déficit en porine OprD peut apparaître chez des souches infectant ou colonisant des patients en l'absence de traitement par des carbapénèmes (Wolter *et al.*, 2008). Récemment, l'injection d'une banque de mutants d'insertion (Tn) de PA14 dans le tractus gastro-intestinal d'une souris a montré que 42% des isolats persistants et 94% des isolats capables de disséminer dans la rate étaient des mutants *oprD*<sup>-</sup> (Skurnik *et al.*, 2013). Toutefois, le bénéfice que pourrait conférer la perte de la porine est perdu *in vitro* lors d'une compétition  $\Delta$ *oprD*/WT. L'analyse par RNAseq d'un mutant Tn::*oprD* a révélé qu'aucun caractère de virulence n'était modifié chez le mutant en comparaison à la souche WT. En revanche, la croissance de ce dernier était plus efficace à pH acide (pH5 de l'estomac murin) et il montrait une plus grande cytotoxicité vis-à-vis des phagocytes. Les raisons en sont inconnues mais semblent, d'ores et déjà, indépendantes d'un système de sécrétion (Skurnik *et al.*, 2013). Enfin, le déficit en porine OprD pourrait être compensé par des homologues OprD-like

capables de faciliter la diffusion des acides aminés basiques mais pas celles des carbapénèmes. L'analyse du génome de *P. aeruginosa* met en évidence 7 protéines appartenant à la famille « OprD » (Eren *et al.*, 2012). C'est le cas de la porine OpdP (renommée OccD3), qui est surproduite chez un mutant  $\Delta oprD$  et permet la croissance bactérienne en milieu minimum avec de l'arginine comme seule source de carbone (Tamber & Hancock, 2006). Ainsi, l'inactivation fréquente du gène *oprD* par des mutations (Pirnay *et al.*, 2002) ne conduit pas la bactérie vers une impasse car elle possède des voies compensatrices lui permettant de maintenir sa vitalité.

L'étude des souches cliniques CF et non-CF indique que l'expression du gène *oprD* est réduite dans environ 13% des cas, en raison d'une régulation inverse avec certains systèmes d'efflux et plus particulièrement MexEF-OprN. Les fluoroquinolones, utilisées *in vitro* à des concentrations inhibitrices ( $\geq 2x$  la CMI), sélectionnent aisément les mutants *nfxC* tout comme les mutants surproducteurs des systèmes d'efflux MexAB-OprM ou MexCD-OprJ (Köhler *et al.*, 1997a). Par contre, nous avons constaté qu'en utilisant des concentrations sub-inhibitrices de ciprofloxacine parfois atteintes chez le patient (Dan *et al.*, 1993), la surproduction de MexEF-OprN (due à l'inactivation de MexS) est plus fréquente que celle d'autres systèmes d'efflux. L'émergence de mutants *nfxC* est évidente, surtout dans les heures qui suivent l'exposition à la ciprofloxacine, laissant d'autres mécanismes plus spécifiques (mutations dans les QRDR) se mettre en place les jours suivants. La surproduction du système d'efflux, bien qu'elle permette d'échapper à l'accumulation intracellulaire d'antibiotique, reste toutefois un mécanisme coûteux en énergie, se manifestant par une réduction de la vitesse de croissance (Kugelberg *et al.*, 2005). Les mutations qui affectent les topoisomérases et donc la transcription et la réplication de l'ADN, ont quant à elles un coût énergétique variable. Mais plusieurs travaux rapportent la mise en place de mutations compensatoires permettant à la bactérie de préserver ses fonctions vitales (Anderson *et al.*, 2012; Kugelberg *et al.*, 2005).

Si l'absence de la porine OprD semble avantager *P. aeruginosa* dans un contexte clinique, le bénéfice de la surproduction de MexEF-OprN est moins évident car, *in vitro*, cela rend la bactérie déficiente dans la production de nombreux facteurs de virulence (rhamnolipides, élastase, biofilm, pyocyanine et mobilité de type *swarming*) et hypersensible aux  $\beta$ -lactamines et aux aminosides. Cette perte de virulence des mutants *nfxC* n'est d'ailleurs pas spécifique de l'espèce *P. aeruginosa* puisque, chez *P. syringae*, elle a également été associée à une moindre production de molécules du *quorum sensing* (HSL) (Kawakita *et al.*, 2012). Le devenir de ces mutants a été étudié *in vivo* dans un modèle de pneumonie aiguë chez le rat (Join-Lambert *et al.*, 2001). Les chercheurs notent d'emblée que la fréquence d'apparition des mutants résistants à la ciprofloxacine chez le rat est 10 fois supérieure à celle obtenue *in vitro* sur gélose ou en bouillon. Par ailleurs, en présence de 12,5 mg/kg de ciprofloxacine (correspondant 5h après injection à environ 0,2  $\mu$ g/mL soit deux fois la CMI de PAO1), 87 % des mutants résistants sélectionnés surexpriment *mexEF-oprN*. Cette valeur chute à 20 % chez les rats-contrôle sans traitement antibiotique (Join-Lambert *et al.*, 2001). Cette valeur est d'ailleurs proche de celle relevée dans nos collections de souches cliniques, où 19% des isolats résistants à la ciprofloxacine et à l'imipénème surproduisent MexEF-OprN. A l'inverse, l'infection d'une fuite anastomotique chez le rat par un mutant *nfxC* conduit rapidement à la réversion de celui-ci en une souche WT, suite à l'apparition d'un codon stop au sein du gène *mexT*. Il semblerait que cette réversion du phénotype permette à la souche de restaurer sa vitalité pour être plus compétitive face aux bactéries commensales de l'intestin (Olivas *et al.*, 2012). Cette observation va dans le sens d'une moindre pathogénicité et pourrait expliquer le nombre réduit de mutants *nfxC* cliniques rapportés dans la littérature. Toutefois, le pouvoir pathogène de *P. aeruginosa* repose sur la production d'un vaste arsenal de facteurs de virulence. En agissant à différents niveaux au cours de l'infection, ces facteurs lui permettent soit de disséminer et générer des lésions tissulaires dans les infections aiguës, soit de

s'isoler des défenses immunitaires en perdant ses caractères les plus immunogènes dans les infections chroniques comme la mucoviscidose (Dettman *et al.*, 2013). Ainsi, en analysant la production des facteurs de virulence chez des souches de différentes origines (cliniques ou environnementales), on constate que les isolats dont la virulence est diminuée en raison d'une altération du gène *lasR*, sont régulièrement retrouvés, chez 18% des souches (Cabrol *et al.*, 2003; Hamood *et al.*, 1996; Schaber *et al.*, 2004). Les mutants *nfxC* pourraient faire partie de ces bactéries, à priori peu avantagées pour se développer sur un site infectieux, mais qui trouvent finalement dans l'écosystème du patient des éléments favorables à leur maintien. Dans certains cas, ils se retrouvent en populations mixtes, avec leur parent WT et pourraient être alors considérés comme une sous-population de *cheaters* (groupes 3 et 4 du *Tableau 12*).

L'analyse systématique des souches du CHRU de Besançon a montré pour la première fois que les mutants *nfxC* ne sont, en fait, pas si rares en clinique et que, de surcroît, ils montrent des caractères différents de leurs homologues sélectionnés *in vitro*. En effet, ils sont rarement hypersensibles aux  $\beta$ -lactamines (7/22 isolats en comparaison à PA14) et jamais aux aminosides. La surproduction des systèmes d'efflux MexAB-OprM et MexXY/OprM (en plus de MexEF-OprN), consécutive à l'apparition de mutations permettrait à la bactérie de résister à ces deux grandes familles d'antibiotiques largement utilisées en clinique. Alternativement, il est possible que les mutations *nfxC* ne donnent un phénotype stable *in vivo* que si elles apparaissent chez des mutants surproduisant déjà MexAB-OprM ou MexXY/OprM. De plus, les mutants *nfxC* conservent fréquemment leur capacité à produire des facteurs de virulence, certains même plus que la souche sauvage PA14 (par exemple, la pyocyanine).

Ce phénomène s'observe tout particulièrement lorsque la surexpression de *mexEF-oprN* est causée par des substitutions d'acides aminés dans MexS qui, potentiellement pourraient préserver l'activité de l'oxydoréductase.

Le rôle physiologique de MexS, aujourd'hui inconnu, semble pourtant essentiel car cette protéine est conservée chez la plupart des souches de *Pseudomonas* qu'elles soient environnementales ou cliniques ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)). Sa localisation, en amont d'un opéron d'efflux n'est cependant conservée que chez *P. aeruginosa* et *P. stutzeri*. Elle est parfois classée comme quinone déshydrogénase ou comme alcool déshydrogénase, qui fonctionnerait avec le NADPH comme co-facteur chez *Pseudomonas fulva* ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)). Afin de préciser la fonction exacte de cette protéine, différentes approches peuvent être envisagées : (i) la première consiste à cristalliser la protéine afin de caractériser sa structure, (ii) la deuxième est de purifier l'enzyme afin de développer un test de crible de molécules organiques susceptibles de se révéler ses substrats. Puisque MexS est co-régulée avec MexEF-OprN MexT, elle pourrait elle aussi jouer un rôle dans la détoxification de la cellule et tout particulièrement contribuer à la résistance au stress nitreux. Ainsi, les molécules nitro-aromatiques, pourraient être de bons candidats comme substrats de MexS pour ce crible.

Dans les isolats cliniques, les substitutions affectant MexS sont 3 fois plus fréquentes (10/22 mutants *nfxC*) que les inactivations du gène *mexS* (3/22 mutants *nfxC*). En réalité, alors même que la génération d'*indels* dans un gène est plus fréquente en théorie que celle de SNP se traduisant par des substitutions d'acides aminés (76% d'*indels* et 9,5 % de substitutions dans le cas de la porine OprD), nous avons fait un parallèle entre les différents types de mutations pouvant affecter le gène *mexS*, les niveaux d'expression de *mexE*, les CMI des antibiotiques substrats de la pompe et le déficit en facteurs de virulence. Ainsi, les substitutions supportées par MexS

conduisent à une surexpression modérée de *mexE* (de 21 à 230 fois celle de PA14), se traduisant par une augmentation de 2 à 16 fois de la CMI de la ciprofloxacine et par le « maintien » présumé de la virulence. A l'inverse, l'inactivation totale de MexS est associée à des quantités relatives de transcrits de *mexE* bien supérieures (de 320 à 492 fois), des CMI plus élevées (32 fois supérieures à celle de PA14), et un fort déclin des facteurs de virulence analysés. D'ailleurs les 3 mutants *nfxC* cliniques dont le gène *mexS* est inactivé n'étaient pas responsables d'une infection, mais seulement d'une colonisation.

Cette corrélation inverse entre virulence et résistance a déjà été observée chez 16 souches isolées en Turquie dans des prélèvements pulmonaires, toutes déficientes dans la production de HSL (Karatuna & Yagci, 2010). Dans cette étude, la perte de production de l'élastase a pu être statistiquement corrélée à une plus grande résistance à la pipéracilline et à la ceftazidime ; la perte de la protéase alcaline a été associée à la résistance à la tobramycine, la pipéracilline, au céfépime, l'imipénème et la ciprofloxacine ; la perte de la pyocyanine allait de paire avec la résistance à l'amikacine, la tobramycine, la ceftazidime, la ciprofloxacine et l'ofloxacine. Les auteurs suggèrent que la surproduction de pompes d'efflux pourrait être responsable de ce phénomène. En effet, si le C<sub>4</sub>-HSL diffuse librement à travers la paroi bactérienne, l'accumulation intracellulaire de 3-céto-C<sub>12</sub>-HSL est diminuée par la surproduction de la pompe MexAB-OprM elle-même responsable de la résistance aux β-lactamines (Evans *et al.*, 1998; Minagawa *et al.*, 2012; Pearson *et al.*, 1999). Chez les mutants *nfxC*, la production de HSL est également diminuée, en raison de l'export du HHQ, un précurseur de synthèse du PQS, par MexEF-OprN, dont l'activité accroît la résistance aux fluoroquinolones (Köhler *et al.*, 2001; Lamarche & Déziel, 2011).

Dans les souches cliniques, la surexpression de *mexEF-oprN* dépend principalement de l'activité du LTTR MexT. L'analyse du régulon de cet activateur transcriptionnel apporte des informations sur les effets associés à la surproduction de la pompe d'efflux, voire les avantages que peut y trouver la bactérie (Fargier *et al.*, 2012; Tian *et al.*, 2009a). Il ressort de ces analyses que MexT semble être activé en réponse à un stress nitreux. D'ailleurs, le fait que MexEF-OprN soit co-régulé avec l'oxydoréductase XenB, dont le rôle est d'éliminer les groupements NO (Fetar *et al.*, 2011) conforte cette hypothèse. La maîtrise du stress nitreux combinée à la surproduction d'une pompe RDN n'est pas propre à *P. aeruginosa*, puisqu'elle a déjà été constatée chez *Klebsiella pneumoniae* avec un autre LTTR OxyR<sup>KP</sup> (Srinivasan *et al.*, 2013). Ainsi, dans un environnement comme le poumon CF, où le stress oxydatif est important en raison de l'hyperproduction de cytokines pro-inflammatoires (Vitko *et al.*, 2015), les mutants *nfxC* pourraient trouver un avantage sélectif à l'activation de MexT. Dans ce milieu, les faibles concentrations en oxygène contraignent *P. aeruginosa* à utiliser la chaîne respiratoire des nitrates (Dettman *et al.*, 2013) dont les gènes sont co-régulés avec MexEF-OprN (Olivares *et al.*, 2012). L'ensemble de ces observations nous laisse penser que les mutants *nfxC* doivent être recherchés parmi les souches de patients CF et comparés à ceux isolés de patients non-CF. Il est possible qu'ils trouvent dans le poumon CF des conditions de développement favorables en raison de leur métabolisme particulier mais aussi de leur faible virulence. Des résultats préliminaires sur 7 mutants *nfxC* CF montrent d'ores et déjà que 3/7 mutants possèdent des substitutions au sein de MexS, 1/7 des substitutions dans MexT et 3/7 aucune substitution, ni dans MexS, ni dans MexT. Le clonage des gènes codant pour ces protéines devra être réalisé dans les souches PA14 $\Delta$ *mexT* et PA14 $\Delta$ *mexS* afin de vérifier leur impact réel sur la virulence des souches.

Enfin, de façon surprenante, près de la moitié des isolats cliniques *nfxC* reportés dans ce travail (12/22 non CF et 3/7 CF) surexprimaient *mexEF-oprN* sans

qu'aucune mutation dans les gènes régulateurs de l'opéron (*mexS*, *mexT*, *ampR* et *mvaT*) n'ait pu être identifiée. L'existence d'un régulateur inconnu ayant déjà été suggérée par d'autres équipes (Kumar & Schweizer, 2011; Maseda *et al.*, 2010), nous avons entrepris le séquençage à haut-débit du couple isogénique *nfxC*/WT (2607/109070) dont la séquence de *mexS* et de *mexT* était inchangée. Même si cette stratégie n'a pas permis d'identifier une nouvelle voie régulatrice de l'opéron d'efflux, le travail se poursuit actuellement au laboratoire par l'isolement *in vitro*, en une seule étape, de mutants *nfxC* dérivés de PA14 (thèse de doctorat, Paulo Juarez). Le chloramphénicol a été substitué à la ciprofloxacine pour la sélection *in vitro* de mutants *nfxC*, car cette dernière à concentration sub-inhibitrice ou inhibitrice sélectionne préférentiellement des mutants présentant une inactivation de *mexS* (Llanes *et al.*, 2011). Quatre mutants *nfxC*, ne renfermant pas de mutations dans MexS et MexT, ont été séquencés et sont en cours d'analyse. Cette approche devrait permettre d'identifier plus aisément un nouveau régulateur de MexEF-OprN. Restera à évaluer si ce dernier peut entraîner la surproduction de la pompe d'efflux dans des souches isolées de patients.

En parallèle, un site de fixation d'un potentiel répresseur de l'opéron d'efflux a été décrit et ne semble pas dépendre de la voie de régulation MexT-dépendante. Ce travail sera donc poursuivi par la sélection de nouveaux mutants à partir de la souche PA14 $\Delta$ *mexT* et permettra d'identifier des potentielles voies de régulation indépendantes de MexT.

Pour conclure, cette étude a permis de faire le point sur la résistance par imperméabilité membranaire (OprD) et par efflux actif (MexEF-OprN) chez les souches CF et non-CF. Dans certains cas, les deux mécanismes sont associés et conduisent à de la multirésistance lorsque des régulateurs transcriptionnels communs sont activés (MexT, ParR). Dans ce contexte, les inhibiteurs de pompes

d'efflux apparaissent intéressants pour potentialiser les antibiothérapies et prévenir l'émergence de mutants. Ainsi, il a été montré que la CMI de la ciprofloxacine en présence de PAβN (Phenyl Arginine β-Naphtylamide) chutait de 1 µg/mL à 0,06 µg/mL chez un mutant *nfxC* et de 0,12 à 0,06 µg/mL chez la souche sauvage dont il est issu (Grégoire *et al.*, 2010). Le développement de telles molécules, qui se heurte encore aujourd'hui à des problèmes de toxicité (Van Bambeke *et al.*, 2006), reste cependant complètement d'actualité et permettrait d'améliorer considérablement la prise en charge des infections à *P. aeruginosa*.

## *E. Matériel et méthodes*

---

# 1 TECHNIQUES MICROBIOLOGIQUES

## 1.1 SOUCHES BACTÉRIENNES ET PLASMIDES UTILISÉS

Les souches bactériennes et plasmides utilisés au cours de ce travail sont répertoriés dans les *Tableau 14* et *Tableau 15*. En plus de ces souches, 42 isolats cliniques de *P. aeruginosa* issus de patients atteints de mucoviscidose (CF) et résistants à l'imipénème ont été inclus pour étudier la porine OprD. Une collection de 22 mutants *nfxC* a également été utilisée pour l'étude de la pompe d'efflux MexEF-OprN.

*Tableau 14: Liste des souches utilisées dans cette étude*

Souches	Description	Référence
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	souche sauvage de référence, sensible et prototrophe dont la protéine MexS possède un D en position 249 et le gène <i>mexT</i> est inactif en raison d'une insertion de 8 pb dans sa séquence	(Stover <i>et al.</i> , 2000)
PA14	souche sauvage de référence, sensible et prototrophe dont la protéine MexS possède un N en position 249 et le gène <i>mexT</i> est actif	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PAO7H	mutant <i>nfxC</i> obtenu à partir de la souche PAO1, dont le gène <i>mexS</i> possède un D en position 249 et le gène <i>mexT</i> est actif	(Köhler <i>et al.</i> , 1997b)
PAO1 $\Delta$ <i>oprD</i>	souche PAO1 dont le gène <i>oprD</i> a été inactivé par délétion de 910 pb	Cette étude
PA14 $\Delta$ <i>mexS</i>	souche PAO1 dont le gène <i>mexS</i> a été inactivé par délétion de 826 pb	Cette étude
PA14 $\Delta$ <i>mexT</i>	souche PAO1 dont le gène <i>mexT</i> a été inactivé par délétion de 929 pb	Cette étude
CRPAO1	souche PAO1 $\Delta$ <i>oprD</i> complétée avec le gène <i>oprD</i> de PAO1	Cette étude
CR1-10	souche PAO1 $\Delta$ <i>oprD</i> complétée avec le gène <i>oprD</i> de la souche clinique 1-10	Cette étude
CR1-13	souche PAO1 $\Delta$ <i>oprD</i> complétée avec le gène <i>oprD</i> de la souche clinique 1-13	Cette étude
CR1-17	souche PAO1 $\Delta$ <i>oprD</i> complétée avec le gène <i>oprD</i> de la souche clinique 1-17	Cette étude
CR5-11	souche PAO1 $\Delta$ <i>oprD</i> complétée avec le gène <i>oprD</i> de la souche clinique 5-11	Cette étude
CR6-20	souche PAO1 $\Delta$ <i>oprD</i> complétée avec le gène <i>oprD</i> de la souche clinique 6-20	Cette étude
CR7-3	souche PAO1 $\Delta$ <i>oprD</i> complétée avec le gène <i>oprD</i> de la souche clinique 7-3	Cette étude
CR7-20	souche PAO1 $\Delta$ <i>oprD</i> complétée avec le gène <i>oprD</i> de la souche clinique 7-20	Cette étude

<b>CR10-16</b>	souche PAO1 $\Delta$ <i>oprD</i> complétementée avec le gène <i>oprD</i> de la souche clinique 10-16	Cette étude
<b>PA14<math>\Delta</math><i>mexSPA14</i></b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexS</i> complétementée avec le gène <i>mexS</i> de PA14	Cette étude
<b>PA14<math>\Delta</math><i>mexTPA14</i></b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexT</i> complétementée avec le gène <i>mexT</i> de PA14	Cette étude
<b>CR2502</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexS</i> complétementée avec le gène <i>mexS</i> de la souche clinique 2502	Cette étude
<b>CR1206</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexS</i> complétementée avec le gène <i>mexS</i> de la souche clinique 1206	Cette étude
<b>CR0708</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexS</i> complétementée avec le gène <i>mexS</i> de la souche clinique 0708	Cette étude
<b>CR0309</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexS</i> complétementée avec le gène <i>mexS</i> de la souche clinique 0309	Cette étude
<b>CR2607</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexS</i> complétementée avec le gène <i>mexS</i> de la souche clinique 2607	Cette étude
<b>CR0712</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexS</i> complétementée avec le gène <i>mexS</i> de la souche clinique 0712	Cette étude
<b>CR0608</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexS</i> complétementée avec le gène <i>mexS</i> de la souche clinique 0608	Cette étude
<b>CR2505</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexS</i> complétementée avec le gène <i>mexS</i> de la souche clinique 2505	Cette étude
<b>CR3005</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexS</i> complétementée avec le gène <i>mexS</i> de la souche clinique 3005	Cette étude
<b>CR2311</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexS</i> complétementée avec le gène <i>mexS</i> de la souche clinique 2311	Cette étude
<b>CR2609</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexS</i> complétementée avec le gène <i>mexS</i> de la souche clinique 2609	Cette étude
<b>CR2310</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexS</i> complétementée avec le gène <i>mexS</i> de la souche clinique 2310	Cette étude
<b>CR1307</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexS</i> complétementée avec le gène <i>mexS</i> de la souche clinique 1307	Cette étude
<b>CR1009</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexS</i> complétementée avec le gène <i>mexS</i> de la souche clinique 1009	Cette étude
<b>CR1409</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexS</i> complétementée avec le gène <i>mexS</i> de la souche clinique 1409	Cette étude
<b>CR0911</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexS</i> complétementée avec le gène <i>mexS</i> de la souche clinique 0911	Cette étude
<b>CR0801</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexS</i> complétementée avec le gène <i>mexS</i> de la souche clinique 0801	Cette étude
<b>CR1709</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexS</i> complétementée avec le gène <i>mexS</i> de la souche clinique 1709	Cette étude
<b>CR1711</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexS</i> complétementée avec le gène <i>mexS</i> de la souche clinique 1711	Cette étude
<b>CR0607</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexS</i> complétementée avec le gène <i>mexS</i> de la souche clinique 0607	Cette étude
<b>PJ0810</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexT</i> complétementée avec le gène <i>mexT</i> de la souche clinique 0810	Cette étude
<b>PJ1510</b>	souche PA14 $\Delta$ <i>mexT</i> complétementée avec le gène <i>mexT</i> de la souche clinique 1510	Cette étude

<i>Escherichia coli</i>		
<b>DH5α</b>	F- <i>supE44 endA1 hsdR17 (r<sub>K</sub> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) thi-1 recA1 Δ(argF-lacZYA) U169 Φ80dlacZΔM15 phoA gyrA96 relA1 deoR λ<sup>-</sup></i>	Invitrogen
<b>CC118</b>	Δ( <i>ara-leu</i> ) <i>araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE(Am) recA1</i>	(Manoil & Beckwith, 1985)
<b>CC118λpir</b>	CC118 lysogène pour le phage λpir	(Herrero <i>et al.</i> , 1990)
<b>HB101</b>	<i>supE44 hsd(rB- mB-) recA13 ara-14 pro A2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 leuB6 thi-1</i>	(Lacks & Greenberg, 1977)

**Tableau 15 : Liste des plasmides utilisés dans ce travail.**

Plasmides	Description	Référence
<b>pCR2.1 Blunt</b>	Vecteur de clonage des produits PCR, <i>lacZΔColE1 f1 ori, Ap<sup>r</sup> Km<sup>r</sup></i>	Invitrogen
<b>pCRΔoprD</b>	Amplicons de 468 et 439 pb entourant le gène <i>oprD</i> clonés dans le plasmide pCR2.1 Blunt	Cette étude
<b>pCRΔmexS</b>	Amplicons de 417 et 433 pb entourant le gène <i>mexS</i> clonés dans le plasmide pCR2.1 Blunt	Cette étude
<b>pCRΔmexT</b>	Amplicons de 408 et 453 pb entourant le gène <i>mexT</i> clonés dans le plasmide pCR2.1 Blunt	Cette étude
<b>pKNG101</b>	Vecteur suicide chez <i>P. aeruginosa</i> ; <i>sacB Sm<sup>r</sup></i>	(Kaniga <i>et al.</i> , 1991)
<b>pKNGΔoprD</b>	Amplicons de 468 et 439 pb entourant le gène <i>oprD</i> clonés dans le plasmide pKNG101	Cette étude
<b>pKNGΔmexS</b>	Amplicons de 417 et 433 pb entourant le gène <i>mexS</i> clonés dans le plasmide pKNG101	Cette étude
<b>pKNGΔmexT</b>	Amplicons de 408 et 453 pb entourant le gène <i>mexT</i> clonés dans le plasmide pKNG101	Cette étude
<b>mini-CTX1</b>	Vecteur d'intégration chromosomique, <i>tet Ω-FRT-attP-MCS ori int oriT, Tc<sup>r</sup></i>	(Hoang <i>et al.</i> , 2000)
<b>CTX-PAO1</b>	Amplicon de 1828 pb contenant le gène <i>oprD</i> de la souche PAO1, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-1-10</b>	Amplicon de 1828 pb contenant le gène <i>oprD</i> de la souche 1-10, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-1-13</b>	Amplicon de 1828 pb contenant le gène <i>oprD</i> de la souche 1-13, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-1-17</b>	Amplicon de 1828 pb contenant le gène <i>oprD</i> de la souche 1-17, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-5-11</b>	Amplicon de 1828 pb contenant le gène <i>oprD</i> de la souche 5-11, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-6-20</b>	Amplicon de 1828 pb contenant le gène <i>oprD</i> de la souche 6-20, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-7-3</b>	Amplicon de 1828 pb contenant le gène <i>oprD</i> de la souche 7-3, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-7-20</b>	Amplicon de 1828 pb contenant le gène <i>oprD</i> de la souche 7-20, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-10-16</b>	Amplicon de 1828 pb contenant le gène <i>oprD</i> de la souche 10-16, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-2505</b>	Amplicon de 1224 pb contenant le gène <i>mexS</i> de la souche 2505, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude

<b>CTX-3005</b>	Amplicon de 1224 pb contenant le gène <i>mexS</i> de la souche 3005, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-2311</b>	Amplicon de 1224 pb contenant le gène <i>mexS</i> de la souche 2311, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-2609</b>	Amplicon de 1224 pb contenant le gène <i>mexS</i> de la souche 2609, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-2310</b>	Amplicon de 1224 pb contenant le gène <i>mexS</i> de la souche 2310, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-1307</b>	Amplicon de 1224 pb contenant le gène <i>mexS</i> de la souche 1307, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-1009</b>	Amplicon de 1224 pb contenant le gène <i>mexS</i> de la souche 1009, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-1409</b>	Amplicon de 1224 pb contenant le gène <i>mexS</i> de la souche 1409, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-0911</b>	Amplicon de 1224 pb contenant le gène <i>mexS</i> de la souche 0911, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-0801</b>	Amplicon de 1224 pb contenant le gène <i>mexS</i> de la souche 0801, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-1709</b>	Amplicon de 1224 pb contenant le gène <i>mexS</i> de la souche 1709, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-1711</b>	Amplicon de 1224 pb contenant le gène <i>mexS</i> de la souche 1711, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-0607</b>	Amplicon de 1224 pb contenant le gène <i>mexS</i> de la souche 0607, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-0810</b>	Amplicon de 1175 pb contenant le gène <i>mexT</i> de la souche 0810, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-1510</b>	Amplicon de 1175 pb contenant le gène <i>mexT</i> de la souche 1510, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-PA14-S</b>	Amplicon de 1224 pb contenant le gène <i>mexS</i> de la souche PA14, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>CTX-PA14-T</b>	Amplicon de 1175 pb contenant le gène <i>mexT</i> de la souche PA14, cloné dans le vecteur mini-CTX1	Cette étude
<b>pRK2013</b>	Plasmide de mobilisation dérivé de pRK2, <i>mob1</i> , <i>tra1</i> , <i>colE1</i> , Km <sup>r</sup>	(Ditta <i>et al.</i> , 1980)

## 1.2 MILIEUX DE CULTURE

Selon les expériences, le milieu Mueller-Hinton calibré gélosé (MHA) ou en bouillon (MHB) dont la concentration en cations divalents Ca<sup>2+</sup> (20-25 mg/L) et Mg<sup>2+</sup> (10-12,5 mg/L) est définie (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), le milieu *Pseudomonas Isolation Agar* (PIA) (Becton Dickinson, Cockeysville, USA), le milieu minimum BM2 (60,2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 33 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 7,56 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et 1,68 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 7) contenant 0,5% de gluconate comme seule source de carbone et le milieu minimum

M9 (52,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ; 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; 8,56 mM NaCl et 18,7 mM NH<sub>4</sub>Cl, pH 7,2) contenant 5% de sucrose ou de saccharose comme seule source de carbone ont été utilisés. Les milieux ont été rendus sélectifs par l'addition de 100 µg/mL d'ampicilline, 25µg/mL de kanamycine, 50 µg/mL de streptomycine ou 15 µg/mL de tétracycline pour les souches de *E. coli* et 150 µg/mL de tétracycline ou 2000µg/mL de streptomycine pour les souches de *P. aeruginosa*.

### 1.3 MESURE DE LA CROISSANCE BACTERIENNE

A partir d'une culture fraîche sur milieu MHA, une suspension bactérienne ( $\approx 6,4.10^7$  UFC/mL) a été réalisée dans 30 mL de milieu préchauffé MHB ou BM2 supplémenté par 0,5% de gluconate. Le tout a été placé à 37 °C (+/- 0,5°C) sous agitation (250 rpm) durant 9h. Le développement bactérien a été évalué par une mesure de l'absorbance à 600 nm toutes les heures.

### 1.4 DETERMINATION DE LA SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

#### 1.4.1 Antibiogrammes

Les antibiogrammes ont été réalisés par la technique de diffusion en milieu gélosé selon les critères du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (CA-SFM, 2010). Brièvement, une dilution au 1/100<sup>ème</sup> d'une suspension bactérienne d'opacité équivalente à 0,2 sur l'échelle McFarlan (McF) a été étalée sur une gélose MHA. La lecture des diamètres d'inhibition autour des disques pré-imprégnés d'antibiotiques (BioRad) a été effectuée après 18h d'incubation à 37°C.

#### 1.4.2 Détermination de la CMI des antibiotiques

La CMI correspond à la concentration minimale d'antibiotique capable d'inhiber toute croissance bactérienne visible. Elle a été déterminée pour différents

antibiotiques par la méthode des dilutions en milieu gélosé. A partir d'une dilution au 1/10<sup>ème</sup> d'une suspension bactérienne à 0,5 McF, des dépôts correspondant à environ 10<sup>4</sup> UFC ont été réalisés grâce à un multi-ensemencement de Steers sur des géloses MHC renfermant une gamme de concentrations croissantes en antibiotique, de raison 2 (CLSI, 2014). La présence ou l'absence de spots de culture a été déterminée après 18h d'incubation à 37°C.

## 1.5 EVALUATION DE LA VIRULENCE

### 1.5.1 Dosage spectrométrique de l'activité hémolytique

Chez *P. aeruginosa* la capacité à détruire les globules rouges est causée par la production de 3 facteurs de virulence : la phospholipase C, les rhamnolipides et le T3SS. L'activité hémolytique a donc été évaluée en mettant en contact 150 µL de surnageant d'une culture aérobie de la nuit à 37 °C (250 rpm) obtenu par centrifugation à 5000 g pendant 5 min, avec 150 µL de sang de cheval défibriné dilué au 1/100<sup>ème</sup> dans du tampon PBS pendant 30 min à température ambiante. L'activité hémolytique a été évaluée en mesurant l'absorbance à 405 nm du surnageant (hémoglobine libérée) après une centrifugation de 10 min à 950 g. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la lyse totale obtenue par traitement au triton X100 (protocole adapté de (Johnson & Boese-Marrazzo, 1980)).

### 1.5.2 Dosage spectrométrique de la pyocyanine

Deux cent cinquante µL d'une suspension bactérienne à 0,3 McF, réalisée à partir de colonies isolées sur gélose enrichie en sang de mouton (5%) (Bio-Rad), ont été ajoutés à 5 mL d'un milieu tryptone (120 mM Tris-HCl pH 7,2 ; 0,1 % tryptones (p/v) ; 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ; 1,6 mM CaCl<sub>2</sub> ; 10 mM KCl ; 50 mM glucose et 24 mM citrate trisodique) puis incubés 24h à 37°C (+/- 0,5 °C) sous agitation (250 rpm). Les cultures ont ensuite été centrifugées pendant 5 min à 10000 g et le pigment bleu extrait à deux

reprises par 5 mL de chloroforme. Après élimination de la phase aqueuse supérieure, la phase organique a été acidifiée par ajout de 300  $\mu$ L d'HCl 0,2 M, transformant ainsi la pyocyanine en un pigment rose. La concentration de ce pigment a été mesurée par spectrométrie à 520 nm (adapté de (Essar *et al.*, 1990)). Les mesures ont été effectuées au moins en double. Les valeurs ont été rapportées en % par rapport à la souche de référence PA14.

### 1.5.3 Mise en évidence du *swarming*

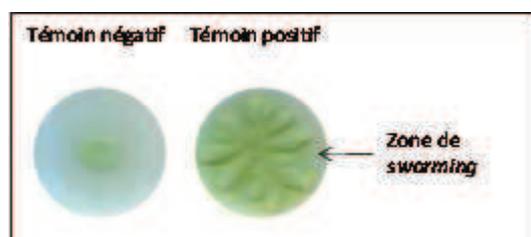


Figure 40 : Mise en évidence du *swarming*.

Cinq  $\mu$ L d'une suspension bactérienne à 0,2 McF ont été déposés à la surface d'un milieu minimum M8 supplémenté par 0,2 % de glucose, 2mM de  $MgSO_4$ , 0,5% d'hydrolat de caséine (p/v) et 0,5% d'agar. La mobilité par

*swarming* (Figure 40) due à l'action combinée des rhamnolipides, des pili et du flagelle a été appréciée visuellement par la formation de dendrites, après 24h d'incubation à 37°C (+/- 0,5°C) (Köhler *et al.*, 2000).

### 1.5.4 Activité de l'élastase

Cinq  $\mu$ L d'une suspension bactérienne à 0,2 McF ont été déposés à la surface d'un milieu MHc additionné de 1 mg/mL d'élastine Rouge-Congo (Sigma-Aldrich, St Louis, USA). La mesure de la zone d'hydrolyse (en mm) de l'élastine autour des spots de culture a été réalisée après 48h d'incubation à 37°C (+/- 0,5°C), à partir de 3 manipulations indépendantes.

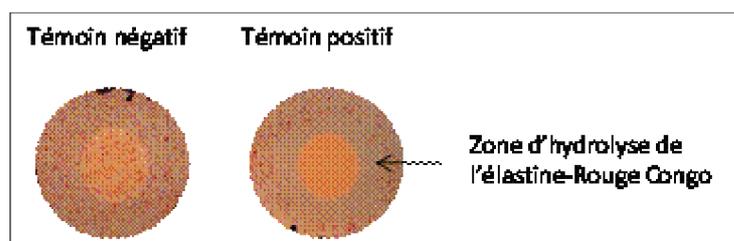


Figure 41 : Mise en évidence de l'activité de l'élastase

### 1.5.5 Dosage spectrométrique de la capacité d'attachement à une surface plastique

La capacité d'attachement à une surface plastique a été évaluée en mettant en culture liquide sans agitation une solution bactérienne ajustée à 0,3 McF diluée au 1/20<sup>ème</sup> pendant 24h à 30°C (Vasseur *et al.*, 2007). Les cultures non fixées au plastique sont éliminées et les puits rincés à l'aide d'eau distillée. Les bactéries fixées sont ensuite colorées à l'aide de cristal violet 1% (p/v) et ce colorant est solubilisé par de l'éthanol absolu afin d'évaluer la DO à 600nm. Les mesures ont été effectuées en triple.

### 1.6 SELECTION DE MUTANTS RESISTANTS A LA CIPROFLOXACINE

La souche PA14 a été cultivée en bouillon MH pendant 18 heures à 37 °C. Une sous-culture diluée au 1/10<sup>ème</sup> a été réalisée en présence de différentes concentrations de ciprofloxacine : 0,03 µg/mL (1/4 de la CMI), 0,06 µg/mL (1/2 de la CMI) et 0,12 µg/mL (CMI). Un témoin sans ciprofloxacine a été effectué en parallèle. Pendant 4 jours, des sous-cultures ont été réalisées afin de maintenir la pression de sélection exercée par la ciprofloxacine. Chaque jour, la sensibilité de chaque culture a été déterminée à l'aide d'un antibiogramme par diffusion. Les mutants apparaissant dans la zone d'inhibition autour du disque pré-imprégné de ciprofloxacine ont été repiqués sur un milieu MH solide sans antibiotique afin de s'assurer de la stabilité du phénotype. Des antibiogrammes ont à nouveau été réalisés sur ces clones et seuls ceux présentant des profils de résistance différents ont été conservés. La surexpression de la pompe MexEF-OprN a été confirmée par RTqPCR en mesurant la quantité relative de transcrits du gène *mexF* par rapport à la souche initiale.

## 2 TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

### 2.1 EXTRACTION D'ACIDES NUCLÉIQUES

#### 2.1.1 Extraction d'ADN génomique

L'extraction d'ADN génomique bactérien a été réalisée à l'aide du kit *QIAamp DNA mini kit* (Qiagen, Courtaboeuf, France). Cette méthode consiste à lyser les bactéries puis à purifier l'ADN par chromatographie échangeuse d'anions.

#### 2.1.2 Extraction d'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique destiné au clonage ou au séquençage de gènes a été extrait et purifié au moyen du kit *Wizard® plus SV Minipreps DNA purification system* (Promega, Charbonnière-les-bains, France). Brièvement, après une étape de lyse alcaline des bactéries, l'ADN est purifié par chromatographie d'échange d'anions. La quantité d'ADN a été dosée par spectrométrie UV à 260 nm.

### 2.2 AMPLIFICATION D'ADN PAR PCR

L'ADN a été amplifié dans un thermocycleur *Biometra T3* (Biolabo Scientific Instrument, Lausanne, Suisse) en présence de *RedTaq DNA polymerase®* (Bioline, Londres, Royaume-Uni) en respectant les conditions spécifiées par le fournisseur. Les amorces (*Tableau 16*) ont été choisies à l'aide du logiciel *Primer 3 input 0.4.0* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Le mélange réactionnel (50µL) contenait 0,5 unités de *RedTaq DNA polymerase®* (Bioline), 200 µM de chaque dNTP, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5µL de tampon PCR 10X, 0,5 µM de chaque amorce et environ 50 ng d'ADN. Les conditions d'amplification ont été les suivantes : 1 cycle de dénaturation de 5 min à 94°C, suivi de 30 cycles d'amplification composés chacun de 30 sec à 94°C, 30 sec à

la température optimale pour l'hybridation de chaque couple d'amorces, 60 sec/kb du produit à amplifier à 72°C et un cycle final d'élongation de 7 min à 72°C.

**Tableau 16 : Liste des amorces utilisées pour les réactions de séquençage, RT-qPCR, inactivation génique et complémentation.**

Oligonucléotide	Séquence (5' → 3')*	Référence
<i>Séquençage</i>		
Seq-oprD-C1	AGA-CAT-GCC-GTG-GAT-ACA-AA	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
Seq-oprD-C2	TAG-GTG-GTG-AGG-AAG-CCT-TG	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
Seq-oprD-C3	CCA-AGA-AAC-ACT-GAG-TGC-TA	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
Seq-oprD-C4	CGA-TGA-GGT-TAT-CGG-TGA-TT	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
Seq-oprD-C5	AAC-CTG-CCG-GTG-ATG-AAC	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
Seq-oprD-C6	CAG-AGT-TGG-CGA-GGA-AAA-TC	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
Seq-oprD-C7	CAT-CTA-CCG-CAC-AAA-CGA-TG	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
Seq-oprD-C8	TGA-ACA-TCA-ACT-TCC-TCA-GCA	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
Seq-mexS-Ch1	GAA-CAC-GAT-CAG-CAG-GTT-CA	Cette étude
Seq-mexS-Ch2	CCA-CCG-GGG-TGA-GTA-CCT	Cette étude
Seq-mexS-Ch3	GTC-TCG-GCT-TCG-AAC-TGG	Cette étude
Seq-mexS-Ch4	GGT-GAA-ATC-CAT-CAG-GCA-GT	Cette étude
Seq-mexS-Ch5	GCA-AGC-TGG-TGC-TGT-ATG-G	Cette étude
Seq-mexS-Ch6	GAA-GGC-GAC-TTC-GTC-TGG	Cette étude
Seq-mexS-Ch8	TCG-AAC-TGT-CCC-TTT-GCT-CT	Cette étude
MexT-1	GTA-GTA-GAC-GCT-GGC-CTC-CAC	(Llanes <i>et al.</i> , 2011)
MexT-2	GTG-AAT-TCG-TCC-CAC-TCG-TTC	(Llanes <i>et al.</i> , 2011)
SegmexT1	TGA-TGA-AAA-CGG-ATC-ACT-CG	(Llanes <i>et al.</i> , 2011)
SegmexT2	GGG-AAC-TAA-TCG-AAC-GAC-GA	(Llanes <i>et al.</i> , 2011)
Seq-mexT-mexE	AAG-CGC-AAG-GTG-GTC-CTG	Cette étude
mvaT-1	CGC-GGT-TTA-CTT-ACA-GTT-TCG	(Llanes <i>et al.</i> , 2011)
mvaT-2	AAC-GCT-ATT-CGC-TGG-AGA-CT	(Llanes <i>et al.</i> , 2011)
Seq-ParR-C1	GCA-TAT-AAT-GCC-AGC-CGA-TT	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
Seq-ParR-C2	GGT-CGA-CCA-CGA-AGA-TCG	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
Seq-ParS-C1	GCC-AGG-CAG-GGG-AAA-TAC-T	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
Seq-ParS-C2	CAT-ACC-AGC-AGG-GCG-GAT-G	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
Seq-ParS-C3	AAG-AAC-CTG-CTG-GTG-GTA-CG	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
Seq-ParS-C4	ATG-CGG-ATC-TGT-TCG-ACC-T	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
Seq-ParS-C5	CGA-ACT-GGA-GGA-AAT-GGT-CT	(Muller <i>et al.</i> , 2011)

<b>Seq-ParS-C6</b>	GAA-AGA-TGC-ATT-GCA-CGA-AA	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
<i>RT-qPCR</i>		
<b>rpsL3</b>	GCA-ACT-ATC-AAC-CAG-CTG-GTG	(Dumas <i>et al.</i> , 2006)
<b>rpsL5</b>	GCT-GTG-CTC-TTG-CAG-GTT-GTG	(Dumas <i>et al.</i> , 2006)
<b>RT-oprD-Ch1</b>	ACC-AAC-CTC-GAA-GCC-AAG-TA	Cette étude
<b>RT-oprD-Ch2</b>	ACA-GGA-TCG-ACA-GCG-GAT-AG	Cette étude
<b>mexE-3</b>	CCA-GGA-CCA-GCA-CGA-ACT-TCT-TGC	(Dumas <i>et al.</i> , 2006)
<b>mexE-4</b>	CGA-CAA-CGC-CAA-GGG-CGA-GTT-CAC-C	(Dumas <i>et al.</i> , 2006)
<b>mexY1A</b>	TTA-CCT-CCT-CCA-GCG-GC	(Jeannot <i>et al.</i> , 2005)
<b>mexY1B</b>	GTG-AGG-CGG-GCG-TTG-TG	(Jeannot <i>et al.</i> , 2005)
<b>MexB1</b>	ATG-ACC-ATC-ACC-GTG-ACC-TT	(Vettoretti <i>et al.</i> , 2009)
<b>MexB2</b>	AGA-GTG-GGT-CCT-GGA-TGT-TG	(Vettoretti <i>et al.</i> , 2009)
<b>MexSP1</b>	CAA-GGG-CGT-CAA-TGT-CAT-CC	Cette étude
<b>MexSP2</b>	GAC-CGG-TGA-AAT-CCA-TCA-GG	Cette étude
<b>MexT1</b>	ATC-TGA-ACC-TGC-TGA-TCG-TG	Cette étude
<b>MexT2</b>	GTC-CGG-TAC-GGA-CGA-ACA	Cette étude
<b>RT-czcC-1</b>	GGT-CAG-CAT-CGG-CAG-CAA-GTA-CG	Cette étude
<b>RT-czcC-2</b>	GGT-CGT-AGG-CCT-GTA-CCG-CTT-CG	Cette étude
<b>czcR1</b>	GTC-ATC-ACC-CGG-ACG-CAG-ATC-AT	Cette étude
<b>czcR2</b>	GTA-GCC-GAC-GCC-GCG-AAT-GGT-AT	Cette étude
<b>RT-PA1797-C1</b>	GGA-CCC-TTT-GCA-GAT-GAC-TC	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
<b>RT-PA1797-C2</b>	CGG-AGT-GTT-TCC-TGA-GAA-GC	(Muller <i>et al.</i> , 2011)
<b>copR-L</b>	ACC-TCG-AAC-TCG-ATT-TGC-TG	Cette étude
<b>copR-R</b>	TCG-CTG-TCG-AAG-TTC-ATG-TC	Cette étude
<i>Complémentation chromosomique</i>		
<b>Int-oprD-Ch1</b>	CGG- <u>AAG-CTT</u> -AGC-CAT-TTT-CCA-ATT-TGT-GC ( <i>Bam</i> HI)	Cette étude
<b>Int-oprD-Ch2</b>	GCC- <u>GGA-TCC</u> -GGG-GTG-TTT-TCG-CAG-AGT-AA ( <i>Hind</i> III)	Cette étude
<b>Int-mexS-P1</b>	CGG- <u>GGA-TCC</u> -GGG-GCA-TAG-GAT-CAC-TGA-CA ( <i>Bam</i> HI)	Cette étude
<b>Int-mexS-P2</b>	GCC- <u>AAG-CTT</u> -GGT-CAA-CGA-TCT-GTG-GAT-CTG ( <i>Hind</i> III)	Cette étude
<b>Int-mexT-P1</b>	CGG- <u>GGA-TCC</u> -CAT-CAC-GGG-GTG-AAT-AAC-CT ( <i>Bam</i> HI)	Cette étude
<b>Int-mexT-P2</b>	GCC- <u>AAG-CTT</u> -CGA-TCG-ATT-TTC-CCG-TTG ( <i>Hind</i> III)	Cette étude

<i>Inactivation génique</i>		
PCRioprD1	CAA-TTT-GTG-CAC-GGA-GTT-TG	Cette étude
PCRioprD2	CAG-GTC-GTG-TCT-TCG-ATG-AAC-CCC-TTC	Cette étude
PCRioprD3	GAA-GAC-ACG-ACC-TGA-ACC-TAG-CCT-CCT	Cette étude
PCRioprD4	GGG-GTG-TTT-TCG-CAG-AGT-AA	Cette étude
Inac-mexS-Ch1	GAC-AGG-TGG-GCG-AAG-ATT-T	Cette étude
Inac-mexS-Ch2	ATC-CAT-CCA-TCA-CGG-GGT-GAA-TAA-CCT	Cette étude
Inac-mexS-Ch3	CGT-GAT-GGA-TGG-ATT-TCA-CCG-GTC-ATC	Cette étude
Inac-mexS-Ch4	CGG-CGA-GAT-GTA-TGT-GGT-G	Cette étude
Inac-mexT-Ch1	AGC-ACA-TCC-TTC-CAG-CTC-AC	Cette étude
Inac-mexT-Ch2	ATA-AGC-CGA-ACA-CGA-TCA-GCA-GGT-TCA	Cette étude
Inac-mexT-Ch3	CGT-GTT-CGG-CTT-ATT-CCA-TCG-AAA-GCA	Cette étude
Inac-mexT-Ch4	GTC-GAT-CTG-GAA-CAG-CAG-GT	Cette étude

\*Les sites de restriction utilisés pour la complémentation chromosomique sont soulignés. Les séquences complémentaires nécessaires à la PCR chevauchante pour l'inactivation génique sont indiquées de couleurs.

### 2.2.1 Hydrolyse de l'ADN par les endonucléases de restriction

La digestion enzymatique des ADN plasmidiques ou des amplicons obtenus par PCR a été effectuée à partir d'1 µg d'ADN pendant 2h à 37°C, selon les recommandations du fournisseur (Promega).

### 2.2.2 Electrophorèse en gel d'agarose

Les fragments d'ADN obtenus après amplification par PCR ou digestion enzymatique ont été séparés en fonction de leur taille par électrophorèse horizontale en gel d'agarose 0,8% (p/v). La migration s'est effectuée dans un tampon TAE 1X (40 mM Tris Acétate, 1 mM EDTA, pH8) pendant une heure sous une tension de 100V. Après immersion du gel pendant 15 min dans une solution de bromure d'éthidium (0,5 µg/mL), l'ADN a été visualisé à l'aide du système *UV Chemidoc XRS* muni du logiciel *QuantityOne*<sup>®</sup> (Biorad).

## 2.1 TECHNIQUES DE CLONAGE

### 2.1.1 Purification des fragments d'ADN

Les amplifiats ont été extraits du gel d'agarose et purifiés sur des colonnes de silice à l'aide du kit *Wizard® SV gel ans PCR clean up system* (Promega). L'ADN a ensuite été élué avec 30 µL d'eau dépourvue de DNase et de RNase puis dosé au spectrophotomètre à 260 nm.

### 2.1.2 Ligature des fragments d'ADN

Les fragments d'ADN ont été ligaturés par l'ADN ligase du bactériophage T4 (Promega) qui catalyse la formation de liaisons phospho-diester entre les groupements 5'-phosphate et 3'-hydroxyle de molécules d'ADN bicaténaire ayant des extrémités franches ou cohésives. Les ligatures ont été réalisées en utilisant 100 ng de vecteur dans un volume final de 20 µL avec un rapport insert/vecteur de 3/1, 1/1 ou 1/3 selon le fragment d'ADN à cloner. La quantité d'insert nécessaire à la réaction a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Quantité d'insert (ng)} = \frac{\text{Taille de l'insert (kb)} \times \text{quantité de vecteur (ng)}}{\text{Taille du vecteur (kb)}}$$

## 2.2 TRANSFORMATION BACTÉRIENNE

### 2.2.1 Transformation par choc thermique de cellules de *E. coli* rendues compétentes par le chlorure de rubidium

Cette technique décrite en 1983 (Hanahan, 1983) permet d'obtenir 10<sup>7</sup> transformants par µg d'ADN. Brièvement, un culot bactérien obtenu après centrifugation à 4000 g pendant 10 min à 4°C, d'une suspension bactérienne en phase exponentielle de croissance (absorbance comprise entre 0,4 et 0,6 à 600 nm), a été remis en suspension dans 2/5<sup>ème</sup> de volume de TFB1 (30 mM acétate de potassium, 100mM RbCl<sub>2</sub>, 10 mM

CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 15% glycérol (v/v), pH 5,8) et incubé 5 min à 4°C. Les cellules ont ensuite été collectées par centrifugation à 4000 g pendant 5 min à 4°C. Après 1h d'incubation à 4°C dans 1/25<sup>ème</sup> de volume de tampon TFB2 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl<sub>2</sub>, 15% glycérol (v/v), pH 6,5), la suspension bactérienne a été répartie en aliquotes de 100 µL et conservée à -80°C.

Pour la transformation, 100 µL de bactéries compétentes ont été mises en contact avec le plasmide à transférer pendant 30 min dans la glace. Après un choc thermique de 1 min à 42°C suivi de 10 min dans la glace, les bactéries ont été mises en culture 1h à 37°C sous agitation (225 rpm) dans 900 µL de milieu MHB puis étalées sur milieu sélectif renfermant l'antibiotique approprié.

### 2.2.2 Conjugaison bactérienne

Cinquante µL d'une culture de la nuit de la souche *E. coli* « helper » HB101 contenant le plasmide pRK2013 ont été mis en contact avec 50 µL de la souche de *E. coli* donneuse (CC118 contenant le plasmide mini-CTX recombinant ou CC118 $\Delta$ *pir* contenant le plasmide pKNG101 recombinant) à la surface d'une gélose MHA. Deux heures plus tard, 50 µL d'une culture de la souche receveuse (*P. aeruginosa*) préalablement incubée à 42°C ont été ajoutés au dépôt initial. Après 4 à 24h de conjugaison, le spot obtenu a été mis en culture dans 1 mL de bouillon MHB et placé 1h 30 min sous agitation à 37°C. Les transconjugants ont été sélectionnés sur milieu contenant l'antibiotique approprié.

## 2.3 COMPLÉMENTATION CHROMOSOMIQUE

Les gènes *oprD*, *mexS* et *mexT* mutés, issus des souches cliniques, ont été introduits dans le plasmide mini-CTX1 à l'aide des amorces référencées dans le *Tableau 16* puis les plasmides recombinants ont été introduits par choc thermique dans les cellules de

*E. coli* CC118. Le plasmide recombinant a ensuite été transféré de *E. coli* aux souches de *P. aeruginosa*  $\Delta oprD$   $\Delta mexS$  ou  $\Delta mexT$  selon les cas par conjugaison bactérienne.

## 2.4 SÉQUENÇAGE DE L'ADN

### 2.4.1 Séquençage Sanger

Le séquençage de l'ADN est effectué par la plate-forme « Séquençage-Analyse de fragments » de la SFR-FED 4234 par la méthode des didéoxyribonucléotides de Sanger, à l'aide du séquenceur automatique Applied Biosystems 3130 (Life technologies, Californie, USA).

### 2.4.2 Séquençage à haut débit, technologie PGM Ion Torrent

Les génomes bactériens ont été séquencés par la plate-forme « Séquençage-Analyse de fragments » de la SFR-FED 4234.

#### **1. Extraction de l'ADN génomique**

L'ADN génomique bactérien a été extrait à l'aide du kit *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant.

#### **2. Préparation d'une librairie d'ADN**

Le but de cette manipulation est de construire une librairie de fragments d'ADN génomique bactérien d'environ 200 pb de long. Brièvement, l'ADN est fragmenté par digestion enzymatique puis des adaptateurs sont insérés à chaque extrémité de ces fragments par ligature. Un de ces adaptateurs est complémentaire aux amorces fixées sur les sphères de séquençage, l'autre contient de la biotine, dont l'affinité est forte pour la streptavidine présente sur les billes magnétiques nécessaires à la purification des sphères de séquençage. Une fois purifiés, ces fragments sont soumis à électrophorèse en gel d'agarose et les fragments d'intérêt sont purifiés. Une étape de

8 cycles de PCR permet d'amplifier cette librairie et les fragments ayant intégré un adaptateur différent à chaque extrémité sont conservés (*Figure 42*).

### ***3. Amplification clonale sur sphères par PCR en émulsion***

Afin d'amplifier la librairie de façon clonale, une PCR en émulsion est réalisée. Brièvement, chaque fragment de la librairie d'ADN est emprisonné sous haute pression avec une sphère de séquençage, dans une gouttelette d'huile. Ces sphères sont couplées à une amorce complémentaire d'un des deux adaptateurs présent aux extrémités des fragments d'intérêt, permettant de l'amplifier de façon clonale. Pour purifier les sphères ayant hybridé un fragment d'ADN, des billes magnétiques couplées à la streptavidine sont utilisées et un système d'aimant permet de ne récupérer que les billes enrichies en ADN (*Figure 43*).

### ***4. Séquençage***

Les sphères précédemment purifiées sont distribuées sur une puce à ADN, à raison de une par puits. Des flux successifs des différents nucléotides sont injectés dans la puce puis rincés. S'ils sont complémentaires de la séquence d'ADN du fragment d'intérêt, ces nucléotides s'intègrent en libérant un proton, ce qui modifie le pH du milieu réactionnel. C'est cette modification de pH qui est détectée par le séquenceur (*Figure 44*). L'ordinateur peut alors intégrer ce nucléotide à la suite de la séquence en cours de synthèse, complémentaire à notre fragment.

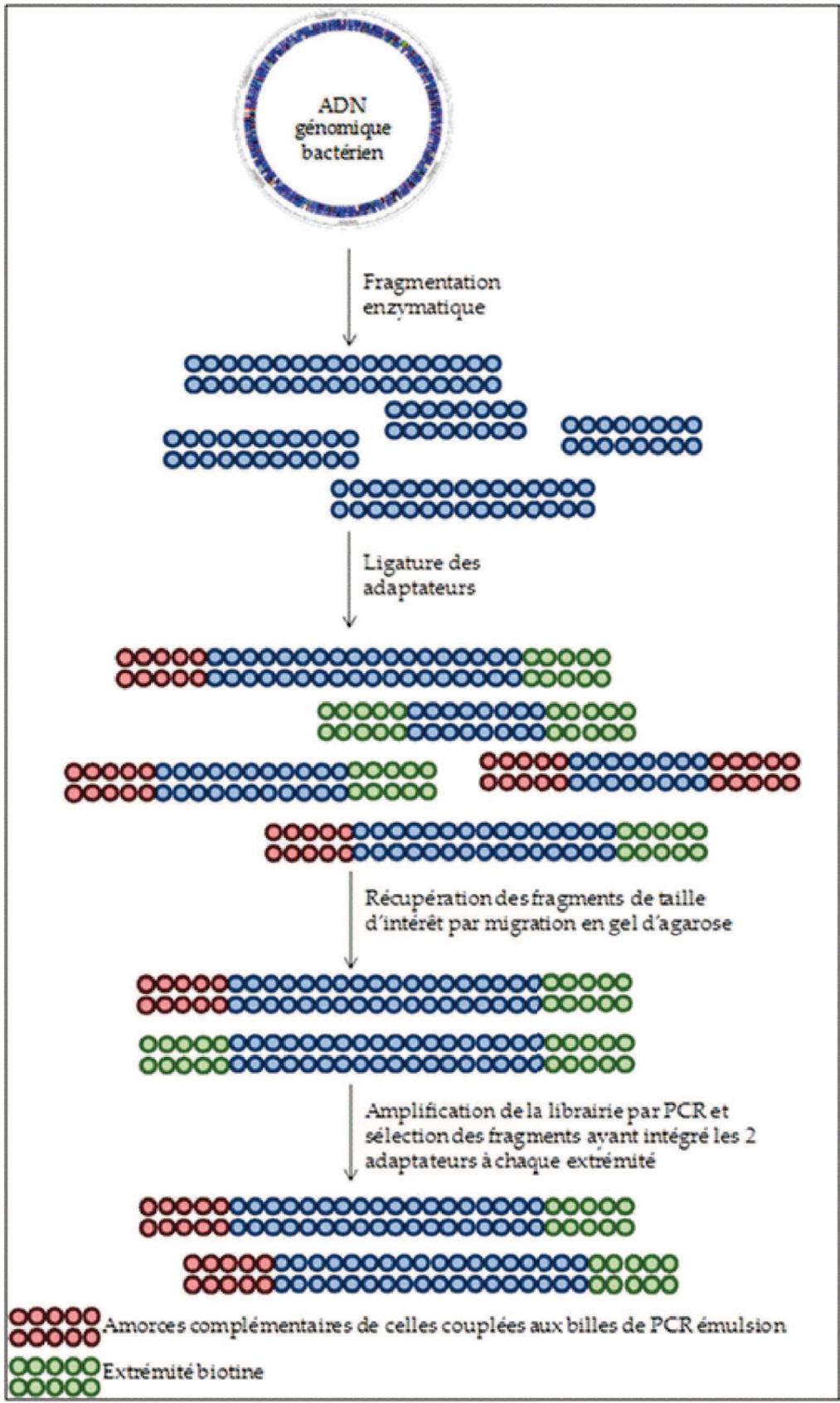


Figure 42 : Préparation de la banque d'ADN génomique.

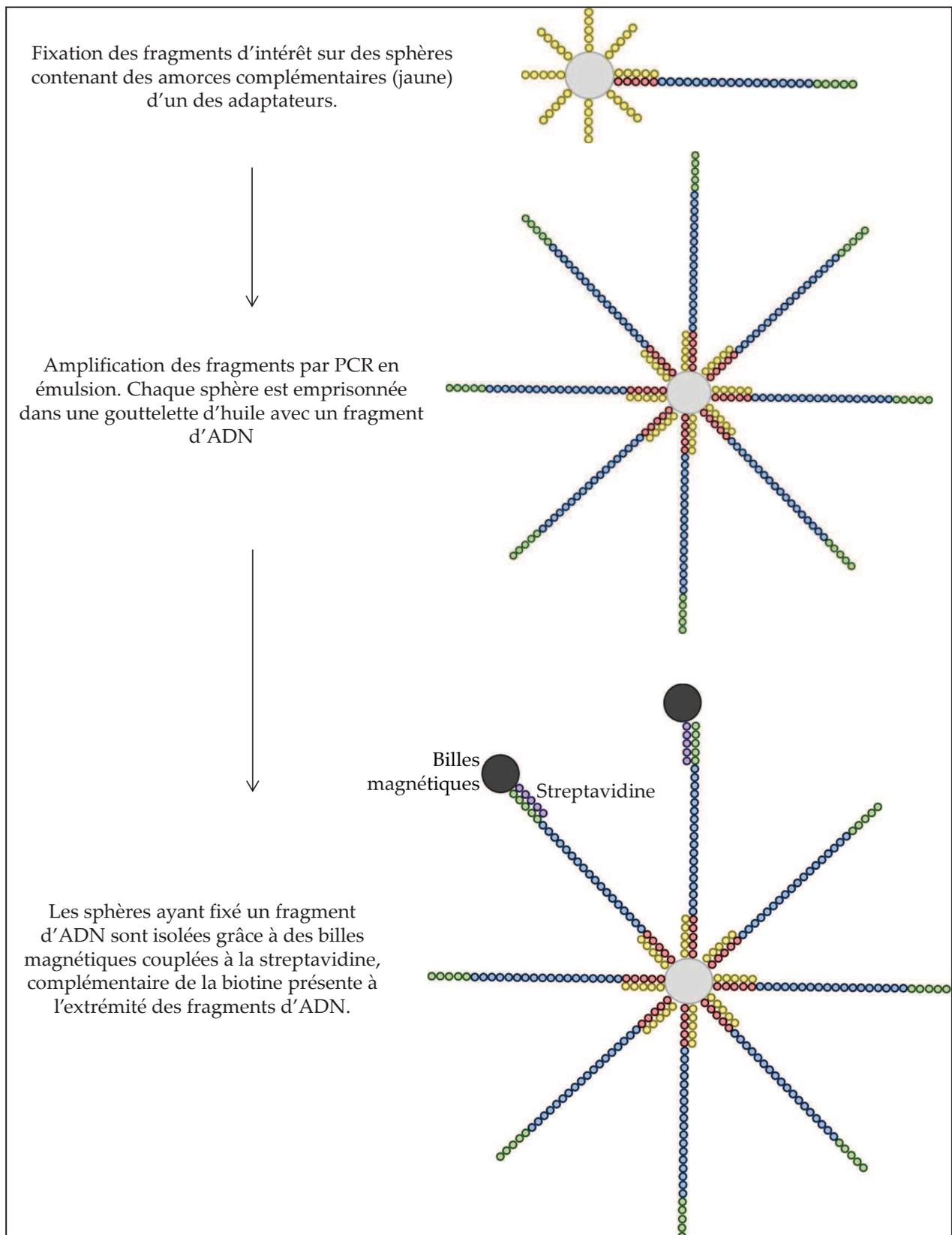


Figure 43 : Amplification clonale sur billes par PCR en émulsion

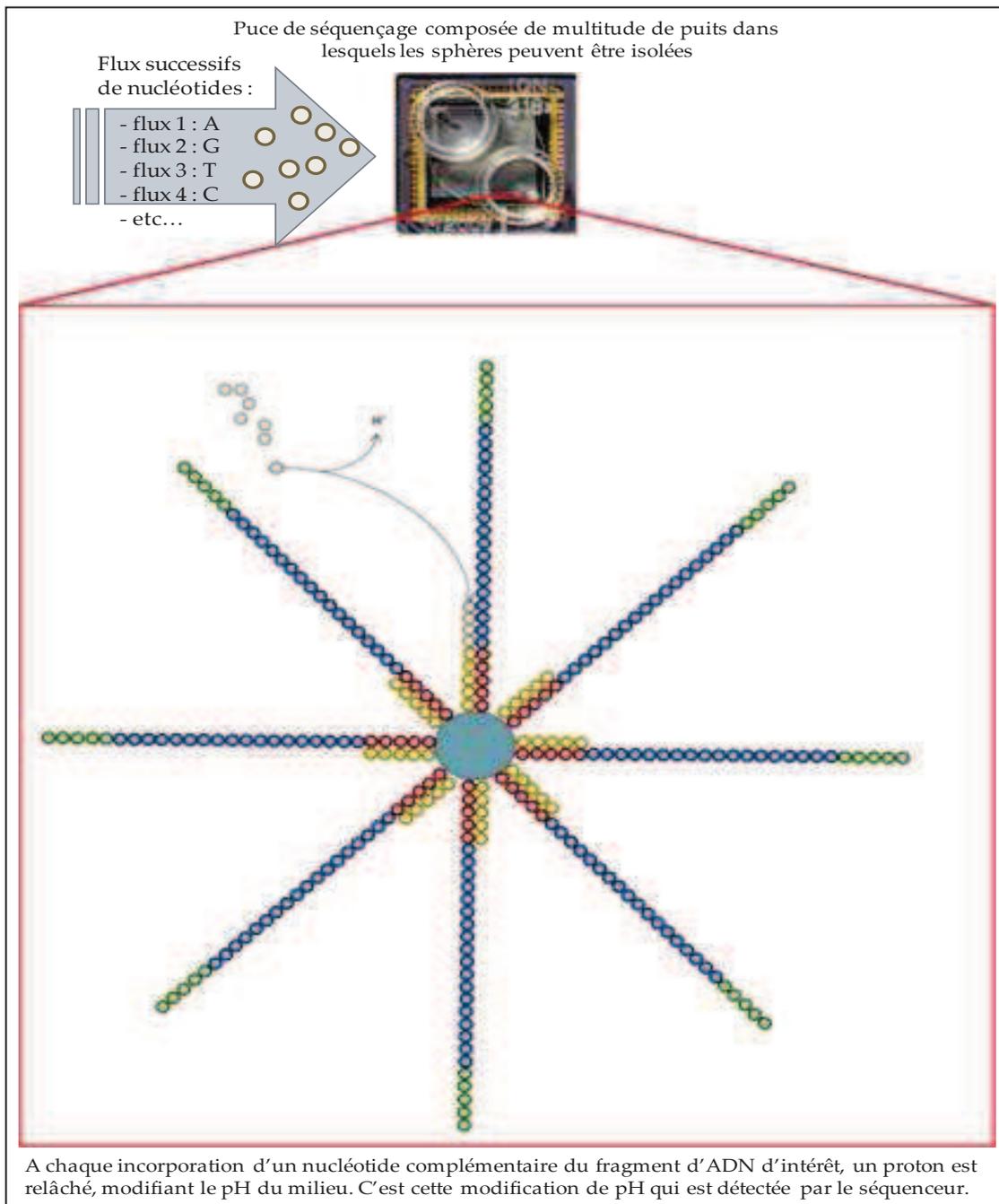


Figure 44 : Technique de séquençage selon la technologie PGM Ion Torrent.

## 5. Analyse des données

L'analyse des données a été réalisée par le Dr Katy Jeannot (EA4266) à l'aide du logiciel *Bionumerics* version 7.5.

## **6. Délétion génique par PCR chevauchante et recombinaison homologue**

Les gènes *oprD*, *mexS* et *mexT* ont été retirés du génome des souches de référence PAO1 ou PA14 par PCR chevauchante, suivie d'un événement de recombinaison homologue. Deux fragments d'environ 500 pb ont été amplifiés séparément par PCR en amont et en aval du gène à inactiver grâce aux amorces répertoriées dans le *Tableau 16*. Chaque fragment possède à son extrémité la plus proche du gène cible une séquence de 7 pb complémentaire à celle de l'autre fragment. Une étape de PCR dite chevauchante, utilisant comme matrice d'ADN la même quantité de chacun des amplicons de la PCR précédente permet de créer un fragment contenant les régions bordant les gènes cibles. Ce fragment a été inséré dans le plasmide pCR-Blunt (*Tableau 15*) puis dans le vecteur pKNG101. Ce vecteur est transféré chez *E. coli* par choc thermique, puis chez *P. aeruginosa* par conjugaison bactérienne. Son origine de répllication *oriR6K* lui permet de se répliquer chez *E. coli* mais pas chez *P. aeruginosa*, dans lequel il se comporte comme un vecteur suicide en s'intégrant dans le chromosome. Le vecteur est ensuite excisé du chromosome en cultivant la souche PAO1 ou PA14 sur milieu minimum M9 additionné respectivement de 5 % de sucrose (PAO1) et 5% de sucrose + 5% de saccharose (PA14). En effet, le vecteur pKNG101 possède le gène *sacB* codant pour une lévane saccharase qui hydrolyse le sucrose en un composé toxique pour la bactérie. L'excision donne lieu à deux événements génétiques différents, soit l'excision totale du plasmide conduisant à un phénotype sauvage, soit l'inactivation du gène d'intérêt. La délétion du gène d'intérêt est vérifiée par séquençage classique.

## 2.5 QUANTIFICATION DES ARNm PAR PCR EN TEMPS REEL

### 2.5.1 Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADNc

Une culture de la nuit en milieu MH liquide est diluée au 1/100 puis incubée sous agitation (250 rpm) à 37°C jusqu'à une absorbance de 3,3 McF. Cinq cent µL de cette culture sont mis en présence de 1 mL de *RNA protect bacteria solution* (Qiagen) et centrifugés à 10000 g pendant 5 min. Le culot bactérien est solubilisé et lysé dans 100 µL de lysosyme. Les ARN totaux sont alors extraits à l'aide du kit *Qiagen Rneasy® Plus mini kit* (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur puis dosés par spectrométrie UV à 260 nm. La synthèse d'ADNc est réalisée à partir de 2 µg d'ARN totaux à l'aide des réactifs de transcription inverse selon les recommandations du fournisseur (*ImProm-II™ reaction buffer*, *ImProm-II™ reverse transcriptase*, MgCl<sub>2</sub>, Promega) et d'hexamères aléatoires utilisés comme amorces (*random primers*, Promega). Après une incubation de 50 min à 42°C, l'enzyme est inactivée à 70 °C pendant 15 min. Un contrôle sans transcription inverse est également réalisé sur chaque extrait, permettant ainsi de vérifier l'absence de contamination par de l'ADN génomique.

### 2.5.2 Amplification des ADNc

Les réactions d'amplification et de quantification de l'expression génique sont réalisées dans l'appareil Rotor-Gene RG3000 (Corbett Research). La réaction d'amplification en temps réel est effectuée avec 2 µL d'ADNc, 5 µL de SYBR green master mix (*SYBRFast PCR kit*, Qiagen) et 0,6 µM de chaque amorce (*Tableau 16*). Le volume total du mélange réactionnel est ajusté à 15 µL avec de l'eau dépourvue d'ARNase (Qiagen). Les conditions d'amplification sont les suivantes : 15 min à 95°C suivies de 40 cycles à 95°C, 20 sec (dénaturation) ; 60°C, 20 sec (hybridation) ; et 72°C, 30 sec (élongation). L'acquisition des informations s'effectue à chaque cycle au cours

de la phase d'hybridation. Par ailleurs, chaque série comporte un témoin sans transcription inverse, un contrôle négatif (eau) et une gamme de dilution (1/10, 1/100 et 1/1000) des ADNc de la souche de référence PAO1 ou PA14. Celle-ci permet de tracer une droite standard à partir de laquelle l'expression des gènes peut être quantifiée. Après la réaction d'amplification, une courbe de fusion est établie afin de vérifier la spécificité des produits amplifiés, la formation d'éventuels dimères d'amorces et/ou de contaminations.

### 2.5.3 Quantification relative des transcrits des gènes

L'expression des gènes chez les souches étudiées est calculée selon la méthode décrite par Pfaffl *et al.* (Pfaffl *et al.*, 2002). Les niveaux d'expression chez les souches étudiées sont estimés par comparaison avec un standard interne, le gène de référence *rpsL* codant une protéine ribosomale dont l'expression est supposée constante pendant la phase exponentielle de croissance. Cette méthode de quantification tient compte de l'efficacité (E) des réactions d'amplification du gène étudié ( $E_{\text{gène d'intérêt}}$ ) et du gène de référence *rpsL* ( $E_{\text{rpsL}}$ ), ainsi que des valeurs de CT (*cycle threshold*) obtenues pour la souche étudiée et pour la souche de référence PAO1 ou PA14. La constante CT correspond à un seuil défini comme le premier cycle où une augmentation significative de l'intensité de fluorescence correspondant à la quantité de produit amplifié est observée. La quantification de l'expression génique est calculée grâce à la formule suivante :

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{gène d'intérêt}})^{\Delta \text{CT gène d'intérêt (PAO1-échantillon)}}}{(E_{\text{rpsL}})^{\Delta \text{CT rpsL (PAO1-échantillon)}}} \quad \text{où } E \text{ (efficacité)} = 10^{(-1/\text{pente})}$$

La pente est obtenue grâce à la droite standard construite à partir de PAO1 ou PA14 pour les valeurs de dilution au 1/10, 1/100 et 1/1000. Les résultats, obtenus en

duplicat pour les souches étudiées, sont comparés à ceux de la souche de référence PAO1 ou PA14 dont la valeur est arbitrairement fixée à 1.

### **3 WESTERN BOTTING DE LA PROTEINE OPRD**

#### **3.1 EXTRACTION DES PROTEINES DE MEMBRANE EXTERNE**

Une culture bactérienne de la nuit est diluée au 1/100 et incubée sous agitation à 37°C jusqu'à  $DO_{600nm}=1$ . Les cultures sont ensuite centrifugées pendant 20 min à 4°C à 5000 g. Le culot est lavé dans du tampon Hepes (10 mM ; pH 7,2) puis centrifugé à 4°C pendant 30 min à 5000 g. Le culot est remis en suspension dans du tampon Hepes et passé à la presse de French 2 fois à 14000 psi. Les culots sont compactés par des billes de verre et centrifugés à 5000 g pendant 30 min à 4°C. Le surnageant est récupéré et centrifugé à 35000 g pendant 1h à 4°C. Le culot est repris avec du tampon MOPS (30mM + 200 mM NaCl pH 8,0) dilué au ½. Cette suspension est centrifugée 1h à 35000 rpm à 4°C. Le culot est repris dans ce même tampon et de nouveau centrifugé selon les mêmes conditions. Le culot est solubilisé dans le tampon MOPS. Après le dosage des protéines, du Sarkosyl 2% (p/v) est ajouté afin de solubiliser les protéines de membrane interne. Les tubes sont centrifugés 20 min à 20000 g à 10°C et les surnageants éliminés. La quantité de protéines de membrane externe est dosée puis diluée de manière à obtenir une concentration finale de 20 µg/µL.

#### **3.2 DOSAGE DES PROTÉINES**

Les protéines sont dosées selon la méthode BCA Pierce à l'acide bicinchoninique (Invitrogen). Brièvement, une gamme étalon de BSA (Invitrogen) est réalisée dans le réactif proposé. Les échantillons sont dilués au 1/50 et au 1/100, et 50 µL de chaque sont ajoutés à 1mL de réactif. Les tubes sont incubés 30 min à 60°C puis la DO est lue à 562 nm.

### 3.3 ELECTROPHORESE EN GEL DE POLY-ACRYLAMIDE

Les protéines sont dénaturées par chauffage à 100 °C durant 3 min après l'addition d'un volume de tampon échantillon (250 mM TrisHCl pH 6,8 ; 40 % glycérol (v/v) ; 8 % SDS (v/v) ; 20 %  $\beta$ -mercaptoéthanol (v/v) ; 0,08 % bleu de bromophénol (p/v)). Les protéines sont séparées en fonction de leur masse dans un gel dénaturant (SDS-PAGE) renfermant 5 puis 15 % (p/v) d'acrylamide/bis-acrylamide (99/1) pendant 2h à 180V, selon la méthode de Laemmli (Laemmli, 1970). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est ensuite saturée par 3 % (p/v) de gélatine avant d'être mise en contact pendant 1h sous agitation avec l'anticorps polyclonal anti-OprD (don de T. Köhler, Université de Genève, Suisse) dilué au 1/10000<sup>ème</sup> en tampon TBS renfermant 3 % (p/v) de gélatine. Après 3 lavages successifs, la présence de la protéine OprD est révélée par hybridation à l'aide d'un anticorps anti-lapin dilué au 1/20000<sup>ème</sup>, couplé à la phosphatase alcaline dont le substrat, le NBT/BCIP (Promega), donne un composé coloré. En parallèle, un autre gel de polyacrylamide réalisé dans les mêmes conditions est coloré au bleu de Coomassie pour contrôler l'uniformité des quantités de protéines dans les différents puits.

## *F. Références bibliographiques*

---

- Akama, H., Kanemaki, M., Yoshimura, M., Tsukihara, T., Kashiwagi, T., Yoneyama, H., Narita, S., Nakagawa, A. & Nakae, T. (2004a).** Crystal structure of the drug discharge outer membrane protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa*: dual modes of membrane anchoring and occluded cavity end. *J Biol Chem* **279**, 52816-52819.
- Akama, H., Matsuura, T., Kashiwagi, S., Yoneyama, H., Narita, S., Tsukihara, T., Nakagawa, A. & Nakae, T. (2004b).** Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **279**, 25939-25942.
- Alvarez-Ortega, C., Wiegand, I., Olivares, J., Hancock, R. E. & Martínez, J. L. (2010).** Genetic determinants involved in the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 4159-4167.
- Ambler, R. P. (1980).** The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **289**, 321-331.
- Anderson, D. J., Miller, B., Marfatia, R. & Drew, R. (2012).** Ability of an antibiogram to predict *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to targeted antimicrobials based on hospital day of isolation. *Infect Control Hosp Epidemiol* **33**, 589-593.
- Aubert, G., Pozzetto, B. & Dorche, G. (1992).** Emergence of quinolone-imipenem cross-resistance in *Pseudomonas aeruginosa* after fluoroquinolone therapy. *J Antimicrob Chemother* **29**, 307-312.
- Balasubramanian, D., Schneper, L., Merighi, M., Smith, R., Narasimhan, G., Lory, S. & Mathee, K. (2012).** The regulatory repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC  $\beta$ -lactamase regulator AmpR includes virulence genes. *PLoS One* **7**, e34067.
- Balcewich, M. D., Reeve, T. M., Orlikow, E. A., Donald, L. J., Vocadlo, D. J. & Mark, B. L. (2010).** Crystal structure of the AmpR effector binding domain provides insight into the molecular regulation of inducible ampC beta-lactamase. *J Mol Biol* **400**, 998-1010.
- Bellido, F., Veuthey, C., Blaser, J., Bauernfeind, A. & Pechère, J. C. (1990).** Novel resistance to imipenem associated with an altered PBP-4 in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother* **25**, 57-68.
- Biswas, S., Mohammad, M. M., Patel, D. R., Movileanu, L. & van den Berg, B. (2007).** Structural insight into OprD substrate specificity. *Nat Struct Mol Biol* **14**, 1108-1109.
- Blumer, C. & Haas, D. (2000).** Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. *Arch Microbiol* **173**, 170-177.
- Bradley, J. S., Garau, J., Lode, H., Rolston, K. V., Wilson, S. E. & Quinn, J. P. (1999).** Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. *Int J Antimicrob Agents* **11**, 93-100.
- Brencic, A. & Lory, S. (2009).** Determination of the regulon and identification of novel mRNA targets of *Pseudomonas aeruginosa* RsmA. *Mol Microbiol* **72**, 612-632.
- Brown, A. G., Butterworth, D., Cole, M., Hanscomb, G., Hood, J. D., Reading, C. & Rolinson, G. N. (1976).** Naturally-occurring beta-lactamase inhibitors with antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo)* **29**, 668-669.

**Burrowes, E., Baysse, C., Adams, C. & O'Gara, F. (2006).** Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology* **152**, 405-418.

**CA-SFM (2010).** Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

**Cabrol, S., Olliver, A., Pier, G. B., Andremont, A. & Ruimy, R. (2003).** Transcription of quorum-sensing system genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **185**, 7222-7230.

**Caille, O., Rossier, C. & Perron, K. (2007).** A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**, 4561-4568.

**Cao, L., Srikumar, R. & Poole, K. (2004).** MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of the *nalC* gene encoding a repressor of PA3720-PA3719. *Mol Microbiol* **53**, 1423-1436.

**Castang, S. & Dove, S. L. (2010).** High-order oligomerization is required for the function of the H-NS family member MvaT in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **78**, 916-931.

**Castanheira, M., Deshpande, L. M., Costello, A., Davies, T. A. & Jones, R. N. (2014a).** Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries. *J Antimicrob Chemother* **69**, 1804-1814.

**Castanheira, M., Mills, J. C., Farrell, D. J. & Jones, R. N. (2014b).** Mutation-driven  $\beta$ -lactam resistance mechanisms among contemporary ceftazidime-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* isolates from U.S. hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 6844-6850.

**Cavallo, J. D., Hocquet, D., Plesiat, P., Fabre, R., Roussel-Delvallez, M. & antibiotiques), G. G. d. E. d. I. R. d. P. a. a. (2007).** Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials: a 2004 French multicentre hospital study. *J Antimicrob Chemother* **59**, 1021-1024.

**Colyer, T. E. & Kredich, N. M. (1996).** In vitro characterization of constitutive CysB proteins from *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **21**, 247-256.

**Cornaglia, G., Giamarellou, H. & Rossolini, G. M. (2011).** Metallo- $\beta$ -lactamases: a last frontier for  $\beta$ -lactams? *Lancet Infect Dis* **11**, 381-393.

**Craven, S. H., Ezezika, O. C., Haddad, S., Hall, R. A., Momany, C. & Neidle, E. L. (2009).** Inducer responses of BenM, a LysR-type transcriptional regulator from *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Mol Microbiol* **72**, 881-894.

**Dan, M., Torossian, K., Weissberg, D. & Kitzes, R. (1993).** The penetration of ciprofloxacin into bronchial mucosa, lung parenchyma, and pleural tissue after intravenous administration. *Eur J Clin Pharmacol* **44**, 101-102.

- Davies, T. A., Shang, W., Bush, K. & Flamm, R. K. (2008). Affinity of doripenem and comparators to penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 1510-1512.
- Davies, T. A., Marie Queenan, A., Morrow, B. J., Shang, W., Amsler, K., He, W., Lynch, A. S., Pillar, C. & Flamm, R. K. (2011). Longitudinal survey of carbapenem resistance and resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae* and non-fermenters from the USA in 2007-09. *J Antimicrob Chemother* **66**, 2298-2307.
- Deitermann, S., Sprie, G. S. & Koch, H. G. (2005). A dual function for SecA in the assembly of single spanning membrane proteins in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**, 39077-39085.
- Dettman, J. R., Rodrigue, N., Aaron, S. D. & Kassen, R. (2013). Evolutionary genomics of epidemic and nonepidemic strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 21065-21070.
- Diene, S. M. & Rolain, J. M. (2014). Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* **20**, 831-838.
- Dieppois, G., Ducret, V., Caille, O. & Perron, K. (2012). The transcriptional regulator CzcR modulates antibiotic resistance and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **7**, e38148.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. & Helinski, D. R. (1980). Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 7347-7351.
- Dumas, J. L., van Delden, C., Perron, K. & Köhler, T. (2006). Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol Lett* **254**, 217-225.
- Economou, A. & Wickner, W. (1994). SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* **78**, 835-843.
- Elkins, C. A. & Nikaido, H. (2003). Chimeric analysis of AcrA function reveals the importance of its C-terminal domain in its interaction with the AcrB multidrug efflux pump. *J Bacteriol* **185**, 5349-5356.
- Epp, S. F., Köhler, T., Plésiat, P., Michéa-Hamzehpour, M., Frey, J. & Pechère, J. C. (2001). C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 1780-1787.
- Eren, E., Vijayaraghavan, J., Liu, J., Cheneke, B. R., Touw, D. S., Lepore, B. W., Indic, M., Movileanu, L. & van den Berg, B. (2012). Substrate specificity within a family of outer membrane carboxylate channels. *PLoS Biol* **10**, e1001242.
- Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A. & Crawford, I. P. (1990). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol* **172**, 884-900.
- Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J. & Poole, K. (1998). Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **180**, 5443-5447.

- Evans, K., Adewoye, L. & Poole, K. (2001). MexR repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of MexR binding sites in the *mexA-mexR* intergenic region. *J Bacteriol* **183**, 807-812.
- Fang, Z. L., Zhang, L. Y., Huang, Y. M., Qing, Y., Cao, K. Y., Tian, G. B. & Huang, X. (2014). OprD mutations and inactivation in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from China. *Infect Genet Evol* **21**, 124-128.
- Fargier, E., Mac Aogáin, M., Mooij, M. J., Woods, D. F., Morrissey, J. P., Dobson, A. D., Adams, C. & O'Gara, F. (2012). MexT functions as a redox-responsive regulator modulating disulfide stress resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **194**, 3502-3511.
- Farra, A., Islam, S., Strålfors, A., Sörberg, M. & Wretling, B. (2008). Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem. *Int J Antimicrob Agents* **31**, 427-433.
- Fernandez-Recio, J., Walas, F., Federici, L., Venkatesh Pratap, J., Bavro, V. N., Miguel, R. N., Mizuguchi, K. & Luisi, B. (2004). A model of a transmembrane drug-efflux pump from Gram-negative bacteria. *FEBS Lett* **578**, 5-9.
- Fernández, L., Gooderham, W. J., Bains, M., McPhee, J. B., Wiegand, I. & Hancock, R. E. (2010). Adaptive resistance to the "last hope" antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 3372-3382.
- Fernández, L. & Hancock, R. E. (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev* **25**, 661-681.
- Fetar, H., Gilmour, C., Klinoski, R., Daigle, D. M., Dean, C. R. & Poole, K. (2011). *mexEF-oprN* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by the MexT activator in response to nitrosative stress and chloramphenicol. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 508-514.
- Fournier, D., Richardot, C., Müller, E., Robert-Nicoud, M., Llanes, C., Plésiat, P. & Jeannot, K. (2013). Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **68**, 1772-1780.
- Frisk, A., Schurr, J. R., Wang, G., Bertucci, D. C., Marrero, L., Hwang, S. H., Hassett, D. J. & Schurr, M. J. (2004). Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* after interaction with human airway epithelial cells. *Infect Immun* **72**, 5433-5438.
- Fukasawa, M., Sumita, Y., Harabe, E. T., Tanio, T., Nouda, H., Kohzuki, T., Okuda, T., Matsumura, H. & Sunagawa, M. (1992). Stability of meropenem and effect of 1 beta-methyl substitution on its stability in the presence of renal dehydropeptidase I. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 1577-1579.
- Fukuda, H., Hosaka, M., Hirai, K. & Iyobe, S. (1990). New norfloxacin resistance gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 1757-1761.

- Fukuda, H., Hosaka, M., Iyobe, S., Gotoh, N., Nishino, T. & Hirai, K. (1995).** *nfxC*-type quinolone resistance in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 790-792.
- Fukuoka, T., Masuda, N., Takenouchi, T., Sekine, N., Iijima, M. & Ohya, S. (1991).** Increase in susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to carbapenem antibiotics in low-amino-acid media. *Antimicrob Agents Chemother* **35**, 529-532.
- Ge, X., Wang, R., Ma, J., Liu, Y., Ezemaduka, A. N., Chen, P. R., Fu, X. & Chang, Z. (2014).** DegP primarily functions as a protease for the biogenesis of  $\beta$ -barrel outer membrane proteins in the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *FEBS J* **281**, 1226-1240.
- Giske, C. G., Buarø, L., Sundsfjord, A. & Wretling, B. (2008).** Alterations of porin, pumps, and penicillin-binding proteins in carbapenem resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist* **14**, 23-30.
- Gotoh, N., Tsujimoto, H., Nomura, A., Okamoto, K., Tsuda, M. & Nishino, T. (1998a).** Functional replacement of OprJ by OprM in the MexCD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **165**, 21-27.
- Gotoh, N., Tsujimoto, H., Tsuda, M., Okamoto, K., Nomura, A., Wada, T., Nakahashi, M. & Nishino, T. (1998b).** Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in DeltamexA-mexB-oprM mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 1938-1943.
- Goulenok, T. M., Majed, K. & Monchi, M. (2011).** Role and impact of carbapenem in nosocomial infections. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* **6**, 45-53.
- Gross, H. & Loper, J. E. (2009).** Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat Prod Rep* **26**, 1408-1446.
- Grégoire, N., Raherison, S., Grignon, C., Comets, E., Marliat, M., Ploy, M. C. & Couet, W. (2010).** Semimechanistic pharmacokinetic-pharmacodynamic model with adaptation development for time-kill experiments of ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 2379-2384.
- Guénard, S., Muller, C., Monlezun, L., Benas, P., Broutin, I., Jeannot, K. & Plésiat, P. (2014).** Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 221-228.
- Hammami, S., Ghozzi, R., Burghoffer, B., Arlet, G. & Redjeb, S. (2009).** Mechanisms of carbapenem resistance in non-metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Tunisian hospital. *Pathol Biol (Paris)* **57**, 530-535.
- Hamood, A. N., Griswold, J. & Colmer, J. (1996).** Characterization of elastase-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **64**, 3154-3160.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hancock, R. E. & Brinkman, F. S. (2002).** Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol* **56**, 17-38.

- Hashizume, T., Ishino, F., Nakagawa, J., Tamaki, S. & Matsuhashi, M. (1984). Studies on the mechanism of action of imipenem (N-formimidoylthienamycin) in vitro: binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E. coli*. *J Antibiot (Tokyo)* **37**, 394-400.
- Hassan, K. A., Jackson, S. M., Penesyan, A., Patching, S. G., Tetu, S. G., Eijkelkamp, B. A., Brown, M. H., Henderson, P. J. & Paulsen, I. T. (2013). Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 20254-20259.
- Heeb, S., Fletcher, M. P., Chhabra, S. R., Diggle, S. P., Williams, P. & Cámara, M. (2011). Quinolones: from antibiotics to autoinducers. *FEMS Microbiol Rev* **35**, 247-274.
- Henrichfreise, B., Wiegand, I., Pfister, W. & Wiedemann, B. (2007). Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 4062-4070.
- Herrera, M. C., Duque, E., Rodríguez-Herva, J. J., Fernández-Escamilla, A. M. & Ramos, J. L. (2010). Identification and characterization of the PhhR regulon in *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **12**, 1427-1438.
- Herrero, M., de Lorenzo, V. & Timmis, K. N. (1990). Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**, 6557-6567.
- Higgins, M. K., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C. & Koronakis, V. (2004). Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9994-9999.
- Hikida, M., Kawashima, K., Yoshida, M. & Mitsuhashi, S. (1992). Inactivation of new carbapenem antibiotics by dehydropeptidase-I from porcine and human renal cortex. *J Antimicrob Chemother* **30**, 129-134.
- Hirai, K., Suzue, S., Irikura, T., Iyobe, S. & Mitsuhashi, S. (1987). Mutations producing resistance to norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **31**, 582-586.
- Hoang, T. T., Kutchma, A. J., Becher, A. & Schweizer, H. P. (2000). Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid* **43**, 59-72.
- Hocquet, D., Plésiat, P., Dehecq, B., Mariotte, P., Talon, D., Bertrand, X. & ONERBA (2010). Nationwide investigation of extended-spectrum beta-lactamases, metallo-beta-lactamases, and extended-spectrum oxacillinases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains in France. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 3512-3515.
- Huang, H. & Hancock, R. E. (1993). Genetic definition of the substrate selectivity of outer membrane porin protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **175**, 7793-7800.
- Huang, H., Jeanteur, D., Pattus, F. & Hancock, R. E. (1995). Membrane topology and site-specific mutagenesis of *Pseudomonas aeruginosa* porin OprD. *Mol Microbiol* **16**, 931-941.

- Huang, H. & Hancock, R. E. (1996).** The role of specific surface loop regions in determining the function of the imipenem-specific pore protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **178**, 3085-3090.
- Husain, F., Humbard, M. & Misra, R. (2004).** Interaction between the TolC and AcrA proteins of a multidrug efflux system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**, 8533-8536.
- Ikonomidis, A., Tsakris, A., Kantzanou, M., Spanakis, N., Maniatis, A. N. & Pournaras, S. (2008).** Efflux system overexpression and decreased OprD contribute to the carbapenem heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **279**, 36-39.
- Isabella, V. M., Campbell, A. J., Manchester, J., Sylvester, M., Nayar, A. S., Ferguson, K. E., Tommasi, R. & Miller, A. A. (2015).** Toward the Rational Design of Carbapenem Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem Biol* **22**, 535-547.
- Jalal, S., Ciofu, O., Hoiby, N., Gotoh, N. & Wretling, B. (2000).** Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 710-712.
- Jeannot, K., Sobel, M. L., El Garch, F., Poole, K. & Plésiat, P. (2005).** Induction of the MexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction. *J Bacteriol* **187**, 5341-5346.
- Jeannot, K., Elsen, S., Köhler, T., Attree, I., van Delden, C. & Plésiat, P. (2008).** Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 2455-2462.
- Jimenez, P. N., Koch, G., Thompson, J. A., Xavier, K. B., Cool, R. H. & Quax, W. J. (2012).** The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**, 46-65.
- Jin, Y., Yang, H., Qiao, M. & Jin, S. (2011).** MexT regulates the type III secretion system through MexS and PtrC in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **193**, 399-410.
- Johnson, M. K. & Boese-Marrazzo, D. (1980).** Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* **29**, 1028-1033.
- Join-Lambert, O. F., Michéa-Hamzehpour, M., Köhler, T., Chau, F., Faurisson, F., Dautrey, S., Vissuzaine, C., Carbon, C. & Pechère, J. (2001).** Differential selection of multidrug efflux mutants by trovafloxacin and ciprofloxacin in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* acute pneumonia in rats. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 571-576.
- Jones, R. N., Huynh, H. K. & Biedenbach, D. J. (2004).** Activities of doripenem (S-4661) against drug-resistant clinical pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3136-3140.
- Juhas, M., Wiehlmann, L., Huber, B. & other authors (2004).** Global regulation of quorum sensing and virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **150**, 831-841.

- Jørgensen, K. M., Wassermann, T., Jensen, P., Hengzuang, W., Molin, S., Høiby, N. & Ciofu, O. (2013).** Sublethal ciprofloxacin treatment leads to rapid development of high-level ciprofloxacin resistance during long-term experimental evolution of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 4215-4221.
- Kahan, J. S., Kahan, F. M., Goegelman, R. & other authors (1979).** Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *J Antibiot (Tokyo)* **32**, 1-12.
- Kaniga, K., Delor, I. & Cornelis, G. R. (1991).** A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**, 137-141.
- Karatuna, O. & Yagci, A. (2010).** Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates. *Clin Microbiol Infect* **16**, 1770-1775.
- Kawakita, Y., Taguchi, F., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. & Ichinose, Y. (2012).** Characterization of each *aefR* and *mexT* mutant in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 6605. *Mol Genet Genomics* **287**, 473-484.
- Kay, E., Humair, B., Déneraud, V., Riedel, K., Spahr, S., Eberl, L., Valverde, C. & Haas, D. (2006).** Two GacA-dependent small RNAs modulate the quorum-sensing response in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**, 6026-6033.
- Kearns, D. B. (2010).** A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* **8**, 634-644.
- Knoll, M. & Pleiss, J. (2008).** The Medium-Chain Dehydrogenase/reductase Engineering Database: a systematic analysis of a diverse protein family to understand sequence-structure-function relationship. *Protein Sci* **17**, 1689-1697.
- Knott-Hunziker, V., Petursson, S., Waley, S. G., Jaurin, B. & Grundström, T. (1982).** The acyl-enzyme mechanism of beta-lactamase action. The evidence for class C Beta-lactamases. *Biochem J* **207**, 315-322.
- Knowles, T. J., Scott-Tucker, A., Overduin, M. & Henderson, I. R. (2009).** Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. *Nat Rev Microbiol* **7**, 206-214.
- Kolayli, F., Karadenizli, A., Savli, H., Ergen, K., Hatirnaz, O., Balikci, E., Budak, F. & Vahaboglu, H. (2004).** Effect of carbapenems on the transcriptional expression of the *oprD*, *oprM* and *oprN* genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* **53**, 915-920.
- Kong, K. F., Jayawardena, S. R., Indulkar, S. D., Del Puerto, A., Koh, C. L., Høiby, N. & Mathee, K. (2005).** *Pseudomonas aeruginosa* AmpR is a global transcriptional factor that regulates expression of AmpC and PoxB beta-lactamases, proteases, quorum sensing, and other virulence factors. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4567-4575.
- Krulwich, T. A., Lewinson, O., Padan, E. & Bibi, E. (2005).** Do physiological roles foster persistence of drug/multidrug-efflux transporters? A case study. *Nat Rev Microbiol* **3**, 566-572.

- Kugelberg, E., Löfmark, S., Wretling, B. & Andersson, D. I. (2005).** Reduction of the fitness burden of quinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **55**, 22-30.
- Kumar, A. & Schweizer, H. P. (2011).** Evidence of MexT-independent overexpression of MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* in presence of metabolic stress. *PLoS One* **6**, e26520.
- Köhler, T., Michea-Hamzehpour, M., Plesiat, P., Kahr, A. L. & Pechere, J. C. (1997a).** Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **41**, 2540-2543.
- Köhler, T., Michéa-Hamzehpour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L. K. & Pechère, J. C. (1997b).** Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **23**, 345-354.
- Köhler, T., Epp, S. F., Curty, L. K. & Pechère, J. C. (1999a).** Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**, 6300-6305.
- Köhler, T., Michea-Hamzehpour, M., Epp, S. F. & Pechere, J. C. (1999b).** Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 424-427.
- Köhler, T., Curty, L. K., Barja, F., van Delden, C. & Pechère, J. C. (2000).** Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* **182**, 5990-5996.
- Köhler, T., van Delden, C., Curty, L. K., Hamzehpour, M. M. & Pechere, J. C. (2001).** Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**, 5213-5222.
- Lacks, S. & Greenberg, B. (1977).** Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *J Mol Biol* **114**, 153-168.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lamarche, M. G. & Déziel, E. (2011).** MexEF-OprN efflux pump exports the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) precursor HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline). *PLoS One* **6**, e24310.
- Lau, G. W., Hassett, D. J., Ran, H. & Kong, F. (2004).** The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med* **10**, 599-606.
- Lazar, S. W., Almirón, M., Tormo, A. & Kolter, R. (1998).** Role of the *Escherichia coli* SurA protein in stationary-phase survival. *J Bacteriol* **180**, 5704-5711.
- Le Berre, R., Faure, K., Nguyen, S., Pierre, M., Ader, F. & Guery, B. (2006).** [Quorum sensing: a new clinical target for *Pseudomonas aeruginosa*?]. *Med Mal Infect* **36**, 349-357.

- Legaree, B. A., Daniels, K., Weadge, J. T., Cockburn, D. & Clarke, A. J. (2007).** Function of penicillin-binding protein 2 in viability and morphology of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **59**, 411-424.
- Lenney, W. & Gilchrist, F. J. (2011).** *Pseudomonas aeruginosa* and cyanide production. *Eur Respir J* **37**, 482-483.
- Leyton, D. L., Rossiter, A. E. & Henderson, I. R. (2012).** From self sufficiency to dependence: mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis. *Nat Rev Microbiol* **10**, 213-225.
- Li, X. Z., Zhang, L. & Poole, K. (1998a).** Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance. *J Bacteriol* **180**, 2987-2991.
- Li, X. Z., Zhang, L., Srikumar, R. & Poole, K. (1998b).** Beta-lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 399-403.
- Li, X. Z., Barré, N. & Poole, K. (2000).** Influence of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **46**, 885-893.
- Li, X. Z., Plésiat, P. & Nikaido, H. (2015).** The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* **28**, 337-418.
- Liao, J. & Sauer, K. (2012).** The MerR-like transcriptional regulator BrlR contributes to *Pseudomonas aeruginosa* biofilm tolerance. *J Bacteriol* **194**, 4823-4836.
- Liao, J., Schurr, M. J. & Sauer, K. (2013).** The MerR-like regulator BrlR confers biofilm tolerance by activating multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* **195**, 3352-3363.
- Liao, X. & Hancock, R. E. (1997).** Identification of a penicillin-binding protein 3 homolog, PBP3x, in *Pseudomonas aeruginosa*: gene cloning and growth phase-dependent expression. *J Bacteriol* **179**, 1490-1496.
- Liberati, N. T., Urbach, J. M., Miyata, S., Lee, D. G., Drenkard, E., Wu, G., Villanueva, J., Wei, T. & Ausubel, F. M. (2006).** An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2833-2838.
- Linares, J. F., López, J. A., Camafeita, E., Albar, J. P., Rojo, F. & Martínez, J. L. (2005).** Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**, 1384-1391.
- Lister, P. D., Wolter, D. J. & Hanson, N. D. (2009).** Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* **22**, 582-610.
- Liu, J., Wolfe, A. J., Eren, E., Vijayaraghavan, J., Indic, M., van den Berg, B. & Movileanu, L. (2012).** Cation selectivity is a conserved feature in the OccD subfamily of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta* **1818**, 2908-2916.

- Livermore, D. M. (1995).** beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* **8**, 557-584.
- Llanes, C., Hocquet, D., Vogne, C., Benali-Baitich, D., Neuwirth, C. & Plésiat, P. (2004).** Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 1797-1802.
- Llanes, C., Köhler, T., Patry, I., Dehecq, B., van Delden, C. & Plésiat, P. (2011).** Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 5676-5684.
- Llanes, C., Pourcel, C., Richardot, C., Plésiat, P., Fichant, G., Cavallo, J. D., Mérens, A. & Group, G. S. (2013).** Diversity of  $\beta$ -lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study. *J Antimicrob Chemother* **68**, 1763-1771.
- Lobedanz, S., Bokma, E., Symmons, M. F., Koronakis, E., Hughes, C. & Koronakis, V. (2007).** A periplasmic coiled-coil interface underlying TolC recruitment and the assembly of bacterial drug efflux pumps. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4612-4617.
- Lundgren, B. R., Thornton, W., Dornan, M. H., Villegas-Peñaranda, L. R., Boddy, C. N. & Nomura, C. T. (2013).** Gene PA2449 is essential for glycine metabolism and pyocyanin biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **195**, 2087-2100.
- Luong, P. M., Shogan, B. D., Zaborin, A., Belogortseva, N., Shrout, J. D., Zaborina, O. & Alverdy, J. C. (2014).** Emergence of the P2 phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strains involves various mutations in *mexT* or *mexF*. *J Bacteriol* **196**, 504-513.
- Maddocks, S. E. & Oyston, P. C. (2008).** Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* **154**, 3609-3623.
- Manoil, C. & Beckwith, J. (1985).** *Tnp<sub>hoA</sub>*: a transposon probe for protein export signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 8129-8133.
- Maseda, H., Saito, K., Nakajima, A. & Nakae, T. (2000a).** Variation of the *mexT* gene, a regulator of the MexEF-oprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **192**, 107-112.
- Maseda, H., Yoneyama, H. & Nakae, T. (2000b).** Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 658-664.
- Maseda, H., Sawada, I., Saito, K., Uchiyama, H., Nakae, T. & Nomura, N. (2004).** Enhancement of the *mexAB-oprM* efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the *mexEF-oprN* efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 1320-1328.
- Maseda, H., Uwate, M. & Nakae, T. (2010).** Transcriptional regulation of the *mexEF-oprN* multidrug efflux pump operon by MexT and an unidentified repressor in *nfxC*-type mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **311**, 36-43.

- Masuda, N. & Ohya, S. (1992).** Cross-resistance to meropenem, cepheems, and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 1847-1851.
- Masuda, N., Sakagawa, E. & Ohya, S. (1995).** Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 645-649.
- Masuda, N., Gotoh, N., Ishii, C., Sakagawa, E., Ohya, S. & Nishino, T. (1999).** Interplay between chromosomal beta-lactamase and the MexAB-OprM efflux system in intrinsic resistance to beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 400-402.
- Minagawa, S., Inami, H., Kato, T., Sawada, S., Yasuki, T., Miyairi, S., Horikawa, M., Okuda, J. & Gotoh, N. (2012).** RND type efflux pump system MexAB-OprM of *Pseudomonas aeruginosa* selects bacterial languages, 3-oxo-acyl-homoserine lactones, for cell-to-cell communication. *BMC Microbiol* **12**, 70.
- Misra, R. & Bavro, V. N. (2009).** Assembly and transport mechanism of tripartite drug efflux systems. *Biochim Biophys Acta* **1794**, 817-825.
- Mokhonov, V. V., Mokhonova, E. I., Akama, H. & Nakae, T. (2004).** Role of the membrane fusion protein in the assembly of resistance-nodulation-cell division multidrug efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* **322**, 483-489.
- Mooij, M. J., O'Connor, H. F., Tian, Z. X., Wang, Y. P., Adams, C., Morrissey, J. P. & O'Gara, F. (2010).** Antibiotic selection leads to inadvertent selection of *nfxC*-type phenotypic mutants in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol Rep* **2**, 461-464.
- Morita, Y., Cao, L., Gould, V. C., Avison, M. B. & Poole, K. (2006).** *nalD* encodes a second repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**, 8649-8654.
- Morita, Y., Tomida, J. & Kawamura, Y. (2015).** Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate PA7: identification of a novel MexS variant involved in upregulation of the *mexEF-oprN* multidrug efflux operon. *Front Microbiol* **6**, 8.
- Moscoso, J. A., Mikkelsen, H., Heeb, S., Williams, P. & Filloux, A. (2011).** The *Pseudomonas aeruginosa* sensor RetS switches type III and type VI secretion via c-di-GMP signalling. *Environ Microbiol* **13**, 3128-3138.
- Moyá, B., Beceiro, A., Cabot, G., Juan, C., Zamorano, L., Alberti, S. & Oliver, A. (2012).** Pan- $\beta$ -lactam resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: molecular mechanisms, penicillin-binding protein profiles, and binding affinities. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 4771-4778.
- Muller, C., Plésiat, P. & Jeannot, K. (2011).** A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and  $\beta$ -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 1211-1221.
- Muraoka, S., Okumura, R., Ogawa, N., Nonaka, T., Miyashita, K. & Senda, T. (2003).** Crystal structure of a full-length LysR-type transcriptional regulator, CbnR: unusual combination of two subunit forms and molecular bases for causing and changing DNA bend. *J Mol Biol* **328**, 555-566.

- Nehme, D., Li, X. Z., Elliot, R. & Poole, K. (2004). Assembly of the MexAB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of mutations in *mexA* compromising MexA multimerization and interaction with MexB. *J Bacteriol* **186**, 2973-2983.
- Nehme, D. & Poole, K. (2005). Interaction of the MexA and MexB components of the MexAB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of MexA extragenic suppressors of a T578I mutation in MexB. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 4375-4378.
- Nicastro, G. G., Kaihami, G. H., Pereira, T. O., Meireles, D. A., Groleau, M. C., Déziel, E. & Baldini, R. L. (2014). Cyclic-di-GMP levels affect *Pseudomonas aeruginosa* fitness in the presence of imipenem. *Environ Microbiol* **16**, 1321-1333.
- Nikaido, H. (2011). Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **77**, 1-60.
- Norrby, S. R. (1985). Imipenem/cilastatin: rationale for a fixed combination. *Rev Infect Dis* **7 Suppl 3**, S447-451.
- Ntsogo Enguéné, V. Y., Verchère, A., Phan, G., Broutin, I. & Picard, M. (2015). Catch me if you can: a biotinylated proteoliposome affinity assay for the investigation of assembly of the MexA-MexB-OprM efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* **6**, 541.
- Ocampo-Sosa, A. A., Cabot, G., Rodríguez, C. & other authors (2012). Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 1703-1713.
- Ochs, M. M., Lu, C. D., Hancock, R. E. & Abdelal, A. T. (1999a). Amino acid-mediated induction of the basic amino acid-specific outer membrane porin OprD from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**, 5426-5432.
- Ochs, M. M., McCusker, M. P., Bains, M. & Hancock, R. E. (1999b). Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1085-1090.
- Ochs, M. M., Bains, M. & Hancock, R. E. (2000). Role of putative loops 2 and 3 in imipenem passage through the specific porin OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 1983-1985.
- Odenholt, I. (2001). Ertapenem: a new carbapenem. *Expert Opin Investig Drugs* **10**, 1157-1166.
- Oh, H., Stenhoff, J., Jalal, S. & Wretling, B. (2003). Role of efflux pumps and mutations in genes for topoisomerases II and IV in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Microb Drug Resist* **9**, 323-328.
- Olivares, J., Alvarez-Ortega, C., Linares, J. F., Rojo, F., Köhler, T. & Martínez, J. L. (2012). Overproduction of the multidrug efflux pump MexEF-OprN does not impair *Pseudomonas aeruginosa* fitness in competition tests, but produces specific changes in bacterial regulatory networks. *Environ Microbiol* **14**, 1968-1981.

- Olivares, J., Álvarez-Ortega, C. & Martínez, J. L. (2014).** Metabolic compensation of fitness costs associated with overexpression of the multidrug efflux pump MexEF-OprN in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **58**, 3904-3913.
- Olivas, A. D., Shogan, B. D., Valuckaite, V. & other authors (2012).** Intestinal tissues induce an SNP mutation in *Pseudomonas aeruginosa* that enhances its virulence: possible role in anastomotic leak. *PLoS One* **7**, e44326.
- Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F. & Blázquez, J. (2000).** High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* **288**, 1251-1254.
- Pai, H., Kim, J., Lee, J. H., Choe, K. W. & Gotoh, N. (2001).** Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **45**, 480-484.
- Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A. & Bonomo, R. A. (2011).** Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 4943-4960.
- Park, S. M., Lu, C. D. & Abdelal, A. T. (1997).** Cloning and characterization of *argR*, a gene that participates in regulation of arginine biosynthesis and catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* **179**, 5300-5308.
- Park, Y. M., Park, H. J., Joung, Y. H. & Bang, I. S. (2011).** Nitrosative stress causes amino acid auxotrophy in hmp mutant *Salmonella Typhimurium*. *Microbiol Immunol* **55**, 743-747.
- Parkin, J. & Khalid, S. (2014).** Atomistic molecular-dynamics simulations enable prediction of the arginine permeation pathway through OccD1/OprD from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophys J* **107**, 1853-1861.
- Pearson, J. P., Van Delden, C. & Iglewski, B. H. (1999).** Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* **181**, 1203-1210.
- Perron, K., Caille, O., Rossier, C., Van Delden, C., Dumas, J. L. & Köhler, T. (2004).** CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **279**, 8761-8768.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. (2002).** Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**, e36.
- Piddock, L. J. (2006).** Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* **19**, 382-402.
- Pillar, C. M., Torres, M. K., Brown, N. P., Shah, D. & Sahm, D. F. (2008).** *In vitro* activity of doripenem, a carbapenem for the treatment of challenging infections caused by gram-negative bacteria, against recent clinical isolates from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 4388-4399.

- Pirnay, J. P., De Vos, D., Mossialos, D., Vanderkelen, A., Cornelis, P. & Zizi, M. (2002).** Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa oprD* gene from clinical and environmental isolates. *Environ Microbiol* **4**, 872-882.
- Pirnay, J. P., Bilocq, F., Pot, B. & other authors (2009).** *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. *PLoS One* **4**, e7740.
- Poole, K., Krebs, K., McNally, C. & Neshat, S. (1993).** Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol* **175**, 7363-7372.
- Poole, K., Tetro, K., Zhao, Q., Neshat, S., Heinrichs, D. E. & Bianco, N. (1996).** Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 2021-2028.
- Poole, K. (2004).** Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* **10**, 12-26.
- Poonsuk, K., Tribuddharat, C. & Chuanchuen, R. (2014).** Simultaneous overexpression of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* non-cystic fibrosis clinical isolates. *Can J Microbiol* **60**, 437-443.
- Quale, J., Bratu, S., Gupta, J. & Landman, D. (2006).** Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 1633-1641.
- Ramsey, M. M. & Whiteley, M. (2004).** *Pseudomonas aeruginosa* attachment and biofilm development in dynamic environments. *Mol Microbiol* **53**, 1075-1087.
- Ricci, D. P. & Silhavy, T. J. (2012).** The Bam machine: a molecular cooper. *Biochim Biophys Acta* **1818**, 1067-1084.
- Richardot, C., Plésiat, P., Fournier, D., Monlezun, L., Broutin, I. & Llanes, C. (2015).** Carbapenem resistance in cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa* as a result of amino acid substitutions in porin OprD. *Int J Antimicrob Agents* **45**, 529-532.
- Riera, E., Cabot, G., Mulet, X., García-Castillo, M., del Campo, R., Juan, C., Cantón, R. & Oliver, A. (2011).** *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *J Antimicrob Chemother* **66**, 2022-2027.
- Roca, A., Rodríguez-Herva, J. J., Duque, E. & Ramos, J. L. (2008).** Physiological responses of *Pseudomonas putida* to formaldehyde during detoxification. *Microb Biotechnol* **1**, 158-169.
- Rodríguez-Martínez, J. M., Poirel, L. & Nordmann, P. (2009).** Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 4783-4788.
- Rodríguez-Quiñones, F., Hernández-Allés, S., Albertí, S., Escribá, P. V. & Benedí, V. J. (1994).** A novel plasmid series for in vitro production of *phoA* translational fusions and its use in the construction of *Escherichia coli* PhoE::PhoA hybrid proteins. *Gene* **151**, 125-130.

- Rojo-Bezares, B., Estepa, V., Cebollada, R., de Toro, M., Somalo, S., Seral, C., Castillo, F. J., Torres, C. & Sáenz, Y. (2014).** Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Spanish hospital: characterization of metallo-beta-lactamases, porin OprD and integrons. *Int J Med Microbiol* **304**, 405-414.
- Rutherford, S. T. & Bassler, B. L. (2012).** Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**.
- Saino, Y., Kobayashi, F., Inoue, M. & Mitsuhashi, S. (1982).** Purification and properties of inducible penicillin beta-lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* **22**, 564-570.
- Saito, K., Yoneyama, H. & Nakae, T. (1999).** *nalB*-type mutations causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the *mexR* gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *FEMS Microbiol Lett* **179**, 67-72.
- Sakyo, S., Tomita, H., Tanimoto, K., Fujimoto, S. & Ike, Y. (2006).** Potency of carbapenems for the prevention of carbapenem-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*: the high potency of a new carbapenem doripenem. *J Antibiot (Tokyo)* **59**, 220-228.
- Sanbongi, Y., Shimizu, A., Suzuki, T., Nagaso, H., Ida, T., Maebashi, K. & Gotoh, N. (2009).** Classification of OprD sequence and correlation with antimicrobial activity of carbapenem agents in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates collected in Japan. *Microbiol Immunol* **53**, 361-367.
- Schaber, J. A., Carty, N. L., McDonald, N. A., Graham, E. D., Cheluvappa, R., Griswold, J. A. & Hamood, A. N. (2004).** Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* **53**, 841-853.
- Seeger, M. A., Schiefner, A., Eicher, T., Verrey, F., Diederichs, K. & Pos, K. M. (2006).** Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. *Science* **313**, 1295-1298.
- Sennhauser, G., Bukowska, M. A., Briand, C. & Grütter, M. G. (2009).** Crystal structure of the multidrug exporter MexB from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Mol Biol* **389**, 134-145.
- Sklar, J. G., Wu, T., Kahne, D. & Silhavy, T. J. (2007).** Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes Dev* **21**, 2473-2484.
- Skurnik, D., Roux, D., Cattoir, V. & other authors (2013).** Enhanced in vivo fitness of carbapenem-resistant *oprD* mutants of *Pseudomonas aeruginosa* revealed through high-throughput sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 20747-20752.
- Sobel, M. L., Hocquet, D., Cao, L., Plesiat, P. & Poole, K. (2005a).** Mutations in PA3574 (*nalD*) lead to increased MexAB-OprM expression and multidrug resistance in laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 1782-1786.
- Sobel, M. L., Neshat, S. & Poole, K. (2005b).** Mutations in PA2491 (*mexS*) promote MexT-dependent *mexEF-oprN* expression and multidrug resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**, 1246-1253.

- Solov'eva, T. F., Novikova, O. D. & Portnyagina, O. Y. (2012).** Biogenesis of  $\beta$ -barrel integral proteins of bacterial outer membrane. *Biochemistry (Mosc)* **77**, 1221-1236.
- Song, J., Xie, G., Elf, P. K., Young, K. D. & Jensen, R. A. (1998).** Comparative analysis of *Pseudomonas aeruginosa* penicillin-binding protein 7 in the context of its membership in the family of low-molecular-mass PBPs. *Microbiology* **144 ( Pt 4)**, 975-983.
- Srikumar, R., Li, X. Z. & Poole, K. (1997).** Inner membrane efflux components are responsible for beta-lactam specificity of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **179**, 7875-7881.
- Srikumar, R., Paul, C. J. & Poole, K. (2000).** Influence of mutations in the *mexR* repressor gene on expression of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**, 1410-1414.
- Srinivasan, V. B., Mondal, A., Venkataramaiah, M., Chauhan, N. K. & Rajamohan, G. (2013).** Role of *oxyRKP*, a novel LysR-family transcriptional regulator, in antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology* **159**, 1301-1314.
- Stegmeier, J. F., Polleichtner, G., Brandes, N., Hotz, C. & Andersen, C. (2006).** Importance of the adaptor (membrane fusion) protein hairpin domain for the functionality of multidrug efflux pumps. *Biochemistry* **45**, 10303-10312.
- Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L. & other authors (2000).** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959-964.
- Sugawara, E., Nestorovich, E. M., Bezrukov, S. M. & Nikaido, H. (2006).** *Pseudomonas aeruginosa* porin OprF exists in two different conformations. *J Biol Chem* **281**, 16220-16229.
- Sumita, Y. & Fukasawa, M. (1993).** Transient carbapenem resistance induced by salicylate in *Pseudomonas aeruginosa* associated with suppression of outer membrane protein D2 synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 2743-2746.
- Tamber, S. & Hancock, R. E. (2006).** Involvement of two related porins, OprD and OpdP, in the uptake of arginine by *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **260**, 23-29.
- Tamber, S., Ochs, M. M. & Hancock, R. E. (2006).** Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **188**, 45-54.
- Tamber, S., Maier, E., Benz, R. & Hancock, R. E. (2007).** Characterization of OpdH, a *Pseudomonas aeruginosa* porin involved in the uptake of tricarboxylates. *J Bacteriol* **189**, 929-939.
- Tanimoto, K., Tomita, H., Fujimoto, S., Okuzumi, K. & Ike, Y. (2008).** Fluoroquinolone enhances the mutation frequency for meropenem-selected carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, but use of the high-potency drug doripenem inhibits mutant formation. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 3795-3800.
- Terzi, H. A., Kulah, C. & Ciftci, I. H. (2014).** The effects of active efflux pumps on antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *World J Microbiol Biotechnol* **30**, 2681-2687.

- Tian, Z. X., Fargier, E., Mac Aogáin, M., Adams, C., Wang, Y. P. & O'Gara, F. (2009a). Transcriptome profiling defines a novel regulon modulated by the LysR-type transcriptional regulator MexT in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Res* **37**, 7546-7559.
- Tian, Z. X., Mac Aogáin, M., O'Connor, H. F., Fargier, E., Mooij, M. J., Adams, C., Wang, Y. P. & O'Gara, F. (2009b). MexT modulates virulence determinants in *Pseudomonas aeruginosa* independent of the MexEF-OprN efflux pump. *Microb Pathog* **47**, 237-241.
- Toda, M., Sato, K., Nakazawa, H., Inoue, M. & Mitsuhashi, S. (1980). Effect of N-formimidoyl thienamycin (MK0787) on beta-lactamases and activity against beta-lactamase-producing strains. *Antimicrob Agents Chemother* **18**, 837-838.
- Tomás, M., Doumith, M., Warner, M., Turton, J. F., Beceiro, A., Bou, G., Livermore, D. M. & Woodford, N. (2010). Efflux pumps, OprD porin, AmpC beta-lactamase, and multiresistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 2219-2224.
- Touchet, S., Carreaux, F., Carboni, B., Bouillon, A. & Boucher, J. L. (2011). Aminoboronic acids and esters: from synthetic challenges to the discovery of unique classes of enzyme inhibitors. *Chem Soc Rev* **40**, 3895-3914.
- Touzé, T., Eswaran, J., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C. & Koronakis, V. (2004). Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system. *Mol Microbiol* **53**, 697-706.
- Trias, J. & Nikaido, H. (1990a). Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 52-57.
- Trias, J. & Nikaido, H. (1990b). Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *J Biol Chem* **265**, 15680-15684.
- Tropel, D. & van der Meer, J. R. (2004). Bacterial transcriptional regulators for degradation pathways of aromatic compounds. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 474-500, table of contents.
- Tsai, M. H., Wu, T. L., Su, L. H., Lo, W. L., Chen, C. L., Liang, Y. H. & Chiu, C. H. (2014). Carbapenem-resistant-only *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients formerly infected by carbapenem-susceptible strains. *Int J Antimicrob Agents* **44**, 541-545.
- Turner, P. J. (2009). MYSTIC Europe 2007: activity of meropenem and other broad-spectrum agents against nosocomial isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* **63**, 217-222.
- Van Bambeke, F., Pagès, J. M. & Lee, V. J. (2006). Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* **1**, 157-175.
- Vasseur, P., Soscia, C., Voulhoux, R. & Filloux, A. (2007). PelC is a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane lipoprotein of the OMA family of proteins involved in exopolysaccharide transport. *Biochimie* **89**, 903-915.

- Vediyappan, G., Borisova, T. & Fralick, J. A. (2006).** Isolation and characterization of VceC gain-of-function mutants that can function with the AcrAB multiple-drug-resistant efflux pump of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**, 3757-3762.
- Vercammen, K., Wei, Q., Charlier, D. & other authors (2015).** *Pseudomonas aeruginosa* LysR PA4203 regulator NmoR acts as a repressor of the PA4202 *nmoA* gene, encoding a nitronate monooxygenase. *J Bacteriol* **197**, 1026-1039.
- Vettoretti, L., Plésiat, P., Muller, C., El Garch, F., Phan, G., Attrée, I., Ducruix, A. & Llanes, C. (2009).** Efflux unbalance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* **53**, 1987-1997.
- Vitko, N. P., Spahich, N. A. & Richardson, A. R. (2015).** Glycolytic dependency of high-level nitric oxide resistance and virulence in *Staphylococcus aureus*. *MBio* **6**.
- Walsh, F. & Amyes, S. G. (2007).** Carbapenem resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Chemother* **19**, 376-381.
- Wang, D., Seeve, C., Pierson, L. S. & Pierson, E. A. (2013).** Transcriptome profiling reveals links between ParS/ParR, MexEF-OprN, and quorum sensing in the regulation of adaptation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Genomics* **14**, 618.
- Westfall, L. W., Carty, N. L., Layland, N., Kuan, P., Colmer-Hamood, J. A. & Hamood, A. N. (2006).** *mvaT* mutation modifies the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux operon *mexEF-oprN*. *FEMS Microbiol Lett* **255**, 247-254.
- Wolter, D. J., Hanson, N. D. & Lister, P. D. (2004a).** Insertional inactivation of *oprD* in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* leading to carbapenem resistance. *FEMS Microbiol Lett* **236**, 137-143.
- Wolter, D. J., Smith-Moland, E., Goering, R. V., Hanson, N. D. & Lister, P. D. (2004b).** Multidrug resistance associated with *mexXY* expression in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Texas hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* **50**, 43-50.
- Wolter, D. J., Acquazzino, D., Goering, R. V., Sammut, P., Khalaf, N. & Hanson, N. D. (2008).** Emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a patient with cystic fibrosis in the absence of carbapenem therapy. *Clin Infect Dis* **46**, e137-141.
- Xavier, D. E., Picão, R. C., Girardello, R., Fehlberg, L. C. & Gales, A. C. (2010).** Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and beta-lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC Microbiol* **10**, 217.
- Xu, Y., Moeller, A., Jun, S. Y., Le, M., Yoon, B. Y., Kim, J. S., Lee, K. & Ha, N. C. (2012).** Assembly and channel opening of outer membrane protein in tripartite drug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *J Biol Chem* **287**, 11740-11750.
- Yamano, Y., Nishikawa, T. & Komatsu, Y. (1993).** Cloning and nucleotide sequence of anaerobically induced porin protein E1 (OprE) of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Mol Microbiol* **8**, 993-1004.

- Yi, M., Wang, P. & Liu, Y. (2014). Molecular typing and resistance mechanisms of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a Chinese surgical intensive care unit. *Chin Med J (Engl)* **127**, 1071-1076.
- Yoneyama, H., Yamano, Y. & Nakae, T. (1995). Role of porins in the antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: construction of mutants with deletions in the multiple porin genes. *Biochem Biophys Res Commun* **213**, 88-95.
- Yoneyama, H., Ocaktan, A., Gotoh, N., Nishino, T. & Nakae, T. (1998). Subunit swapping in the Mex-extrusion pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* **244**, 898-902.
- Zaim, J. & Kierzek, A. M. (2003). The structure of full-length LysR-type transcriptional regulators. Modeling of the full-length OxyR transcription factor dimer. *Nucleic Acids Res* **31**, 1444-1454.
- Zamorano, L., Reeve, T. M., Juan, C., Moyá, B., Cabot, G., Vocado, D. J., Mark, B. L. & Oliver, A. (2011). AmpG inactivation restores susceptibility of pan-beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 1990-1996.
- Zaoui, C., Overhage, J., Löns, D. & other authors (2012). An orphan sensor kinase controls quinolone signal production via MexT in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **83**, 536-547.
- Zgurskaya, H. I. & Nikaido, H. (2000). Cross-linked complex between oligomeric periplasmic lipoprotein AcrA and the inner-membrane-associated multidrug efflux pump AcrB from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**, 4264-4267.
- Zhanel, G. G., Wiebe, R., Dilay, L., Thomson, K., Rubinstein, E., Hoban, D. J., Noreddin, A. M. & Karlowsky, J. A. (2007). Comparative review of the carbapenems. *Drugs* **67**, 1027-1052.