



**HAL**  
open science

# Rôle de l'efflux actif de type RND dans la résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas* sp.

Hélène Puja

## ► To cite this version:

Hélène Puja. Rôle de l'efflux actif de type RND dans la résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas* sp.. Biologie moléculaire. Université Bourgogne Franche-Comté, 2020. Français. NNT : 2020UBFCE004 . tel-03720099

**HAL Id: tel-03720099**

**<https://theses.hal.science/tel-03720099v1>**

Submitted on 11 Jul 2022

**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.



**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE**

**PREPAREE A L'UFR SCIENCES MEDICALES ET PHARMACEUTIQUES**

Ecole doctorale Environnements-Santé n°554

Doctorat de Biochimie et Biologie Moléculaire

Par

**Hélène PUJA**

**Rôle de l'efflux actif de type RND dans la résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas sp.***

---

Thèse présentée et soutenue à Besançon le 9 juillet 2020.

Composition du Jury :

Pr. Sylvie CHEVALIER-LAURENCY  
Dr. Laurent DORTET  
Dr. Sylvie NAZARET  
Dr. Eric HERVOUET  
Pr. Patrick PLÉSIAT  
Pr. Katy JEANNOT

Présidente du Jury  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directrice de thèse



## Remerciements

Ce manuscrit signe l'aboutissement de quatre années de travail et d'investissement. Un projet de thèse est avant tout un travail d'équipe, qui n'aurait pas pu voir le jour sans la contribution de nombreuses personnes qui m'ont entourée, conseillée et guidée et que je souhaiterais remercier.

Je remercie tout d'abord la Région Bourgogne-Franche Comté qui a financé la totalité de ma thèse et m'a accordé sa confiance pour mener ce projet à bien.

Je voudrais remercier sincèrement les Docteurs Laurent Dortet et Sylvie Nazaret d'avoir accepté d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs, pour le temps qu'ils accorderont à la lecture et l'analyse de ce manuscrit, et pour leur participation au jury.

Je remercie également chaleureusement le Professeur Sylvie Chevalier ainsi que le Docteur Eric Hervouet d'avoir accepté d'examiner mon travail et de participer au jury, ainsi que pour votre suivi lors des réunions annuelles du comité de suivi de thèse. Vous avez su vous montrer enthousiastes au sujet de ce projet, et vos conseils et suggestions ont été de précieux atouts.

Je souhaite remercier ma directrice de thèse, le Professeur Katy Jeannot, pour avoir su me guider et m'accompagner tout au long de ce doctorat. Je la remercie pour sa confiance, pour m'avoir choisie pour réaliser ce projet. Enfin, je la remercie également pour nos confrontations d'idées et nos discussions animées, pour tout le temps et l'énergie qu'elle m'a consacrés.

Je remercie également le directeur du laboratoire, le Professeur Patrick Plésiat, d'avoir surveillé ce travail et partagé ses précieuses idées et suggestions. Je le remercie pour ses nombreuses questions pendant les réunions d'équipe, pour m'avoir appris à toujours remettre mes certitudes en cause et à pousser plus loin ma réflexion. Enfin, je le remercie pour son rôle précieux lors de la préparation des articles.

Je remercie le Docteur Anaïs Potron, qui m'a encadrée au cours de mon stage de master et m'a permis de faire mes premiers pas en bactériologie.

Je remercie également très chaleureusement le Docteur Catherine Llanes d'avoir été toujours très présente. Je la remercie d'avoir distribué son énergie sans compter, d'avoir été là non seulement pour partager nos réussites, mais aussi pendant les périodes plus difficiles. Je la remercie enfin pour

son enthousiasme sans limite, et pour avoir su créer un esprit d'équipe et une atmosphère bienveillante au sein du laboratoire.

Je remercie le Professeur Didier Hocquet de m'avoir impliquée dans son travail et de m'avoir fait confiance. Je remercie également le Docteur Benoit Valot d'avoir été toujours disposé à me donner des conseils. Je le remercie particulièrement de m'avoir aidé à organiser mon article, ainsi qu'à analyser mes données.

Je souhaiterais également remercier l'intégralité de mes collègues, qui ont été un soutien et une force quotidienne et ont rendu agréables et joyeuses ces quatre années de travail au laboratoire. Je remercie bien sûr chaleureusement Loïs, qui a été d'une aide inestimable. Je remercie mes co-doctorants : Paulo, qui m'a appris à me débrouiller et qui m'a donné l'envie de faire une thèse en microbiologie par ses talents d'orateur. Arnaud, mon compagnon de galère, nos caractères opposés ne nous ont pas empêcher d'aller au bout de notre collaboration. Alexandre, Mélanie, merci pour la bonne humeur et les nombreuses discussions initiées dans le bureau. Je remercie également toute l'équipe hospitalière : Elenie, Pauline, Maxime, Damien, Jean-Baptiste. Je remercie toute l'équipe de parasitologie : Steffi, Adeline, Alice, Audrey, Chloé, Malik, Coralie, Clothilde, Sandra, ce fut un vrai plaisir de partager mon quotidien avec vous et je vous remercie sincèrement pour la bonne ambiance qui a régné au laboratoire toutes ces années.

Je remercie le Professeur Juan Luis Ramos de m'avoir accueillie si chaleureusement au sein de son laboratoire, et de m'avoir apporté son expertise sur l'efflux chez *P. putida*.

Je remercie également tous les stagiaires qui ont participé à ce projet de thèse : Camille, Thomas, Gwendoline, Sophie, vous avez tous permis de faire avancer ce travail et je vous en remercie chaleureusement.

Enfin, je remercie ma famille qui m'a soutenue à chaque instant et m'a écouté parler sans cesse de ma thèse. Je remercie ma compagne, qui m'a soutenue chaque jour, chaque soir, malgré la fatigue, les instabilités émotionnelles et les crises de panique. Elle a été mon pilier et cette thèse n'aurait pas pu aboutir sans elle.

# Table des matières

Liste des figures.....	iv
Liste des tableaux .....	vi
Liste des abréviations.....	vii
<b>I. Synthèse bibliographique.....</b>	<b>1</b>
1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>Pseudomonas putida</i> : points communs et divergences.....	2
1.1 Le genre <i>Pseudomonas</i> .....	2
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et <i>P. putida</i> .....	6
1.3 Pathogénicité de <i>P. aeruginosa</i> et <i>P. putida</i> .....	6
2 La résistance aux antibiotiques chez <i>P. aeruginosa</i> et <i>P. putida</i> .....	13
2.1 Résistance naturelle aux antibiotiques .....	13
2.2 Résistance acquise aux antibiotiques.....	16
3 Les systèmes d'efflux actif.....	18
3.1 Généralités.....	18
3.2 Structure des systèmes RND .....	25
3.2.1 Le transporteur RND .....	28
3.2.2 La protéine adaptatrice .....	30
3.2.3 La protéine de membrane externe .....	30
3.3 Les systèmes RND chez <i>P. putida</i> .....	32
3.3.1 Généralités .....	32
3.3.2 Le système TtgABC .....	40
3.4 L'efflux actif chez <i>P. aeruginosa</i> .....	43
3.4.1 Les systèmes RND de <i>P. aeruginosa</i> .....	43
3.4.2 Le système MexXY(OprM).....	51
3.4.2.1 Substrats de MexXY(OprM).....	51
3.4.2.2 Régulation de l'opéron <i>mexXY</i> .....	58
3.4.2.3 La pompe MexXY(OprM) chez les souches cliniques de <i>P. aeruginosa</i> .....	64
3.5 Le système à deux composant ParRS .....	66
4 Mécanismes de résistance aux polymyxines .....	72
4.1 Structure des polymyxines .....	72
4.2 Structure de la paroi d'une bactérie à Gram négatif.....	73
4.3 Mode d'action des polymyxines.....	77
4.4 Mécanismes de résistance aux polymyxines chez <i>P. aeruginosa</i> .....	78
<b>II. Résultats.....</b>	<b>86</b>
1 La pompe d'efflux MexXY/OprM est impliquée dans la tolérance et la résistance acquise à la colistine chez <i>P. aeruginosa</i> .....	87
1.1 Contexte.....	87

1.2	Objectifs de l'étude.....	87
1.3	Résultats publiés.....	88
1.3.1	Article.....	88
1.3.2	Matériel supplémentaire de l'article.....	118
1.4	Résultats complémentaires.....	123
1.4.1	Rôle des S2C dans l'induction de l'opéron <i>arn</i> en présence de colistine.....	123
1.4.2	Impact de la délétion des opérons <i>arn</i> et <i>mexXY</i> sur la perméabilité membranaire.....	124
1.4.3	Implication d'une seconde voie de protection : la voie AlgU.....	126
1.4.4	Rôle du PQS dans la réponse à la colistine.....	129
1.5	Conclusions.....	131
2	Caractérisation d'un nouveau système d'efflux de la famille RND impliqué dans l'efflux des aminosides chez <i>P. putida</i> .....	134
2.1	Contexte.....	134
2.2	Objectifs de l'étude.....	135
2.3	Résultats publiés.....	136
2.3.1	Article en préparation.....	136
2.3.2	Matériel supplémentaire de l'article.....	167
2.4	Résultats complémentaires.....	172
2.4.1	Implication de la pompe ParXY dans l'efflux des solvants organiques.....	172
2.4.2	Mesure de la croissance des différents mutants sélectionnés <i>in vitro</i> .....	174
2.4.3	Caractérisation d'une collection de souches cliniques de <i>P. putida</i> résistantes à la ticarcilline.....	176
2.5	Conclusions.....	185
<b>III. Discussion et perspectives.....</b>		<b>189</b>
Implication de la pompe MexXY(OprM) dans la résistance à la colistine.....		190
Les systèmes d'efflux actif chez <i>P. putida</i> .....		199
<b>IV. Matériel et méthodes.....</b>		<b>208</b>
1	Techniques de microbiologie.....	209
1.1	Souches bactériennes et plasmides.....	209
1.2	Milieux de culture.....	214
1.3	Sélection des mutants de <i>P. putida</i> résistants à la ticarcilline.....	214
1.4	Détermination de la sensibilité aux antibiotiques.....	215
1.4.1	Antibiogrammes.....	215
1.4.2	Détermination de la CMI des antibiotiques.....	215
1.5	Mesure de la croissance bactérienne.....	215
1.6	Mesure de l'effet bactéricide de la colistine.....	216
1.6.1	Corrélation entre la luminescence et la numération bactérienne.....	216

1.6.2	Mesure de l'effet bactéricide.....	216
1.6.3	Mesure de la perméabilité membranaire.....	218
2	Techniques de biologie moléculaire.....	218
2.1	Extraction d'acides nucléiques.....	218
2.1.1	Extraction d'ADN génomique.....	218
2.1.2	Extraction d'ADN plasmidique.....	219
2.2	Amplification d'ADN par PCR.....	219
2.3	Electrophorèse en gel d'agarose.....	225
2.4	Purification des fragments d'ADN.....	225
2.5	Techniques de clonage.....	225
2.5.1	Hydrolyse de l'ADN par des endonucléases de restriction.....	225
2.5.2	Ligature des fragments d'ADN.....	226
2.6	Transformation bactérienne.....	226
2.6.1	Transformation par choc thermique.....	226
2.6.2	Transformation par électroporation.....	227
2.6.3	Conjugaison bactérienne.....	227
2.7	Technique d'inactivation génique ou de remplacement allélique.....	228
2.8	Mutagenèse dirigée du gène <i>ttgR</i> chez <i>P. putida</i> .....	230
2.9	Séquençage de l'ADN.....	230
2.9.1	Séquençage par la méthode Sanger.....	230
2.9.2	Identification des substitutions géniques (SNP) dans le mutant HPG-5.....	230
2.10	Extraction des ARN totaux et rétro-transcription.....	231
2.11	Quantification des ARNm par RT-qPCR.....	231
<b>V.</b>	<b>Annexes.....</b>	<b>232</b>
<b>VI.</b>	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>247</b>



## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Représentation phylogénétique des groupes d'espèces du genre <i>Pseudomonas</i> .....	4
<b>Figure 2.</b> Habitats et fonctions biologiques des différentes espèces du genre <i>Pseudomonas</i> ..	5
<b>Figure 3.</b> Représentation schématique des différentes familles de transporteurs actif bactériens.....	20
<b>Figure 4.</b> Structure tripartite tridimensionnelle de la pompe d'efflux AcrAB-TolC chez <i>E. coli</i> .....	26
<b>Figure 5.</b> Structure tridimensionnelle de MexAB-OprM chez <i>P. aeruginosa</i> .....	27
<b>Figure 6.</b> Représentation et structure tridimensionnelle des différents domaines d'un protomère d'AcrB.....	29
<b>Figure 7.</b> Mécanisme rotatoire d'ouverture des pompes d'efflux de la famille RND.....	31
<b>Figure 8.</b> Structure schématique des protéines OprM (gauche) et TolC (droite).....	33
<b>Figure 9.</b> Structure-fonction du répresseur TtgR.....	42
<b>Figure 10.</b> Comparaison des environnements géniques des gènes codant pour les systèmes d'efflux RND chez <i>P. aeruginosa</i> et <i>P. putida</i> .....	53
<b>Figure 11.</b> Localisation des mutations impactant la résistance aux antibiotiques au sein d'un monomère de MexY.....	57
<b>Figure 12.</b> Régulation de l'opéron <i>mexXY</i> chez la souche PAO1.....	59
<b>Figure 13.</b> Structure en 3D du dimère de MexZ.....	60
<b>Figure 14.</b> Structure schématique d'un système à deux composants classique.....	67
<b>Figure 15.</b> Structure secondaire de la polymyxine B.....	74
<b>Figure 16.</b> Représentation schématique des membranes d'une bactérie à Gram négatif.....	76
<b>Figure 17.</b> Structures possibles du lipide A de <i>P. aeruginosa</i> .....	76
<b>Figure 18.</b> Schéma représentant les mécanismes de résistance aux polymyxines chez <i>P. aeruginosa</i> .....	79
<b>Figure 19.</b> Effet de la colistine sur les niveaux d'expression de différents gènes.....	125

<b>Figure 20.</b> Mesure de la perméabilité membranaire chez la souche PAO1 et ses mutants dérivés.....	125
<b>Figure 21.</b> Effet de la colistine sur les niveaux d'expression de différents gènes.....	127
<b>Figure 22.</b> Effet bactéricide de la colistine sur PAO1 et ses mutants dérivés.....	127
<b>Figure 23.</b> Implication du PQS dans la réponse à la colistine chez la souche PAO1.....	130
<b>Figure 24.</b> Trois voies impliquées dans la tolérance à la colistine chez <i>P. aeruginosa</i> .....	133
<b>Figure 25.</b> Rôle des pompes TtgABC et ParXY(TtgC) dans l'efflux du toluène et de l'octane.....	173
<b>Figure 26.</b> Mesure de la croissance bactérienne en milieu riche de la souche KT2440 de <i>P. putida</i> et de ses mutants dérivés .....	175
<b>Figure 27.</b> Mesure des niveaux de transcrits des gènes <i>ttgA</i> et <i>parX</i> chez une collection de 66 souches cliniques de <i>P. putida</i> .....	177
<b>Figure 28.</b> Distribution des souches en fonction de leurs niveaux d'expression des gènes <i>ttgA</i> (en abscisse) et <i>parX</i> (en ordonnée).....	178
<b>Figure 29.</b> Séquençage de la région intergénique <i>ttgA-ttgR</i> .....	181
<b>Figure 30.</b> Niveaux de transcrits des gènes PP_3453 (A) et PP_3454 (B) dans les souches cliniques surexprimant les gènes <i>parX</i> et <i>ttgA</i> .....	184
<b>Figure 31.</b> Schéma de la voie d'activation des pompes TtgABC et ParXY chez le mutant sélectionné <i>in vitro</i> HPG-5 et la souche clinique 16-3979.....	187
<b>Figure 32.</b> Représentation du cycle de Krebs et du shunt du glyoxylate.....	205
<b>Figure 33.</b> Corrélation entre les unités relatives de luminescence (RLU) et le dénombrement bactérien (UFC/mL).....	217
<b>Figure 34.</b> Représentation schématique des étapes de l'inactivation génique.....	229

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Liste des cas d'infections à <i>P. putida</i> reportées dans la littérature depuis l'année 2000.....	10
<b>Tableau 2.</b> Enzymes inactivatrices et modificatrices d'antibiotiques codées dans les chromosomes des souches PAO1 de <i>P. aeruginosa</i> et KT2440 de <i>P. putida</i> .....	15
<b>Tableau 3.</b> Distribution des protéines impliquées dans le transport actif chez les souches <i>P. aeruginosa</i> PAO1 et <i>P. putida</i> KT2440.....	24
<b>Tableau 4.</b> Comparaison des systèmes RND codés par les génomes de 4 souches de référence de <i>P. putida</i> et la souche de référence PAO1 de <i>P. aeruginosa</i> .....	35
<b>Tableau 5.</b> Classification des pompes RND de <i>P. putida</i> KT2440.....	36
<b>Tableau 6.</b> Liste des pompes d'efflux de la famille RND chez la souche de <i>P. aeruginosa</i> , PAO1.....	44
<b>Tableau 7.</b> Identité en acides aminés entre les protéines des systèmes RND homologues chez les souches PAO1 de <i>P. aeruginosa</i> et KT2440 de <i>P. putida</i> .....	52
<b>Tableau 8.</b> Liste des gènes sous la dépendance du système à deux composants ParRS.....	69
<b>Tableau 9.</b> Substitutions d'acide aminés dans la protéine TtgR identifiées chez les souches cliniques .....	180
<b>Tableau 10.</b> Liste des souches utilisées.....	209
<b>Tableau 11.</b> Liste des plasmides utilisés.....	212
<b>Tableau 12.</b> Liste des amorces utilisées chez <i>P. aeruginosa</i> .....	220
<b>Tableau 13.</b> Liste des amorces utilisées chez <i>P. putida</i> .....	222

## Liste des abréviations

**Å** : Angstrom

**A<sub>600</sub>** : Absorbance à 600 nm.

**AAC** : Aminoside acétyl-transférase

**ABC** : ATP binding cassette

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ADNc** : ADN complémentaire

**agrW** : *Aminoglycoside resistant with wild-type mexZ gene*

**agrZ** : *Aminoglycoside resistant depending on gene mexZ*

**AKN** : Amikacine

**AMP** : Ampicilline

**AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique

**APH** : Aminoside phospho-transférase

**Ara4N** : 4-amino-4-désoxy-L-arabinose

**arn** : opéron *arnBCADTEF-ugd*

**ARN** : Acide ribonucléique

**ARNm** : ARN messenger

**ARNr** : ARN ribosomal

**ATM** : Aztréonam

**ATP** : Adénosine triphosphate

**AZY** : Azithromycine

**BLSE** :  $\beta$ -lactamase à spectre étendu

**BMP** : Biapénème

**BTEX** : Benzène, toluène, éthylbenzène et xylènes

**CAZ** : Ceftazidime

**CDS** : Séquence codante

**CF** : Cystic Fibrosis (mucoviscidose)

**ChIP** : Chromatine immune-précipitation

**CHL** : Chloramphénicol

**CIP** : Ciprofloxacine

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice

**CMS** : Colistine méthane sulfonate

**CRB** : Carbénicilline

**CRO** : Ceftriaxone

**CTD** : Domaine C-terminal

**CTX** : Céfotaxime

**Da** : Dalton

**DMT** : *Drug/metabolite transporter*

**DOR** : Doripénème

**DOX** : Doxycycline

**DSF** : Facteur signal diffusible

**ERY** : Erythromycine

**FD** : *Funnel domain*

**FEP** : Céfépime

**FMT** : Méthionyl-tRNA formyltransférase

**GAT** : Gatifloxacine

**GMN** : Gentamicine

**HK** : Histidine kinase

**ICE** : *Integrative Conjugative Elements*

**IPM** : Imipénème

**Kb** : Kilobases ( $10^3$  bases)

**KMN** : Kanamycine

**LCS** : Liquide cérébro-spinal

**LP** : Peptide leader **LPNSN** : *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature*

**LPS** : Lipopolysaccharide

**LVX** : Lévofloxacine

**MATE** : *Multidrug and toxic compound extrusion*

**Mbases/ Mb** : Méga-bases ( $10^6$  bases)

**MBL** : Métallo- $\beta$ -lactamase

**McF** : MacFarland

**MDR** : Multi-résistante

**MEM** : Méropénème

**MFS** : *Major Facilitator Superfamily*

**MH** : Milieu Mueller-Hinton

**MHc** : Milieu Mueller-Hinton calibré en cations divalents  
**MIN** : Minocycline  
**MLSA** : *Multi-Locus Sequence Analysis*  
**MOP** : *Multidrug/oligosaccharidyl-lipid/polysaccharide flippase superfamily*  
**NADH** : Nicotinamide adenine dinucleotide réduit  
**NBD** : *Nucleotide binding domain*  
**NLM** : Nétilmicine  
**NOR** : Norfloxacin  
**NPN** : 1-N-phénylnaphtylamine  
**NTD** : Domaine N-terminal  
**PAM** : Peptides antimicrobiens  
**Pb** : paire de bases  
**PCR** : *Polymerase chain reaction*  
**PD** : *Porter domain*  
**PDR** : Pan-résistante  
**PIP** : Pipéracilline  
**PLP** : Phospholipase  
**PMF** : Force proton-motrice  
**PQS** : *Pseudomonas Quinolone Signal*  
**RIF** : Rifampicine

**RLU** : Unités relatives de luminescence  
**RND** : *Resistance, nodulation, cell division*  
**ROS** : Espèces réactives de l'oxygène  
**Rpm** : Rotation par minute  
**RR** : Régulateur de réponse  
**RTq-PCR** : PCR quantitative en temps réel  
**S** : Svedberg  
**S2C** : Système à deux composants  
**SMR** : *Small Multidrug Resistance*  
**SPX** : Sparfloxacin  
**ST** : *Sequence Type*  
**STR** : Streptomycine  
**T3SS** : Système de sécrétion de type 3  
**TET** : Tétracycline  
**TGC** : Tigécyline  
**TIC** : Ticarcilline  
**TMD** : *Transmembrane domain*  
**TMN** : Tobramycine  
**TNT** : 2,4,6-trinitrotoluène  
**UFC/mL** : Unité formant colonie par mL  
**XDR** : Extensivement résistante

# I. Synthèse bibliographique

---

# 1 *Pseudomonas aeruginosa* et *Pseudomonas putida* : points communs et divergences.

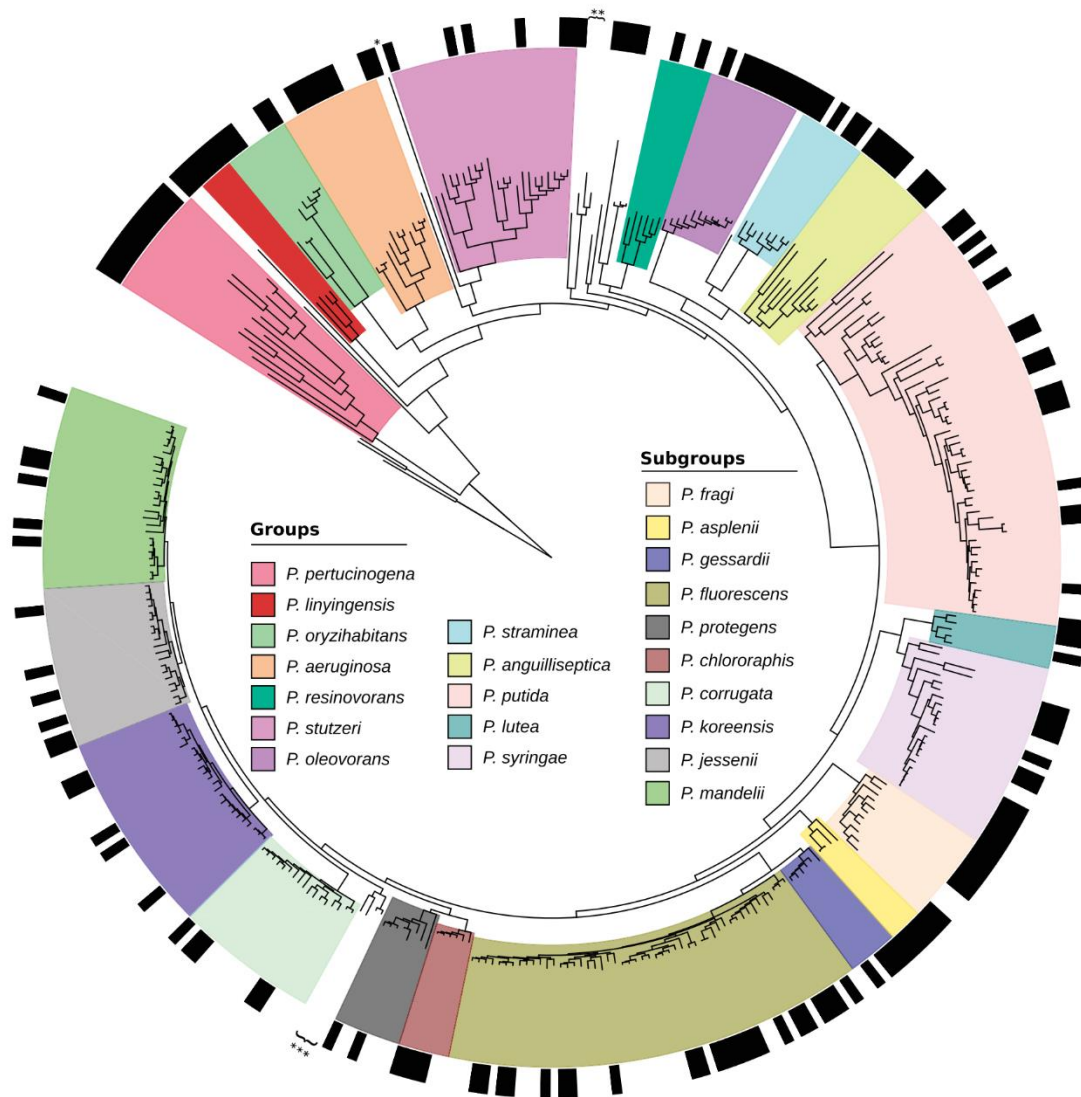
## 1.1 Le genre *Pseudomonas*

Le genre *Pseudomonas* comprend le plus grand nombre d'espèces parmi les bactéries à Gram négatif. En 2015, 144 espèces étaient recensées (Gomila *et al.*, 2015). Ce nombre est en constante augmentation en raison de l'évolution des techniques d'identification. En 2018, une revue de Peix et ses collaborateurs a dénombré un total de 207 espèces de *Pseudomonas*, soit 63 espèces ajoutées en seulement 3 ans (Peix *et al.*, 2018). La liste complète des espèces du genre *Pseudomonas* est mise à jour dans la base de données *List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature* (LPNSN) (Parte, 2014). Le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S a longtemps été utilisé pour classer les espèces bactériennes. Cependant, il est peu discriminant pour les espèces phylogénétiquement très proches. L'analyse *Multi-Locus Sequence Analysis* (MLSA) de trois gènes de ménage (*gyrB*, *rpoB* et *rpoD*) combinée à celle de l'ARNr 16S est définie comme la méthode la plus pertinente pour la classification des espèces de *Pseudomonas* (Mulet *et al.*, 2012). Aujourd'hui, les séquences complètes des génomes bactériens sont comparées entre elles, permettant de définir le *core* génome et le génome accessoire d'une espèce. La classification actuelle des *Pseudomonas*, basée sur l'alignement de 100 séquences protéiques issues de 355 souches de *Pseudomonas*, dont 166 souches de référence, permet l'identification de 13 groupes phylogénétiques, dont le groupe *P. fluorescens* lui-même divisé en 10 sous-groupes (Figure 1) (Hesse *et al.*, 2018). Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont capables de coloniser une grande variété d'environnements et de s'adapter à de nombreuses conditions

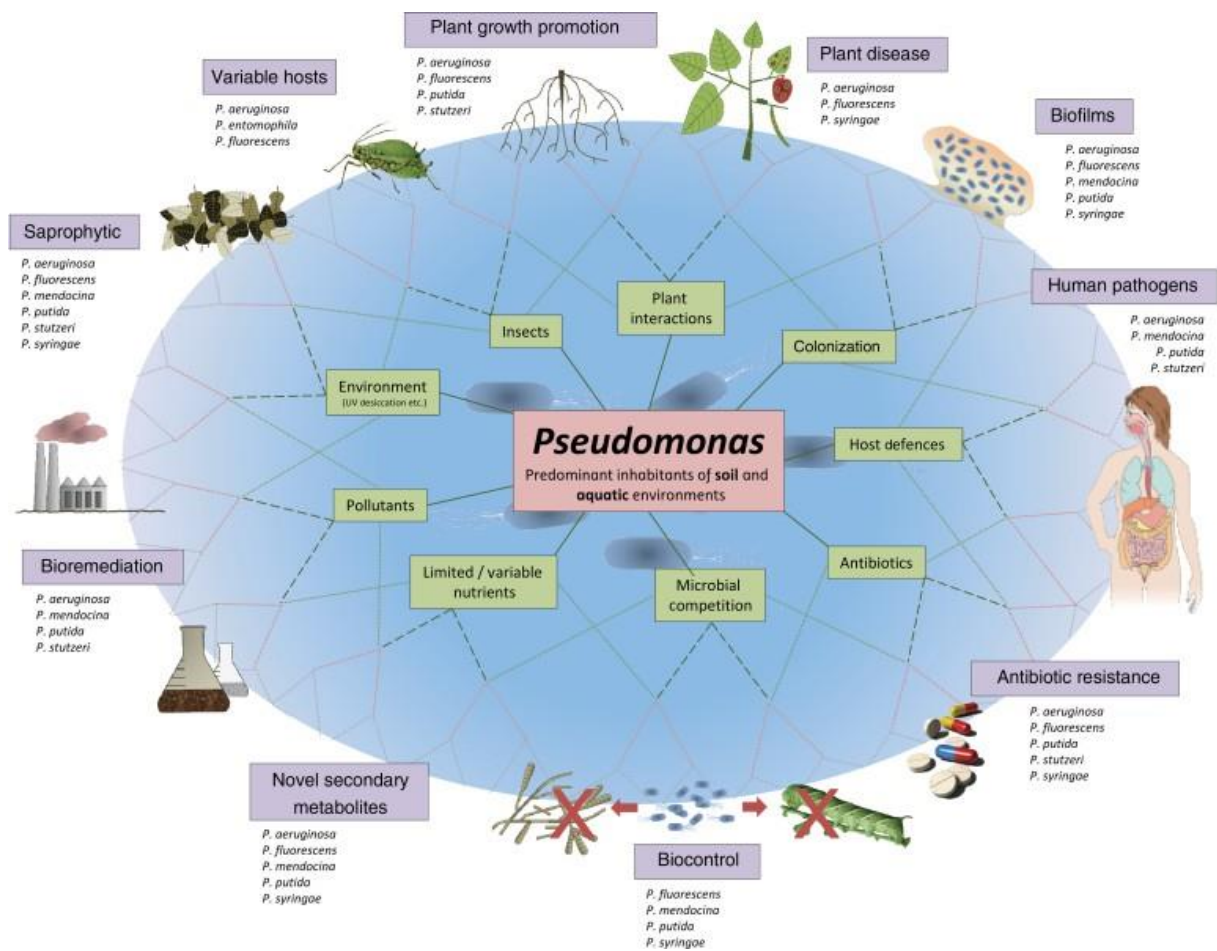
environnementales. En effet, des *Pseudomonas* ont été isolés dans des milieux aussi différents que des sols forestiers (Wu *et al.*, 2014), le sable d'un désert en Chine (Liu *et al.*, 2009), la rhizosphère d'un jardin japonais (Nelson *et al.*, 2002) ou encore des sols contaminés par du pétrole en Russie (Korshunova *et al.*, 2016). Les fonctions biologiques des *Pseudomonas* sont également très variées (Figure 2). Ces bactéries peuvent participer à la croissance des plantes (comme *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*) (Ryan *et al.*, 2008a) (Uzair *et al.*, 2018), ou au contraire être phytopathogènes (*P. syringae* en étant l'exemple-type). Certaines peuvent coloniser des insectes ou produire des insecticides, comme *P. fluorescens*, qui protège les plantes de leur environnement (Péchy-Tarr *et al.*, 2008). De plus, la versatilité métabolique très riche des *Pseudomonas* leur permet de dégrader de nombreux composés, dont certains sont toxiques. *Pseudomonas putida* est l'espèce la mieux adaptée à ces environnements contaminés et de nombreuses études ont montré ses capacités de bioremédiation, permettant de décontaminer des environnements pollués par des molécules aromatiques toxiques (Loh and Cao, 2008) (Gong *et al.*, 2018) (Samin *et al.*, 2014).

Ce travail de thèse s'intéresse plus particulièrement à *Pseudomonas putida* et à *Pseudomonas aeruginosa*, deux espèces proches connues pour leur capacité commune à acquérir des mécanismes de résistance aux antibiotiques. Bien que *P. aeruginosa* soit plus fréquemment responsable d'infections (ou colonisations) chez l'Homme, *P. putida* est régulièrement identifié dans des prélèvements cliniques et considéré comme pathogène opportuniste.





**Figure 1. Représentation phylogénétique des groupes d'espèces du genre *Pseudomonas*.** La figure a été obtenue par l'alignement de 100 séquences protéiques issues de 355 souches de *Pseudomonas*, dont 166 souches de référence. Trois génomes de *Cellvibrio spp.* ont été ajoutés pour ancrer les différents groupes. Les couleurs désignent les différents groupes d'espèces de *Pseudomonas* et les sous-groupes du groupe *P. fluorescens*. D'après Hesse et al, 2018.



**Figure 2. Habitats et fonctions biologiques des différentes espèces du genre *Pseudomonas*.** Les niches écologiques des différentes espèces de *Pseudomonas* sont très diverses : les sols, même pollués, les insectes, les plantes, l'Homme, les animaux et les milieux aquatiques. Les fonctions biologiques imputées aux différentes espèces de *Pseudomonas* sont représentées à l'extérieur du schéma. D'après Silby *et al*, 2011.

## **1.2 *Pseudomonas aeruginosa* et *P. putida***

La comparaison des génomes des souches de référence PAO1 de *P. aeruginosa* et KT2440 de *P. putida* indique que 85% des séquences codantes (CDS) sont similaires (Nelson et al., 2002). Bien que ces deux espèces soient proches génétiquement, leur pathogénicité diffère. Contrairement à *P. aeruginosa*, *P. putida* est considéré comme peu virulent. En effet, plusieurs gènes codant pour des facteurs de virulence chez *P. aeruginosa* sont absents du génome de *P. putida* tels que ceux déterminant le système de sécrétion de type III (T3SS), l'exotoxine A, la protéase alcaline, l'élastase, les rhamnolipides, l'exolipase ou encore la phospholipase C (Silby et al., 2011)(Lee et al., 2006). Le génome de la souche KT2440 possède, quant à lui, 350 gènes codant pour des transporteurs localisés dans la membrane externe ou la membrane cytoplasmique, permettant l'influx et/ou l'efflux de substrats (304 seulement chez *P. aeruginosa*), en fonction des conditions environnementales.

## **1.3 Pathogénicité de *P. aeruginosa* et *P. putida***

*P. aeruginosa* est l'exemple-type des agents opportunistes responsables d'infections nosocomiales (Gellatly and Hancock, 2013). Cette bactérie a été classée en 2017 par l'Organisation Mondiale de la Santé parmi les espèces dites « critiques », du fait de la capacité de certaines souches épidémiques à accumuler des mécanismes de résistance aux antibiotiques (Tacconelli et al., 2018). La prévalence des souches multi-résistantes (MDR) (résistantes à au moins une molécule appartenant à trois classes d'antibiotiques différentes) et des souches Extensivement-résistantes (XDR) (résistantes à l'ensemble des antibiotiques disponibles sauf tout au plus deux molécules appartenant à deux classes d'antibiotiques différentes) est en constante augmentation (Magiorakos et al., 2012). Des études

épidémiologiques récentes rapportent l'isolement de plus en plus fréquent de souches MDR et XDR dans les hôpitaux, notamment en Iran (Saderi and Owlia, 2015), en Grèce (Samonis *et al.*, 2014), en Thaïlande (Palavutitotai *et al.*, 2018) et en Espagne (Cabot *et al.*, 2012). Une enquête multicentrique réalisée en Espagne dans 51 hôpitaux a montré que 26% des isolats de *P. aeruginosa*, tous types de prélèvements confondus, étaient MDR et 17% étaient XDR. Certaines souches n'étaient plus sensibles qu'à la colistine (del Barrio-Tofiño *et al.*, 2019). Il est à noter que des souches sensibles uniquement à la colistine voire résistantes à la totalité des antibiotiques disponibles (*pan-drug resistant* : PDR) sont décrites régulièrement dans divers pays (Souli *et al.*, 2008).

Un travail sur la clonalité des souches de *P. aeruginosa* isolées dans le cadre d'infections nosocomiales a montré qu'il existe une forte diversité génotypique parmi les souches sensibles aux antibiotiques. En effet, la plupart de ces isolats possèdent un *Sequence Type* (ST) unique suggérant une origine environnementale. Toutefois, plus le nombre des résistances acquises augmente, plus cette diversité décroît. Ainsi, la plupart des souches MDR et XDR appartiennent-elles à quelques ST appelés *high-risk clones* adaptés à l'Homme et à l'environnement hospitalier (par exemple, ST111, ST175 et ST235) (Cabot *et al.*, 2012) (Oliver *et al.*, 2015). Les complexes clonaux ST235 et ST111 affichent une distribution globale ; le complexe ST175 est, quant à lui, présent surtout en Europe (Horcajada *et al.*, 2019). D'autres clones épidémiques ont été décrits dans un nombre plus ou moins grand de pays (ST244, ST277, ST308, ST395) (Treepong *et al.*, 2018) (Chen *et al.*, 2014) (Petitjean *et al.*, 2017). Tous ont cependant pour caractéristique de pouvoir accumuler divers mécanismes de résistance aux antibiotiques par le biais d'échanges génétiques horizontaux, notamment des gènes codant pour des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) ou des

métallo- $\beta$ -lactamases (Oliver *et al.*, 2015). Par ailleurs, la présence chez le clone ST235 d'un déterminant impliqué, semble-t-il, dans la recombinaison homologue, DprA, pourrait expliquer la capacité de ce clone à intégrer plus facilement dans son génome des fragments d'ADN provenant d'autres souches ou espèces bactériennes (Treepong *et al.*, 2018). Quant à la pathogénicité des clones épidémiques, les études réalisées ne permettent pas de tirer des conclusions définitives quant à leur virulence. Un travail publié en 2016 a comparé la cytotoxicité, l'invasivité et la croissance de souches cliniques de *P. aeruginosa* sensibles et résistantes (MDR) aux antibiotiques. Avec le modèle d'infection utilisé, les souches sensibles ont montré une meilleure croissance intrapéritonéale et une capacité à tuer les souris bien supérieures aux bactéries MDR (70% *versus* 7,5% de mortalité à 48h). Parmi les souches MDR, seules celles appartenant au complexe clonal ST235 se sont avérées capables d'entraîner une mortalité du fait, probablement, de la production d'exotoxine ExoU. Il semble donc que, d'une façon générale, l'accumulation de mécanismes de résistance tend à diminuer la pathogénicité de *P. aeruginosa* (Gómez-Zorrilla *et al.*, 2016). Toutefois, des différences importantes sont constatées entre les clones épidémiques. L'utilisation d'un autre modèle d'infection tel que *Caenorhabditis elegans* fait apparaître des écarts importants entre la mortalité élevée associée aux clones ST235 et ST111, et la faible virulence du clone ST175 (Sánchez-Diener *et al.*, 2017). Une autre étude a évalué huit paramètres biologiques potentiellement impliqués dans la virulence de *P. aeruginosa* : la mobilité par twitching, swimming et swarming, la formation de biofilm, la production de pyoverdine et de pyocyanine, la fréquence de mutations spontanées et l'index de compétitivité *in vitro*. Il en ressort que les clones épidémiques auraient des taux de mutation et une capacité à former du biofilm supérieurs à ceux de clones sporadiques sensibles, mais

des déficits dans la mobilité et la vitalité (*fitness*) (Mulet *et al.*, 2013). Les facteurs contribuant à la diffusion et au succès des clones épidémiques restent donc encore à élucider (Horcajada *et al.*, 2019).

*Pseudomonas putida* est rarement isolé de prélèvements cliniques. Toutefois, certaines souches sont responsables d'infections comme des bactériémies, des méningites ou encore des infections urinaires, principalement chez des patients dont l'immunité est fortement affaiblie (Kim *et al.*, 2012) (Huang *et al.*, 2018). Le Tableau 1 propose une synthèse de la littérature sur les infections et colonisations impliquant *P. putida* au cours des deux dernières décennies. La mortalité associée aux bactériémies à *P. putida* bien que faible (Korcova *et al.*, 2005) (Yoshino *et al.*, 2011) (Kim *et al.*, 2012) n'est toutefois pas à négliger.

Plusieurs épidémies à *P. putida* ont également été décrites dans des services de réanimation ou de néonatalité, dont la majorité a été associée à une contamination de points d'eau au sein des services concernés (Liu *et al.*, 2014) (Perz *et al.*, 2005) (Bouallègue *et al.*, 2004) (Souza Dias *et al.*, 2008). Parmi les souches responsables d'infections, plusieurs ont acquis des mécanismes de résistance aux antibiotiques et sont considérées comme MDR ou XDR. En effet, la littérature rapporte plusieurs souches de *P. putida* productrices de  $\beta$ -lactamases, et plus particulièrement de métallob- $\beta$ -lactamases (MBL) (Peter *et al.*, 2017). Les MBL sont des métallo-enzymes zinc-dépendantes capables d'hydrolyser de nombreuses  $\beta$ -lactamines, y compris les carbapénèmes qui sont des antibiotiques de dernière ligne.

**Tableau 1. Liste des cas d'infections à *P. putida* rapportées dans la littérature depuis l'année 2000.** Les souches ont été classées par article, du plus récent au plus ancien. LCS : liquide céphalo-spinal. PIP : pipéracilline; ATM : aztréonam; CAZ : ceftazidime; FEP : céfépime; AMP : ampicilline; IPM : imipénème; MEM : méropénème; AKN : amikacine; GMN : gentamicine; TMN : tobramycine; CIP : ciprofloxacine; LVX : lévofloxacine; CTX : céfotaxime; TET : tétracycline; CHL : chloramphénicol; ERY : érythromycine; AZY : azithromycine; RIF : rifampicine; TIC : ticarcilline; CRB : carbénicilline; CRO : ceftriaxone; DOR : doripénème; DOX : doxycycline; MIN : minocycline; TGC : tigécycline; NLM : nétilmicine; GAT : gatifloxacine; NOR : norfloxacine; SPX : sparfloxacine; BMP : biapénème; KMN : kanamycine; STR : streptomycine.

Référence	Nombre de souches	Site de prélèvement	Résistances aux antibiotiques	Mécanismes identifiés
(Ogura et al., 2019)	1	Urine	N.D.	
	1	Sang	N.D.	
	86	Poumon (2) Urine (16) Pus (12) Sang (2) LCS (1)	N.D.	
(Chen et al., 2019)	1	Urine	PIP, ATM, CAZ, FEP, AMP, IPM, MEM, AKN, GMN, TMN, CIP, LVX	<i>qnrVC6</i> (2 copies)
(Liapis et al., 2019)	2	Selles (1) Prélèvement rectal (1)	TIC, ATM, CAZ, FEP, IPM, MEM, CIP, TMN, AKN	<i>bla<sub>IMP-63</sub></i> , <i>aacA4-28</i> , <i>bla<sub>OXA-19</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-35</sub></i> , <i>qacEΔ1</i>
(Hong et al., 2018)	13	Urine	MEM, CAZ, ATM, IPM, AKN, CIP	
(Yuan et al., 2017)	1	LCS	PIP, CAZ, FEP, CTX, IPM, MEM, GMN, AKN, TET, CIP, LVX, CHL, ERY, AZY, RIF	<i>bla<sub>IMP-45</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-1</sub></i> , <i>armA</i>
(Holmgaard et al., 2017)	1	Urine	AMP, TIC, PIP, CRB, CRO, CTX, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, DOR, CIP, LVX, DOX, MIN, TGC	<i>bla<sub>IMP-58</sub></i>
(Sun et al., 2016)	1	Poumon	AMP, PIP, CRO, CAZ, IPM, MEM, CIP, LVX	<i>bla<sub>DIM-2</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-4</sub></i>

(Bhattacharya et al., 2015)	1	Selles	AMP, PIP, CAZ, CRO, FEP, IPM, MEM, AKN, GMN, TMN, CIP, LVX, TET, TGC	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , GyrA (T83I, S136A), GyrB (E469D), ParC (T105P, V124A, S136A), <i>qepA</i> , <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-7</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub>
(Gilarranz et al., 2013)	3	Urine	IPM, MEM, CAZ, FEP, ATM, PIP, AKN, TMN, CIP	<i>bla</i> <sub>IMP-15</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>
(Rossolini et al., 2008)	1	Urine	PIP, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM	<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>
(Yoshino et al., 2011)	5	Sang	CAZ, CTX, ATM, MEM, IPM	N.D.
(Lee et al., 2009a)	12	Urine Poumon	PIP, CAZ, CTX, ATM, IPM, MEM, GMN, AKN, TMN, CIP	<i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> , <i>bla</i> <sub>IMP-1</sub>
(Bogaerts et al., 2008)	10	Urine (9) Poumon (1)	IPM, MEM, CAZ, ATM, AKN, CIP	<i>aacA4</i> , <i>bla</i> <sub>VIM-4</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM-2</sub> , <i>bla</i> <sub>PER-1</sub>
(Carpenter et al., 2008)	1	Pus	ATM	N.D.
(Almuzara et al., 2007)	2	Urine (1) Poumon (1)	IPM, MEM, PIP, CAZ, FEP, ATM, GMN, AKN, CIP, LVX	<i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>
(Mendes et al., 2007)	1	Sang	ATM, AMP, CAZ, PIP, TIC, FEP, IPM, MEM, AKN, GMN, TMN, NLM, LVX, GAT, CIP	<i>bla</i> <sub>IMP-1</sub> , <i>aac(6')</i> -31, <i>aadA1</i>
(Fielt et al., 2006)	1	Urine	TIC, PIP, CTX, CAZ, FEP, ATM, IPM, MEM, GMN, TMN, CIP	<i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>
(Poirel et al., 2006)	1	Sang	TIC, PIP, CAZ, CTX, FEP, ATM, IPM, MEM	<i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>
(Horii et al., 2005)	5	Urine	NOR, LVX, SPX, GAT, IPM, PMP, MEM, BMP	<i>bla</i> <sub>IMP-1</sub> ; GyrA (T83I, S136A), GyrB (E469D), ParC (T105P, V124A, S136A)
(Chen et al., 2005)	1	Peau	N.D.	N.D.
(Bouallègue et al., 2004)	18	Sang (11) Cathéters (7)	N.D.	N.D.
(Koh et al., 2004)	3	Sang (1) Urine (2)	IPM, MEM	<i>bla</i> <sub>IMP-1</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM-6</sub>
(Tsakris et al., 2003)	1	Poumon	TIC, CAZ, IPM, MEM, TMN, CIP	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>



(Docquier et al., 2003)	1	Urine	PIP, TIC, CAZ, FEP, IPM, MEM, ATM, GMN, TMN, AKN	<i>bla</i> <sub>IMP-12</sub>
(Yomoda et al., 2003)	27	Urine (22) Bile (3) Selles (1) Pus (1)	IPM, MEM, CAZ, FEP, ATM, PIP, GMN, TMN, AKN, NOR	<i>bla</i> <sub>IMP</sub>
(Lee et al., 2002)	9	Urine	IPM, MEM, PIP, CTX, CAZ, GMN, KMN, STR, TMN, AKN, CIP	<i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>
(Lombardi et al., 2002)	25	Urine (12) Poumon (8) Pus (5)	PIP, ATM, CTX, CAZ, FEP, GMN, TMN, CIP, IPM, MEM	<i>bla</i> <sub>VIM-1</sub>
(Spelman et al., 2000)	1	Sang	N.D.	N.D.

## 2 La résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa* et *P. putida*

Les *Pseudomonas* ont la capacité d'accumuler de nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques. *Pseudomonas aeruginosa* et *P. putida* possèdent des mécanismes naturels de résistance dits « intrinsèques », et tous deux peuvent atteindre des niveaux de résistance plus élevés, soit par l'apport d'éléments génétiques mobiles exogènes (des plasmides, des transposons ou des séquences d'insertion), soit par des mutations altérant l'expression ou les propriétés de mécanismes intrinsèques.

### 2.1 Résistance naturelle aux antibiotiques

Plusieurs mécanismes contribuent à la résistance naturelle de *P. aeruginosa* et *P. putida*. La très faible perméabilité de la membrane externe représente une première barrière de protection. Chez *P. aeruginosa*, cette membrane superficielle a une perméabilité équivalente à seulement 8% de celle de *Escherichia coli* (Hancock and Brinkman, 2002). Pour passer la membrane externe, les nutriments et la plupart des antibiotiques utilisent des canaux protéiques aqueux dénommés porines. Constituées de tonneaux  $\beta$ , ces dernières forment des voies de passage dans l'épaisseur de la bicouche lipidique permettant la diffusion passive plus ou moins spécifique des petites molécules hydrophiles (Fernández and Hancock, 2012). Environ 5% des molécules de la porine majoritaire OprF semblent former des pores fonctionnels chez *P. aeruginosa* ce qui expliquerait l'imperméabilité relative de la membrane externe chez cette espèce (Sugawara et al., 2006). Les génomes de *P. aeruginosa* et *P. putida* codent respectivement pour 26 et 28 porines différentes, lesquelles sont regroupées en plusieurs familles (Chevalier et al., 2017). La fonction physiologique exacte de chacune de ces porines est assez mal connue. Certaines d'entre elles sont empruntées par des

antibiotiques pour pénétrer à l'intérieur des bactéries, et une perte de fonction ou une diminution de leur expression peut conduire à une résistance accrue à une ou plusieurs agents antibactériens. Ainsi, la « perte » de la porine spécifique OprD (OccD1), porte d'entrée préférentielle des acides aminés basiques et des carbapénèmes chez *P. aeruginosa* (Trias and Nikaido, 1990), est-elle une cause majeure de résistance aux carbapénèmes chez les souches cliniques (Fournier et al., 2013). Deux autres porines, OpdO et OpdP (OccD3), capables de transporter respectivement le céfotaxime (Tamber *et al.*, 2006) et le méropénème (Isabella *et al.*, 2015), ne possèdent pas d'orthologues chez la souche de *P. putida* KT2440. Cependant, l'impact sur la résistance de l'altération de ces porines dans des souches cliniques n'est pas connu.

Les *Pseudomonas* ont la capacité de produire naturellement des enzymes inactivatrices ou modificatrices de certains antibiotiques (**Tableau 2**). Les  $\beta$ -lactamases hydrolysent le cycle  $\beta$ -lactame des  $\beta$ -lactamines et inactivent un nombre plus ou moins grand de ces molécules en fonction de leur spécificité de substrats (Wright, 2005). Le core génome de *P. aeruginosa* code pour trois  $\beta$ -lactamases au moins : AmpC, OXA-50 (ou PoxB) et PIB-1 (Juan et al., 2017), tandis que le chromosome de *P. putida* ne possède qu'un seul gène codant pour la  $\beta$ -lactamase AmpC (Winsor et al., 2016). AmpC est une  $\beta$ -lactamase à spectre large de type céphalosporinase, produite à un niveau basal chez les souches sauvages, mais dont l'expression est induite fortement lors de l'exposition des bactéries à certaines  $\beta$ -lactamines telles que la céfoxitine et les carbapénèmes. Elle confère donc une résistance vis-à-vis des molécules labiles capables d'induire sa production, dont certaines pénicillines (amoxicilline, ampicilline), céphalosporines de 1<sup>ère</sup> (céphalotine) et 2<sup>ème</sup> (céfoxitine) génération (Lister et al., 2009). La contribution de l'oxacillinase OXA-50 (PoxB) et de la carbapénémase PIB-1 à la

**Tableau 2. Enzymes inactivatrices et modifcatrices d'antibiotiques codées dans les chromosomes des souches PAO1 de *P. aeruginosa* et KT2440 de *P. putida*. N.C. : Non caractérisée**

Enzyme	Classification	Substrats de l'enzyme	<i>P. aeruginosa</i> PAO1	<i>P. putida</i> KT2440
AmpC	$\beta$ -lactamase de classe C	Toutes les $\beta$ -lactamines (sauf carbapénèmes)	PA4110	PP_2876
OXA-50	$\beta$ -lactamase de classe D	Ampicilline Ticarcilline Méropénème	PA5514	-
PIB-1	Métallo- $\beta$ -lactamase	Carbapénèmes	PA5542	-
APH(3')-IIb	Aminoside phosphotransférase (APH)	Kanamycine Néomycine Streptomycine	PA4119	-
PP_2791	Aminoside phosphotransférase (APH) probable	N.C.	-	PP_2791

résistance naturelle de *P. aeruginosa* est négligeable car aucune de ces enzymes quiescentes n'est produite significativement à l'état basal et n'est inductible.

Parallèlement à l'inactivation de certaines  $\beta$ -lactamines, *P. aeruginosa* et *P. putida* ont la faculté de modifier plusieurs aminosides et de les empêcher d'interagir avec leur cible, le ribosome. Le génome de la souche PAO1 code pour une APH (3')-IIb (PA4119) agissant sur la kanamycine, la néomycine et la streptomycine (Hächler *et al.*, 1996) (Hainrichson *et al.*, 2007). Chez la souche KT2440, le gène PP\_2791 code pour une enzyme annotée comme une aminoside-phosphotransférase putative, mais qui n'est pas caractérisée.

La résistance naturelle de *P. aeruginosa* et *P. putida* aux antibiotiques repose aussi largement sur la production de systèmes d'efflux actif, dont la fonction est de maintenir l'homéostasie cellulaire et l'intégrité des membranes en expulsant diverses molécules potentiellement nocives, du périplasme vers le milieu extra-cellulaire, par un transport actif impliquant des protéines membranaires. Certains de ces systèmes ont une expression inductible, d'autres sont produits de façon constitutive et confèrent une protection permanente vis-à-vis des substrats qu'ils transportent. La description des différents systèmes d'efflux de *P. aeruginosa* et *P. putida* sera abordée dans le chapitre 3 (Li *et al.*, 2015). Il est important de noter que l'efflux actif et l'imperméabilité membranaire sont deux mécanismes ayant des effets complémentaires et souvent synergiques.

## **2.2 Résistance acquise aux antibiotiques**

Des mécanismes supplémentaires, notamment liés à des transferts horizontaux d'éléments génétiques mobiles, peuvent ajouter leurs effets à ceux de la résistance naturelle. De nombreux gènes portés par des plasmides ou des ICE (*Integrative Conjugative Elements*) et

codant pour des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE) ou des carbapénémases ont été décrits chez les *Pseudomonas* (Patel and Bonomo, 2011). Dans de nombreux cas, ces gènes sont localisés dans la partie variable d'intégrons de classe 1 et associés à des gènes de résistance aux aminosides. Plus rarement ont été décrits des gènes transférables conférant une résistance aux fluoroquinolones. Ils codent pour des pentapeptides de la famille Qnr, tels que QnrVC1, et pourraient protéger l'ADN gyrase et la topoisomérase IV vis-à-vis des fluoroquinolones (Kocsis *et al.*, 2019). La présence des mêmes gènes de résistance acquis chez différentes espèces de *Pseudomonas* pose la question des transferts génétiques au sein du genre bactérien. Comme nous l'avons déjà mentionné, un certain nombre d'épidémies dues à des souches de *P. putida* dans les services de réanimation, font suite à une contamination du système de distribution d'eau de l'hôpital (Bouallègue *et al.*, 2004) (Liu *et al.*, 2014) (Perz *et al.*, 2005). Ces observations soulignent l'aptitude des souches de *P. putida* à persister dans un réseau d'eau et à contaminer les patients. Plusieurs études évoquent un possible transfert de gènes de résistance entre *P. putida* et *P. aeruginosa*. En 2010, dans un hôpital espagnol, 8 souches de *P. putida* ont été isolées chez des patients. Six d'entre elles possédaient le gène de la métallo- $\beta$ -lactamase *bla*<sub>VIM-2</sub>. Dans la même période, trois souches de *P. aeruginosa* *bla*<sub>VIM-2</sub> positives ont été détectées. Une étude génétique a montré que *bla*<sub>VIM-2</sub> était porté par le même transposon (de type Tn402/Tn503-like) à la fois chez *P. putida* et *P. aeruginosa* suggérant un rôle de *P. putida* dans la dissémination de cette  $\beta$ -lactamase vers des espèces plus pathogènes (Juan *et al.*, 2010). A l'appui de cette hypothèse, d'autres travaux ont mis en évidence la présence de plasmides conjugatifs portant divers gènes de résistance chez *P. putida* (Marchiaro *et al.*, 2014).

En plus des échanges génétiques, la résistance aux antibiotiques peut résulter de mutations spontanées survenant dans des gènes chromosomiques. Une revue récente de Horcajada liste les gènes dont l'altération est associée avec le développement de la résistance chez *P. aeruginosa* (Horcajada *et al.*, 2019). Par exemple, certaines mutations abolissent la production de porines (OprD) ou inactivent des répresseurs transcriptionnels (systèmes d'efflux Mex), modifient l'affinité des cibles cellulaires de certains antibiotiques (PLP, ADN gyrase, FusA1), alors que d'autres conduisent à un gain de fonction d'une protéine régulatrice (AmpR) ou d'un système à deux composants (ParRS, PmrAB) (Juan *et al.*, 2017) (Haidar *et al.*, 2017). Parmi les mécanismes de résistance d'origine chromosomique pouvant être activés par des mutations (Lister *et al.*, 2009), les pompes d'efflux méritent une attention particulière car leur polyspécificité peut être la cause de multirésistance.

### **3 Les systèmes d'efflux actif**

#### **3.1 Généralités**

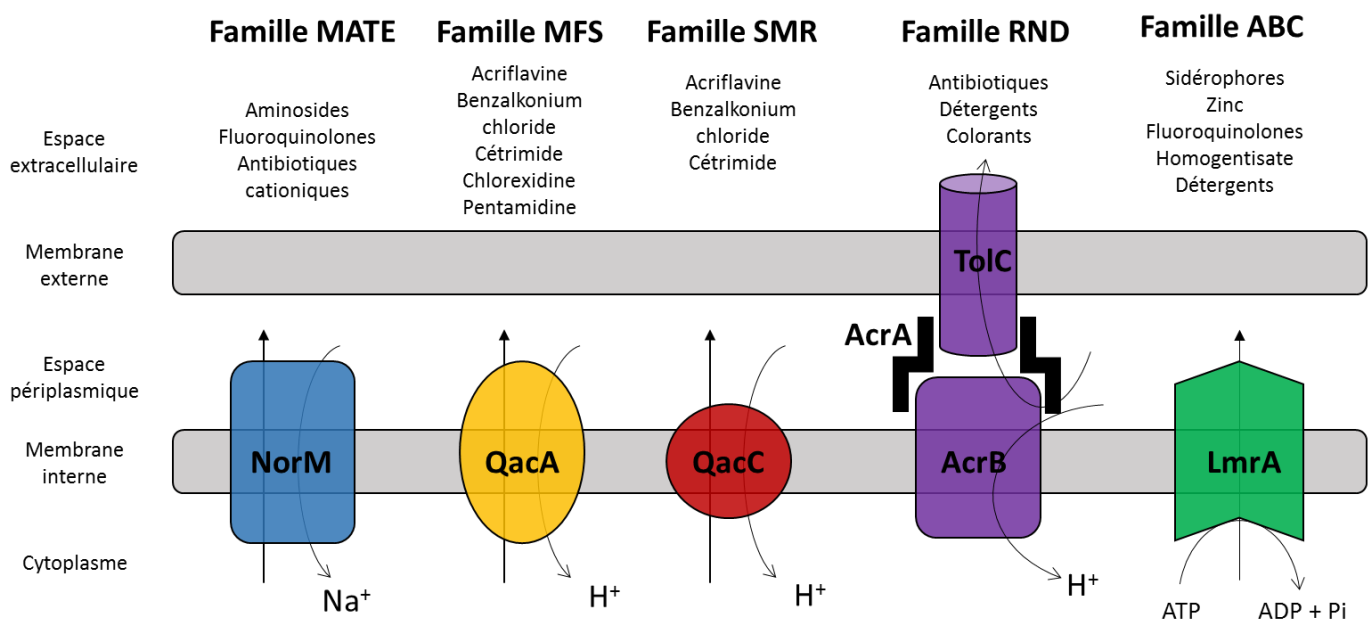
Les systèmes d'efflux actif sont des complexes protéiques transmembranaires dont le rôle est d'exporter des molécules intracellulaires vers le milieu extérieur. Selon la nature de l'énergie nécessaire à leur fonctionnement, ils sont séparés en deux grandes catégories : (i) les transporteurs primaires, nécessitant l'hydrolyse de l'ATP, et (ii) les transporteurs secondaires qui couplent l'entrée d'un ion sodium ou d'un proton à l'export d'une molécule de substrat selon un processus antiport (Saier *et al.*, 2006). Une seconde classification permet de différencier les systèmes d'efflux actif selon la structure de la protéine faisant fonction de transporteur. Cinq familles distinctes ont été décrites à ce jour. La première regroupe les transporteurs primaires et correspond à la famille *ATP-Binding Cassette* (ABC).

Les quatre autres familles dénommées *Small Multidrug Resistance (SMR)*, *Major Facilitator Superfamily (MFS)*, *Resistance Nodulation cell Division (RND)* et *Multidrug And Toxic compound Extrusion (MATE)* sont constituées par des transporteurs secondaires (Figure 3) (Blair *et al.*, 2014). Ces transporteurs sont impliqués dans divers processus physiologiques tels que la réponse au stress oxydatif ou électrophile (Juarez *et al.*, 2017), la diffusion de molécules signal du *quorum sensing* (Liang *et al.*, 2016) et le rejet de xénobiotiques (Poole, 2014) (Li *et al.*, 2015).

Les systèmes d'efflux sont ubiquitaires et retrouvés chez pratiquement tous les être vivants. Chez les bactéries, la proportion des différentes familles de transporteurs peut varier d'une espèce à l'autre en fonction de sa niche écologique, des stress auxquels elle doit couramment faire face et de son type de métabolisme énergétique. Par exemple, les espèces fermentaires expriment majoritairement des transporteurs primaires et les espèces aérobies, des transporteurs secondaires (Paulsen *et al.*, 2000).

Les transporteurs de la famille ABC sont présents de manière ubiquitaire dans tous les phylums du vivant. Ils partagent une structure commune composée de quatre sous-domaines : deux domaines transmembranaires (TMD1 et TMD2 pour *Transmembrane Domains 1, 2*) formant un canal permettant le passage du substrat, et de deux domaines de liaison aux nucléotides (NBD1 et NBD2, pour *Nucleotide Binding Domains 1, 2*) cytoplasmiques, qui vont apporter l'énergie nécessaire au fonctionnement de la pompe (Orelle *et al.*, 2019). Ces systèmes sont responsables de l'entrée ou de l'export de nombreux composés de taille et de structure variées. Ainsi, chez *P. aeruginosa*, les transporteurs ABC sont impliqués dans des processus-clés tels que (i) la sécrétion de sidérophores, molécules





**Figure 3. Représentation schématique des différentes familles de transporteurs actif bactériens.** Les bandes grises représentent la membrane bactérienne externe en haut et interne en bas. **MATE** : Multidrug And Toxic compounds Extrusion ; **MFS** : Major Facilitator Superfamily ; **SMR** : Small Multidrug Resistance ; **RND** : Resistance, Nodulation and cell Division ; **ABC** : ATP-Binding Cassette. NorM est un système identifié chez *Vibrio parahaemolyticus* et homologue à YdhE de *E. coli*, impliqué dans l'efflux de la norfloxacine, la ciprofloxacine et l'acriflavine (Morita *et al*, 1998). Le système QacA est un système de *Staphylococcus aureus* impliqué dans la résistance aux biguanidines, diamines et guanylhydrazones (Mitchell *et al*, 1998). QacC, un autre système de *S. aureus*, est impliqué dans l'extrusion du tétrahydrophosphonium et des amines quaternaires (Grinius *et al*, 1992). AcrAB-TolC est un système présent chez *E. coli* et responsable de l'efflux des  $\beta$ -lactamines, du chloramphenicol, des fluoroquinolones, des tétracyclines, des détergents et de la plupart des antibiotiques lipophiliques (Tsutsumi *et al*, 2019). Enfin, LmrA est un système de *Lactococcus lactis* capable d'effluer le bromure d'ethidium, la rhodamine 6G et la daunomycine (Van Veen *et al*, 1996). Schéma réalisé d'après Piddock *et al*, 2006.

permettant la captation des métaux dans l'environnement (système PvdRT-OpmQ) (Imperi *et al.*, 2009), (ii) l'adressage de molécules de LPS à la membrane externe (système Wzt) (Rocchetta and Lam, 1997), (iii) l'acquisition d'hème et d'hémoglobine lors d'une infection (système PhuT) (Ochsner *et al.*, 2000), (iv) l'import de polyphosphate et de phosphate inorganique exogène (système PhoU) (de Almeida *et al.*, 2015), (v) l'export d'homogentisate, un précurseur de la pyomélanine (système HatA) (Hunter and Newman, 2010), (vi) l'acquisition de zinc exogène (système ZnuA) (Pederick *et al.*, 2015) et enfin, (vii) l'export d'antibiotiques, notamment de fluoroquinolones par un système ABC putatif codé par le gène PA2812 (Zhou *et al.*, 2006), et de tétracyclines (produit du gène PA4456) (Chen and Duan, 2016). Le système NppA1A2BCD est utilisé par les antibiotiques peptido-nucléosidiques tels que la microcine C, l'albomycine et la pacidamycine pour pénétrer dans la cellule bactérienne (Pletzer *et al.*, 2015).

L'analyse phylogénétique des pompes d'efflux MFS permet de les répartir en 74 sous-familles, dont 17 ne sont pas caractérisées (Reddy *et al.*, 2012). Ces systèmes sont capables d'importer ou d'exporter des composés très divers tels que des mono- ou oligo-saccharides, des acides aminés, des peptides, des antibiotiques et des cofacteurs enzymatiques. Enchâssées dans la membrane cytoplasmique, les protéines de type MFS se composent de 12 ou 14 domaines transmembranaires selon la sous-famille (Holyoake *et al.*, 2006). L'export de substrats par certains de ces transporteurs se limite le plus souvent au compartiment périplasmique, et est considéré comme moins efficace que l'export médié par des systèmes plus complexes, traversant la membrane externe, et qui assurent le rejet des substrats directement dans le milieu extracellulaire. Cependant, il a été montré chez *P. aeruginosa* que certaines pompes MFS peuvent participer à un processus d'efflux en deux étapes, la

première consistant à provoquer l'accumulation du substrat dans l'espace périplasmique (MFS) et la deuxième faisant intervenir un système de type RND pour le rejet de la molécule dans le milieu extracellulaire. Ainsi, l'expression du transporteur TetA (MFS) conduit à une augmentation de 64 fois de la CMI de la tétracycline (0,5 à 32 mg/L) en l'absence de MexAB-OprM (RND). Le niveau de résistance atteint est similaire à celui résultant de la surproduction de MexAB-OprM en l'absence de TetA. Finalement, l'association des deux mécanismes a des effets synergiques (CMI > 512 mg/L) (Lee *et al.*, 2000).

Les protéines de la famille SMR sont constituées de 4 domaines transmembranaires seulement, structurellement rattachés à la superfamille DMT (*Drug/Metabolite Transporter*). Ces transporteurs dimériques exportent des petites molécules monocationiques (éthidium) ou dicationiques (paraquat) en échange d'un proton (Yerushalmi *et al.*, 1995). La pompe SMR la plus étudiée, EmrE, protège *E. coli* contre les effets toxiques de petites molécules exogènes, cationiques et hydrophobes telles que l'éthidium et le méthyl-viologène (Yerushalmi *et al.*, 1995). Cependant, la fonction physiologique de ce système pourrait être l'efflux du guanidium. En effet, les gènes impliqués dans la synthèse du guanidium sont co-régulés avec ceux des pompes d'efflux de type SMR (Breaker *et al.*, 2017). Un homologue d'EmrE est présent chez *P. aeruginosa* (PA4990) ; sa délétion chez la souche de référence PAO1 augmente la sensibilité au bromure d'éthidium (CMI 4 fois plus faible) et à l'acriflavine (4 fois) (Li *et al.*, 2003a). Au total, le génome de la souche PAO1 code pour six protéines SMR putatives. A PA4990, s'ajoutent les gènes PA0786, PA1540, PA1541, PA1882 et PA3265. Chez la souche KT2440 de *P. putida*, une seule protéine de la famille SMR est annotée, codée par le gène PP\_1824. Le produit de PP\_1824 présente 74,7 % d'identité de séquence avec une

protéine de PAO1, PA1675, non identifiée par Li en 2003 (Li *et al.*, 2003a). D'autres transporteurs SMR sont donc potentiellement présents et à caractériser chez *P. aeruginosa*.

Les transporteurs MATE ont été décrits plus récemment. Ils se rattachent à la superfamille MOP (*Multidrug/Oligosaccharidyl-lipid/Polysaccharide flippase superfamily*). Ces protéines utilisent un gradient de protons et/ou de sodium pour l'export dans l'espace périplasmique de divers substrats tels que des colorants cationiques, des fluoroquinolones et des aminosides (Omote *et al.*, 2006). Le système NorM de *Vibrio parahaemolyticus* a été le premier décrit (Morita *et al.*, 1998). Neuf autres ont ensuite été caractérisés chez diverses espèces telles que *Vibrio cholerae*, *P. aeruginosa* et *Haemophilus influenzae* (Kuroda and Tsuchiya, 2009). Les gènes de deux pompes MATE sont identifiables dans le génome de la souche PAO1 (PA5294 et PA1361). La surproduction de l'homologue de NorM, appelé PmpM, à partir du gène PA1361 cloné chez *E. coli* KAM32, conduit à une augmentation de la résistance aux fluoroquinolones (4 à 8 fois), au chlorure de benzalkonium (31 fois), à la chlorexidine (4 fois), au bromure d'éthidium (8 fois), à la rhodamine 6G (16 fois) et à l'acriflavine (2 fois), suggérant l'implication de la pompe dans l'export de ces composés chez *P. aeruginosa* (He *et al.*, 2004).

L'utilisation de la base TransportDB2.0 ([www.membranetransport.org/transportDB2/](http://www.membranetransport.org/transportDB2/)) qui recense tous les transporteurs identifiés à partir des séquences génomiques déposées, nous a permis de comparer les transporteurs codés par les souches PAO1 (*P. aeruginosa*) et KT2440 (*P. putida*) (Tableau 3). Les transporteurs primaires (ABC) et les transporteurs secondaires représentent respectivement 48% et 44% des transporteurs détectés chez ces deux espèces. En valeur absolue, le nombre de transporteurs est comparable. On dénombre

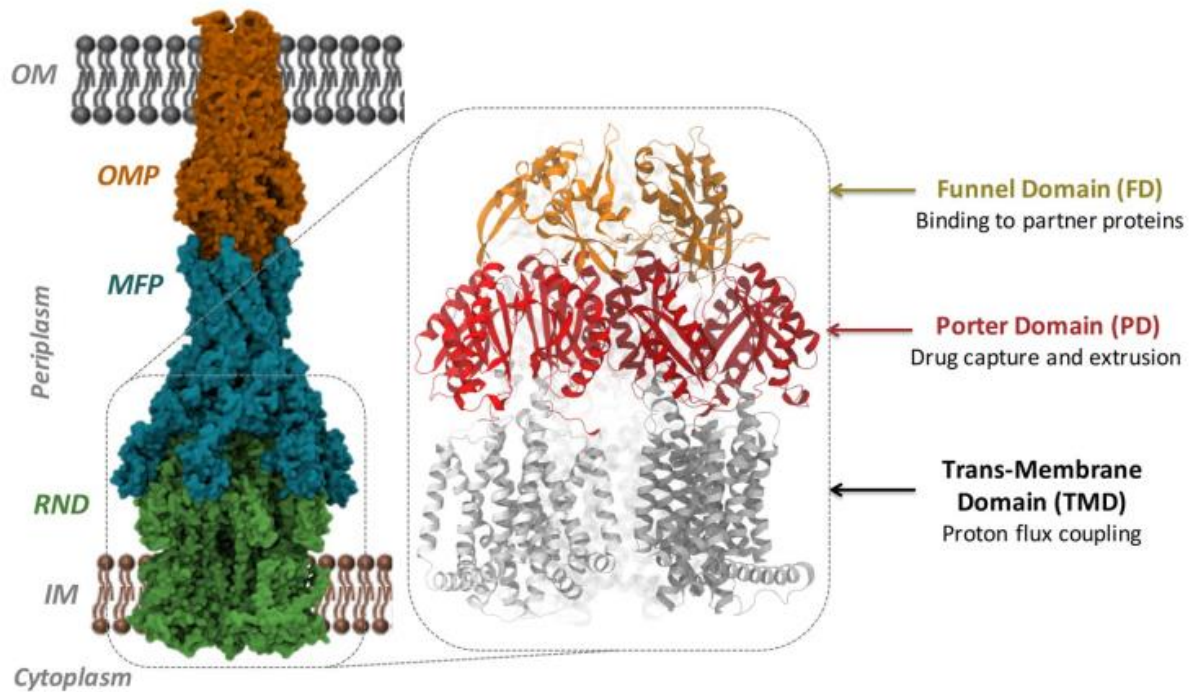
**Tableau 3. Distribution des protéines impliquées dans le transport actif chez les souches *P. aeruginosa* PAO1 et *P. putida* KT2440. ABC: ATP-binding cassette; MFS: Major Facilitator Superfamily; RND: Resistance, Nodulation and cell Division; SMR: Small Multidrug Resistance. Données établies à partir de la base de données Transport DataBase (TransportDB 2.0, [www.membranetransport.org/transportDB2/](http://www.membranetransport.org/transportDB2/)).**

Caractéristiques	Souches étudiées			
	<i>P. aeruginosa</i> PAO1		<i>P. putida</i> KT2440	
Taille du génome	6,264 Mb		6,181 Mb	
Nombre de protéines de transport (nombre, n)	n = 706		n = 677	
Nombres de transporteurs primaires n (% total)	337 (48%)	ABC : 289	326 (48%)	ABC : 291
		Autres : 48		Autres : 35
Nombre de transporteurs secondaires n (% total)	369 (52%)	MFS : 91	351 (52%)	MFS : 88
		RND : 12		RND : 14
		SMR : 6		SMR : 1
		Autres : 260		Autres : 248

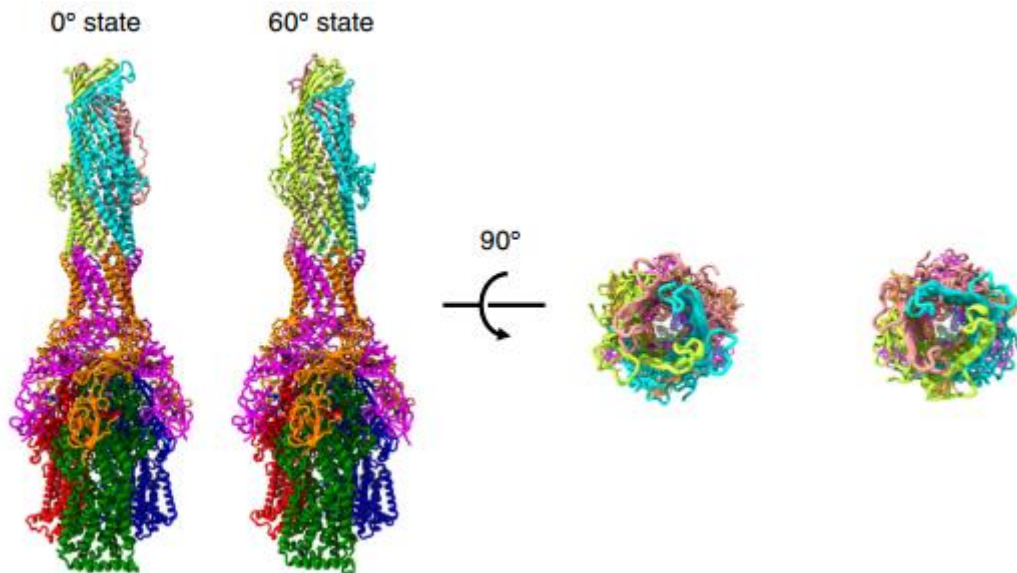
ainsi 289 transporteurs ABC chez la souche PAO1 *versus* 291 chez la souche KT2440, 91 transporteurs MFS chez la souche PAO1 contre 88 chez la souche KT2440, et 12 RND chez la souche PAO1 contre 14 chez la souche KT2440. Les transporteurs classés « autres » ne font pas partie de systèmes d'efflux actif, comme par exemple les canaux ioniques (environ 4 à 5%), les systèmes de phosphotransfert (PTS) (environ 1%) et les systèmes non classifiés. Nous allons à présent focaliser notre étude bibliographique sur la famille la plus pertinente dans le cadre de la résistance aux antibiotiques, celle des RND.

### **3.2 Structure des systèmes RND**

La pompe d'efflux AcrAB-TolC de *E. coli* est actuellement le système RND le mieux étudié (Tsutsumi et al., 2019). Ce système est constitué de trois protéines très conservées, à savoir (i) un transporteur RND enchâssé dans la membrane cytoplasmique (AcrB), (ii) une protéine de membrane externe (TolC) formant un canal permettant l'extrusion des substrats, et (iii) une protéine adaptatrice ou de fusion (AcrA), reliant les deux protéines précédentes et assurant la stabilité du complexe (Figure 4). Les pompes de type RND sont ubiquitaires chez les bactéries. Ainsi, des homologues de AcrAB-TolC sont présents chez *P. aeruginosa* (MexAB-OprM) (Guan et al., 1999) et *P. putida* (TtgABC) (Ramos et al., 1998). La structure complète de la pompe MexAB-OprM a récemment été résolue avec une précision proche de l'atome, 3.64 Å (Figure 5) ce qui permet d'observer l'assemblage de chacun des protomères constituant le système (Tsutsumi et al., 2019a). Plusieurs revues de la littérature décrivent la structure des différents éléments des pompes RND (Puzari and Chetia, 2017), (Misra and Bavro, 2009) (Nikaido and Takatsuka, 2009) (Blair and Piddock, 2009).



**Figure 4. Structure tripartite tridimensionnelle de la pompe d'efflux AcrAB-TolC chez *E. coli*.** La protéine de membrane externe TolC est représentée en brun, la protéine adaptatrice AcrA en bleu et le transporteur RND AcrB enchâssé dans la membrane cytoplasmique, en vert. Un zoom montre la structure particulière du transporteur AcrB. En doré apparaît le domaine d'ancrage aux protéines partenaires (Funnel domain), le domaine du pore est coloré en rouge (Porter Domain) et en gris le domaine transmembranaire responsable de l'ancrage à la membrane cytoplasmique et du flux de protons (Ramaswamy *et al*, 2017).

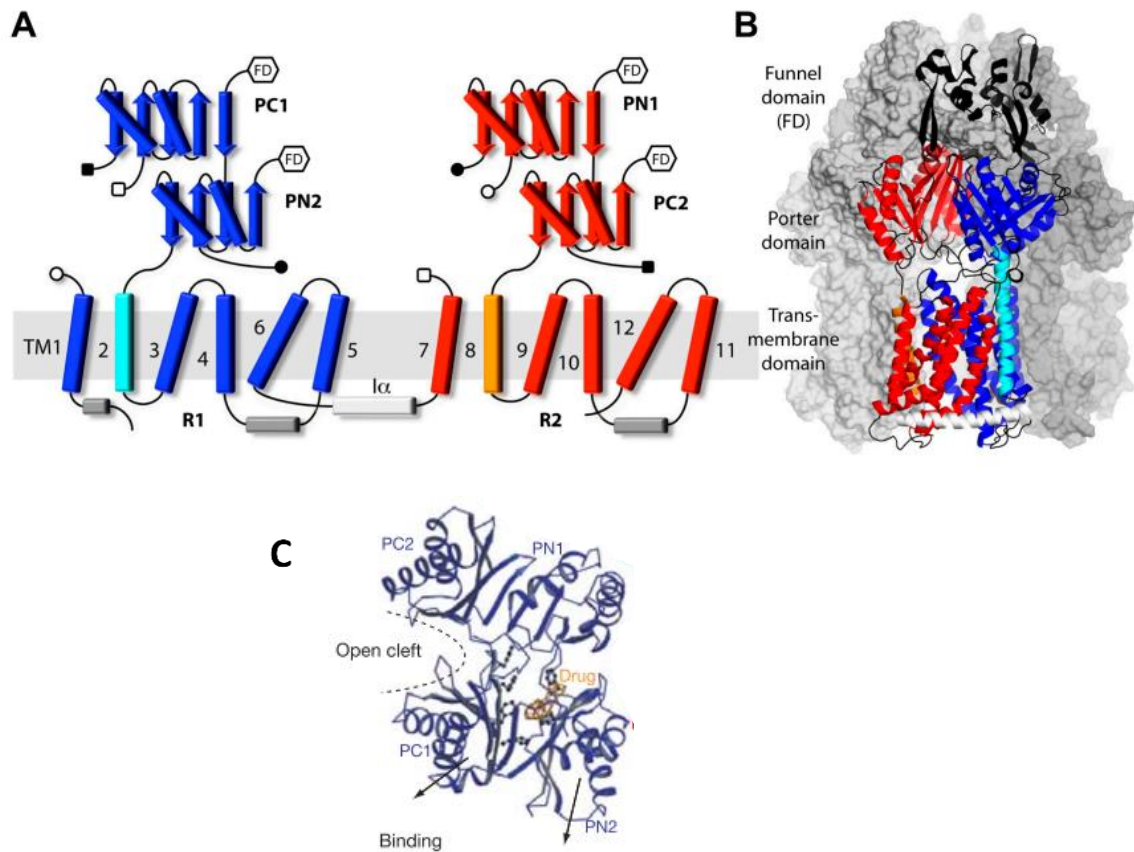


**Figure 5. Structure tridimensionnelle de MexAB-OprM chez *P. aeruginosa*.** La structure tripartite de la pompe MexAB-OprM assemblée a été résolue par *Cryo-EM single particle analysis*. Deux positions possibles d'OprM ont été observées, l'une sans rotation d'OprM (position 0°) et l'autre avec une rotation de 60° (position 60°). **A.** Représentation de la pompe. **B.** Représentation d'OprM vue du dessus. Les protomères d'OprM sont colorés en cyan, rose clair et vert clair, respectivement. Les protomères de MexA sont colorés en magenta et orange. Les protomères de MexB sont colorés en vert, bleu et rouge (Tsutsumi *et al*, 2019)



### 3.2.1 Le transporteur RND

Le transporteur RND est responsable à la fois de la reconnaissance du substrat et de la transduction énergétique (Eicher et al., 2014). La protéine fonctionnelle MexB est constituée de trois protomères (Murakami *et al.*, 2002) comportant chacun trois domaines, (i) un domaine transmembranaire (*Trans-Membrane Domain*, ou TMD) composé de 12 hélices  $\alpha$ , (ii) un domaine pore (*Porter Domain*, ou PD) contenant la poche de liaison du substrat et (iii) un domaine d'ancrage pour les autres composants de la pompe, OprM et MexA (*Funnel Domain*, ou FD) (Figure 4) (Sennhauser *et al.*, 2009). Le TMD de MexB est formé par les hélices TM1 à TM12, reliées entre elles par des boucles. Deux boucles périplasmiques plus longues (311 et 314 résidus) se situent respectivement entre les domaines transmembranaires TM1 et TM2, et entre TM7 et TM8 (Guan et al., 1999). Ces boucles semblent responsables de la spécificité de substrat de la pompe (Tikhonova *et al.*, 2002). Le domaine d'ancrage de MexB est ouvert en son centre pour former un tunnel dont le diamètre interne est de 30 Å. Enfin, le domaine du pore, situé sous le domaine d'ancrage à OprM, est constitué de 4 sous-domaines : PN1, PN2, PC1 et PC2. Ceux-ci présentent une structure commune de deux motifs répétés de type feuillet  $\beta$  / hélice  $\alpha$  / feuillet  $\beta$  (Figure 6). La cristallisation de la protéine AcrB en présence de minocycline et de doxorubicine a permis de localiser une poche distale de liaison des substrats, entre les feuillets  $\beta$  des sous-domaines PN2 et PC1 (Murakami *et al.*, 2006) (Figure 6C). Plus récemment, c'est une seconde poche, dite proximale, qui a été caractérisée (Nakashima *et al.*, 2011). Ces deux poches, proximale (ou poche d'accès) et distale (ou poche profonde),



**Figure 6 : Représentation et structure tridimensionnelle des différents domaines d'un protomère d'AcrB.** **A.** Représentation du domaine transmembranaire composé de 12 hélices  $\alpha$  (TM1 à 12), séparées en deux répétitions de 5 hélices (nommés R1 et R2 et représentés en bleu et rouge, respectivement) ainsi que deux hélices indépendantes, TM2 et TM8. Les boucles périplasmiques TM1/2 et TM7/8 forment le domaine du pore, subdivisé en 4 sous-domaines : PN1, PN2, PC1 et PC2. La membrane cytoplasmique est représentée en gris. TM : *transmembrane domain*. **B.** Représentation de la structure 3D d'un protomère d'AcrB. Les deux autres protomères sont suggérés en transparence de gris. Le domaine d'ancrage est représenté en noir. **C.** Vue du dessus d'un protomère du domaine du pore. La minocycline liée à AcrB est représentée en jaune, dans la poche distale de liaison du substrat (Eicher *et al*, 2014), (Murakami *et al*, 2006).

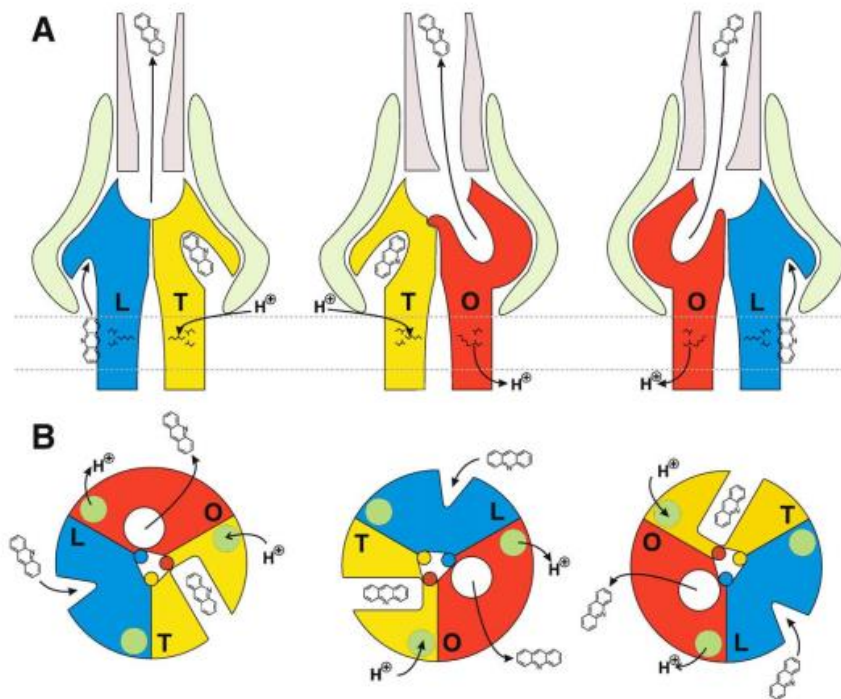
sont séparées par une boucle « switch » qui en contrôle l'accès lors des différentes phases d'entrée des substrats (Eicher *et al.*, 2012). Le mécanisme d'entrée et d'extrusion des molécules substrats passe par un mécanisme rotatoire, dans lequel chaque protomère adopte successivement trois conformations différentes correspondant aux trois étapes de fonctionnement de la pompe (Figure 7) : la conformation relâchée (Loose, L) permettant l'accès à la poche, la conformation serrée (Tight, T) pour la fixation du substrat dans la poche et la conformation ouverte (Open, O) pour l'expulsion du substrat par le canal de la protéine de membrane externe (TolC ou OprM) (Murakami *et al.*, 2006).

### 3.2.2 La protéine adaptatrice

Les protéines MexA et AcrA ont été cristallisées avec une résolution respectivement de 2,40 Å et 2,70 Å (Akama *et al.*, 2004) (Mikolosko *et al.*, 2006). Les structures montrent une queue lipidique N-terminale, permettant un ancrage dans la membrane interne. Le reste de la protéine est situé dans le périplasma. La protéine adaptatrice se compose de trois domaines : (i) un tonneau  $\beta$  formé de six brins  $\beta$  antiparallèles complété d'une hélice  $\alpha$ , (ii) un domaine central composé de deux fois 4 brins  $\beta$  antiparallèles, et (iii) un troisième domaine d'hélices  $\alpha$  séparant les deux précédents, dont la structure est en épingle à cheveux.

### 3.2.3 La protéine de membrane externe

Cette configuration est différente de celle d'une porine, dont le canal n'implique la participation que d'une seule sous-unité protéique (Koronakis *et al.*, 2000). Les hélices  $\alpha$  de la partie périplasmique, reliées au tonneau  $\beta$ , sont au nombre de 12. Elles possèdent une conformation en triplets, stabilisés entre eux par des liaisons ioniques. Il a été proposé que



**Figure 7 : Mécanisme rotatoire d'ouverture des pompes d'efflux de la famille RND.**

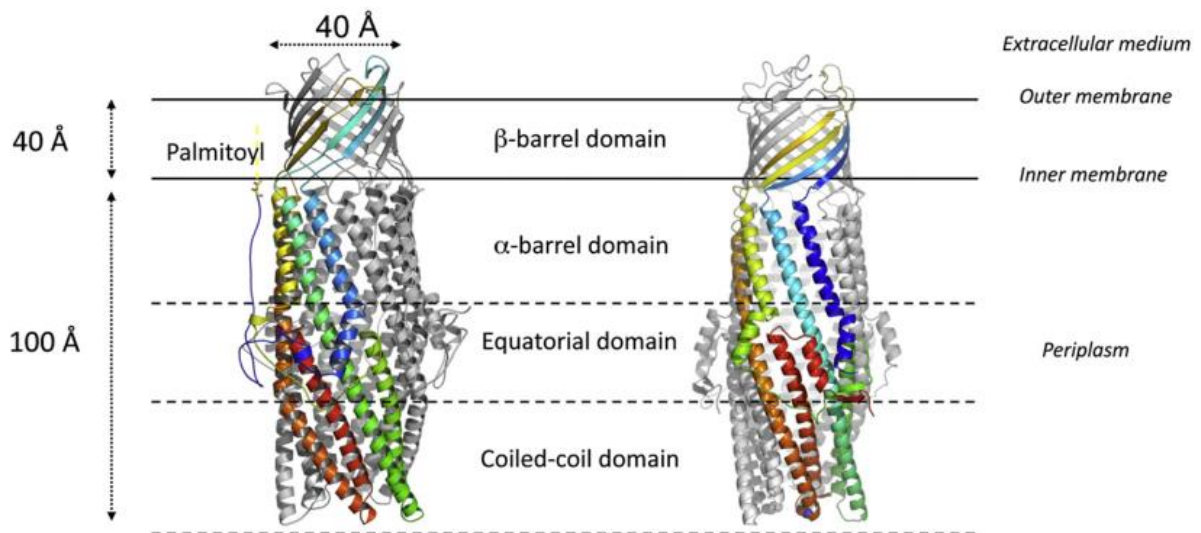
**A.** Schéma montrant les configurations successives de deux protomères sur les trois formant la structure d'AcrB. La configuration relâchée (L) est représentée en bleu, la configuration serrée (T) en jaune et la configuration ouverte (O) en rouge. **B.** Vue du dessus de la tête périplasmique de AcrB, au niveau de la zone d'ancrage de TolC (Pos, 2009)

la perturbation de ces liaisons ioniques permettait aux triplets d'hélices de coulisser, de se relâcher et ainsi d'ouvrir l'accès du canal aux substrats pour pouvoir être éliminés à l'extérieur de la bactérie (Andersen *et al.*, 2002). Une cristallisation de la structure tripartite complète et assemblée MexAB-OprM, à une résolution de 3,4 Å, a mis en évidence que la protéine MexB ne se lie pas directement à OprM, mais passe par une interaction avec MexA, via son domaine d'hélices  $\alpha$ . De plus, l'obtention de cette structure a permis de comparer deux états existants de la protéine de membrane externe OprM : l'état ouvert et fermé. Lorsqu'OprM n'est pas assemblé, la porte périplasmique est fermée par une interaction hydrophobe du résidu L412 de chaque protomère, ainsi que par les ponts salins formés entre les résidus D416 et R419. Cependant, au sein de la structure tripartite assemblée, le carbone  $\alpha$  en position L412 est déplacé de 11,4 Å et les ponts salins entre les résidus D416 et R419 ont disparu, ouvrant le passage périplasmique de la protéine OprM (Tsutsumi *et al.*, 2019).

### **3.3 Les systèmes RND chez *P. putida***

#### 3.3.1 Généralités

Le génome des souches de *P. putida* varie de 5,8 à 6,2 Mbases et renferme plusieurs gènes codant pour des pompes de la famille RND. Ainsi, celui de la souche de référence KT2440, provenant de la rhizosphère d'un jardin japonais, possède 14 loci de ce type (Nelson *et al.*, 2002). La souche DOT-T1E, isolée d'un réservoir de traitement des eaux usées en Espagne, possède 16 pompes RND dont 15 codées par le génome et une déterminée par un plasmide appelé pGRT1 (Ramos *et al.*, 1995). Enfin, la souche S12, isolée par Inoue et Horikoshi d'un sol contaminé par du pétrole en 1989 (Inoue and Horikoshi, 1989), dispose de 14 systèmes



**Figure 8 : Structure schématique des protéines OprM (gauche) et TolC (droite).** Un monomère est représenté en couleur sur les trois composants la protéine totale. Sont également présentés le domaine transmembranaire en feuillets  $\beta$ , et le domaine périplasmique composé d'hélices  $\alpha$ . Ce dernier peut lui-même être sous-divisé en trois domaines : domaine  $\alpha$ , domaine équatorial et domaine sur-enroulé (Phan *et al*, 2010).

RND dont un d'origine plasmidique, pTTS12. Ces différents systèmes sont recensés dans le Tableau 4, et comparés à leurs homologues de la souche de *P. aeruginosa* PAO1. Un travail réalisé par P. Godoy et ses collaborateurs a permis de classer les systèmes RND de la souche de référence KT2440 en 4 groupes fonctionnels sur la base de leur structure tertiaire (Godoy *et al.*, 2010) (Tableau 5).

Le groupe 1 regroupe quatre pompes impliquées dans l'extrusion de molécules antibiotiques. La première, dénommée TtgABC (PP\_1384-86), dont les substrats et la régulation ont été étudiés par Ramos et coll. (Ramos *et al.*, 1998), sera décrite dans le chapitre suivant. La seconde pompe du groupe 1 (locus PP\_2817-19) présente des homologies de séquence avec MexCD-OprJ de *P. aeruginosa*. Comme chez cette dernière espèce, la délétion des gènes *mexCD-oprJ* chez KT2440 n'a aucun impact sur la sensibilité à la pipéracilline, l'ampicilline et la rifampicine, indiquant de ce fait qu'elle ne contribue pas à la résistance naturelle de *P. putida* à ces antibiotiques (Martínez-García and de Lorenzo, 2011).

Le troisième système d'efflux (locus PP\_3425-27) est un homologue de la pompe MexEF-OprN de *P. aeruginosa*. Il protège KT2440 vis-à-vis du 2,4,6-trinitrotoluène (TNT), un explosif pouvant contaminer certains sols et points d'eau (Fernández *et al.*, 2009), et contribue à la résistance naturelle de la souche à certains antibiotiques. Sa délétion s'accompagne d'une légère sensibilisation de KT2440 à la rifampicine (CMI de >32 à 6 mg/L), la pipéracilline (de 6 à 4 mg/L) et l'acide nalidixique (de 8 à 6 mg/L) (Martínez-García and de Lorenzo, 2011). Enfin, la quatrième pompe du groupe 1 est déterminé par un opéron de deux gènes (PP\_3455-56) correspondant à une protéine adaptatrice et un transporteur RND. Ce système

**Tableau 4. Comparaison des systèmes RND codés par les génomes de 4 souches de référence de *P. putida* et la souche PAO1 de *P. aeruginosa*.** <sup>1</sup>Souches de référence ; <sup>2</sup>Souches ayant un haut niveau de résistance aux solvants organiques, possédant des pompes d'efflux plasmidiques ; <sup>3</sup>Souche modérément résistante aux solvants organiques.

	<i>P. aeruginosa</i>		<i>P. putida</i>		
	PAO1 <sup>1</sup>	KT2440 <sup>1</sup>	DOT-T1E <sup>2</sup>	F1 <sup>3</sup>	S12 <sup>2</sup>
Site d'isolement	Homme	Rhizosphère d'un jardin japonais (Nelson <i>et al</i> , 2003)	Réservoir de traitement des eaux usées (Ramos <i>et al</i> , 1995)	Isolé du sol, culture avec éthylbenzène comme seule source de carbone (Gibson <i>et al</i> , 1968)	Sol pollué par du pétrole (Inoue and Horikoshi, 1989)
Tolérance aux solvants	-	-	+++	+	++
Taille du chromosome		6,18 Mb	6,26 Mb	5,96 Mb	5,8 Mb
Plasmide (taille)	-	-	pGRT1 (133,451 Kb)	-	pTTS12 (583,9 Kb)
Pompes d'efflux de la famille RND	MexAB-OprM	PP_1384-86 (TtgABC)	T1E_0241-43 (TtgABC)	Pput_4337-39	RPPX_14635-45 (ArpABC)
	MexCD-OprJ	PP_2817-18	-	-	-
	MexEF-OprN	PP_3425-26	T1E_5217-19	Pput_2335-37	RPPX_21210-20
	MexXY	PP_3455-56	T1E_0107-08	Pput_2313-14	RPPX_21075-80
	MexGHI-OpmD	PP_2064-65	T1E_3612-13	Pput_3678-79	RPPX_17655-60
	MexVW	PP_0906-07	T1E_1916-17	Pput_0945-46	RPPX_04580-85
	MuxABC-OpmB	PP_3582-85	T1E_2276-79	Pput_2186-89	RPPX_20445-60
	CzcABC	PP_0043-45	T1E_4694-96	Pput_0057-59	RPPX_09160-70
	CzcABC-II	PP_2408-10 (CzcABC-II)	T1E_5270-72	Pput_3285-87	-
	CusAB-CzcC	PP_5385-87 (CusAB-CzcC)	-	Pput_0020-22	-
MexJK	PP_1516-17	T1E_5088-89	Pput_4206-07	RPPX_15300-05	



	TriABC	PP_5173-75	T1E_4452-54	Pput_5080-82	RPPX_10610-20
	-	PP_3301-02	-	Pput_2423-24	RPPX_21700-05
	-	PP_2019-20	T1E_3569-70	Pput_3723-24	RPPX_17445-50
	-	-	T1E_4279-81 (TtgDEF)	Pput_2867-69 (SepABC)	-
	-	-	ORF86-88 (TtgGHI /pGRT1)	-	RPPX_27965-70 (SrpABC/pTT S12)
	-	-	T1E_2215	Pput_2666	RPPX_23100
	-	-	T1E_5467-69	-	-
	-	-	T1E_5521-23	-	-
Total	12	14	16	15	13

**Tableau 5. Classification des pompes RND de *P. putida* KT2440.** Les loci génétiques des 14 pompes RND de la souche KT2440 sont réparties en 4 groupes fonctionnels d'après leur Z-score. D'après Godoy *et al*, 2010.

Groupe (n°)	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
<b>Substrats potentiels</b>	Antibiotiques	Agents de stress oxydant	Métaux	Biocides Antibiotiques Métaux
	PP_1384-86	PP_2065	PP_0043-45	PP_1516-17
	PP_3455-56	PP_0906	PP_2408-10	PP_5173-75
<b>Gènes classés dans le groupe</b>	PP_2817-19	PP_3584	PP_5387	PP_3301-02
	PP_3425-27	PP_3583		

n'a pas d'homologue chez *P. aeruginosa*, et son rôle dans l'efflux de molécules antibiotiques n'a pas été étudié.

Le second groupe est composé de pompes pouvant être responsables de l'extrusion d'agents du stress oxydant. La première est codée par le locus PP\_2064-65 et la seconde, par le locus PP\_0906-07, constitués de deux gènes seulement (transporteur et protéine adaptatrice). Enfin, les deux autres gènes du groupe, PP\_3584 et PP\_3583, codent pour des transporteurs RND fonctionnant pour une même pompe, MdtABC-PP\_3582, récemment impliquée dans la sécrétion de pyoverdine, un sidérophore fluorescent (Henríquez *et al.*, 2019).

Le troisième groupe comprend trois systèmes de type RND potentiellement impliqués dans l'efflux des métaux. Les deux premières pompes, PP\_0043-45 et PP\_2408-10, correspondent à des homologues de la pompe CzcCAB, qui chez *P. aeruginosa* assure le transport d'ions métalliques comme le cobalt, le zinc et le cadmium (Nies *et al.*, 1989). La troisième est déterminée par les gènes *czcC*, *cusB*, *cusA* et *cusF* (PP\_5385-88). Apparemment conservée chez les bactéries à Gram négatif, elle permet l'export de l'argent et des ions cuivre chez *E. coli* (Franke *et al.*, 2003) (Delmar *et al.*, 2013).

Enfin, le groupe 4 est un groupe hétérogène rassemblant des systèmes encore mal caractérisés. Certains opérons ne comprennent que deux gènes (PP\_1516-17, PP\_3301-02) pour la synthèse du transporteur RND et de la protéine adaptatrice, tandis qu'un autre (PP\_5173-75) est déterminé par un locus de trois gènes codant un transporteur et deux protéines adaptatrices. Aucun de ces loci ne présente de gène codant pour une protéine de membrane externe, suggérant que ces pompes fonctionnent en collaboration avec le produit d'un autre opéron.

Comme le montre le Tableau 4, il existe une variabilité intra-espèce des systèmes RND chez *P. putida*. Seules 10 pompes d'efflux sont conservées parmi les quatre souches choisies, 3 pompes sont communes à trois souches, 3 autres à deux souches et trois systèmes sont spécifiques d'une seule souche. Nous allons maintenant aborder les systèmes absents chez la souche KT2440 et non mentionnés dans le Tableau 5. Ainsi, la souche environnementale DOT-T1E renferme 15 pompes codées par le chromosome et une d'origine plasmidique (réplicon pGRT1) (Ramos *et al.*, 1995). Comparativement à KT2440, DOT-T1E possède une tolérance relativement élevée aux solvants organiques, comme le benzène, le toluène et les xylènes en raison de la présence de trois systèmes dont (i) TtgABC, présent également chez KT2440 et détaillé dans le chapitre suivant, et (ii) TtgDEF (locus T1E\_4279-81), qui est capable d'exporter le toluène et le styrène, mais pas les antibiotiques (Mosqueda and Ramos, 2000). En amont du gène *ttgD*, se trouve un gène orienté en sens inverse, *ttgT*, codant pour un répresseur transcriptionnel de la famille IclR (Terán *et al.*, 2007). Son inactivation n'empêche pas l'induction de l'expression de *ttgDEF* par le toluène, suggérant ainsi que d'autres régulateurs participent au contrôle de l'opéron. Enfin, (iii) le système TtgGHI serait capable de conférer un haut niveau de protection contre les solvants organiques (survie de DOT-T1E en présence de 0,3% de toluène). Constitué de trois gènes situés sur le plasmide pGRT1 (Rojas *et al.*, 2001), l'opéron *ttgGHI* est activé par la présence de solvants organiques dans le milieu de culture. Soulignant la capacité de la pompe à transporter des antibiotiques, il a été montré que la délétion de *ttgGHI* chez un mutant privé de l'opéron *ttgABC* va de paire avec une baisse de la CMI de la carbénicilline (de 8 mg/L à 2 mg/L), de l'ampicilline (de 16 mg/L à 2 mg/L) et de la tétracycline (de 0,25 mg/L à 0,05 mg/L). Son activité est régulée par un opéron de deux gènes, *ttgVW*, localisé en amont de *ttgGHI* et

transcrit dans le sens opposé, codant respectivement pour un répresseur transcriptionnel de la famille IclR et son anti-répresseur (Rojas *et al.*, 2003) (Sun *et al.*, 2011). En se fixant sur une région opératrice entre *ttgV-ttgG*, le répresseur TtgV bloque la transcription de *ttgGHI* (Guazzaroni *et al.*, 2004). D'un autre côté, la délétion du gène *ttgV* active l'expression de *ttgDEF* environ 10 fois (Terán *et al.*, 2007). Il est important de noter que l'ajustement aux conditions environnementales de l'efflux médié par les systèmes RND s'intègre dans un processus global de maintien de l'homéostasie cellulaire, faisant souvent intervenir plusieurs régulateurs transcriptionnels.

La souche DOT-T1E possède, en outre, deux systèmes RND qui lui sont spécifiques et non encore caractérisés : T1E\_5467-69 et T1E\_5521-23 (Tableau 4). Une étude transcriptomique a rapporté la surexpression modeste (2,83 fois) du gène T1E\_5521 chez des bactéries soumises au toluène (Molina-Santiago *et al.*, 2017). Enfin, peu d'informations sont disponibles sur la pompe d'efflux T1E\_2215, laquelle est présente dans les souches DOT-T1E, F1 et S12, mais pas chez la souche KT2440.

La souche F1 a la capacité de dégrader le toluène et constitue, à ce titre, un modèle d'étude (Gibson *et al.*, 1968) (George *et al.*, 2011). Parmi les 15 systèmes RND codés par le chromosome, 13 sont communs avec ceux de KT2440. S'ajoutant à trois systèmes d'efflux des métaux (CzcABC-I, CzcABC-II et CusAB-CzcC), F1 a la particularité de posséder une voie de dégradation du toluène et du styrène (voie *tod*). Comme chez DOT-T1E, la pompe TtgDEF (nommée SepABC lors de sa découverte) permet à la souche F1 d'être tolérante aux solvants organiques (Phoenix *et al.*, 2003).

La souche S12, quant à elle, se rapproche de DOT-T1E par sa tolérance élevée aux solvants. Le mégaplasmide qu'elle renferme, pTTS12, porte un opéron (*srpABC*) dont les produits sont identiques aux protéines TtgGHI codées par le plasmide pGRT1 de la souche DOT-T1E (Kieboom *et al.*, 1998). L'expression des gènes *srpABC* est induite par l'exposition aux solvants via deux régulateurs, le répresseur SrpS et l'anti-répresseur SrpR (Sun *et al.*, 2011). Une seconde pompe, dénommée ArpABC, a été identifiée suite à la construction d'une banque d'insertions de transposon, chez des mutants présentant une sensibilité accrue au chloramphénicol (CMI réduite de 64 mg/L à 16 mg/L). Cette pompe possède 98% d'identité protéique avec la pompe TtgABC des souches DOT-T1E, F1 et KT2440 (Kieboom and de Bont, 2001). Toutefois, à l'inverse de TtgABC, ArpABC ne semble pas être impliquée dans la résistance de la souche S12 aux solvants.

### 3.3.2 Le système TtgABC

La première description de ce système date de 1998. TtgABC a été identifié suite à l'isolement de mutants d'insertion mini-Tn5 sensibles au toluène chez la souche DOT-T1E. Ces mutants étaient incapables de croître en présence de 90 mg/L de chloramphénicol, 400 mg/L d'ampicilline et 15 mg/L de tétracycline (Ramos *et al.*, 1998). TtgABC est très conservé chez *P. putida* puisque son opéron est retrouvé dans les 127 génomes référencés de la base *Pseudomonas* Genome DB (<http://www.Pseudomonas.com>). La comparaison du mutant DOT-T1E-18 et de la souche parentale DOT-T1E a permis de montrer que TtgABC participe à la tolérance au toluène, au styrène, au *m*-xylène, à l'éthylbenzène et au propylbenzène (Ramos *et al.*, 1998) (Rojas *et al.*, 2001). De même, TtgABC est capable d'exporter certains antibiotiques comme le chloramphénicol, l'ampicilline, la carbénicilline, la tétracycline et

l'acide nalixidique (Ramos et al., 1998) (Rojas *et al.*, 2001). Sa polyspécificité s'étend à des composés végétaux antimicrobiens présents dans la rhizosphère, niche écologique de *P. putida*, tels que la phlorétine, la quercétine et la naringénine (Terán *et al.*, 2006).

L'opéron *ttgABC* (PP\_1384-86) code pour une protéine adaptatrice (TtgA), un transporteur de type RND (TtgB) et une protéine de membrane externe (TtgC). En amont et orienté dans le sens inverse, le gène *ttgR* détermine un répresseur de la famille TetR (TtgR). La délétion de *ttgR* chez la souche DOT-T1E entraîne la surexpression du gène *ttgA* d'un facteur 20X et l'augmentation des niveaux de résistance à la carbénicilline, la tétracycline, l'ampicilline et au chloramphénicol, de 2 à 4 fois (Duque *et al.*, 2001). La protéine TtgR interagit sous forme dimérique avec une séquence pseudo-palindromique présente dans les promoteurs semi-chevauchants  $P_{ttgR}$  et  $P_{ttgA}$ , au niveau de l'espace intergénique *ttgR-ttgA* (Krell *et al.*, 2007) (Figure 9A).

L'induction de l'expression de l'opéron *ttgABC* par les antibiotiques (l'ampicilline et le chloramphénicol) et les métabolites secondaires de plantes (la naringénine, la quercétine et la phlorétine) résulte de la fixation directe de ces molécules sur la protéine TtgR. Le ligand libère le répresseur de son site de fixation, induisant ainsi la double transcription du gène *ttgR* et de l'opéron *ttgABC* (Terán *et al.*, 2003). L'analyse structurale de la protéine TtgR, à une résolution de 2,3 à 2,7 Å, liée aux différents ligands par Alguel et coll. a révélé l'existence de deux sites de fixation, distincts et non-chevauchants, des effecteurs au sein d'une poche de liaison (Alguel *et al.*, 2007) (Figures 9A, 9B). Cette poche est principalement constituée d'acides aminés hydrophobes, ce qui explique la fixation de composés aromatiques.



Les deux sites de liaison possèdent des propriétés chimiques différentes permettant ainsi à un large éventail de substrats de pouvoir interagir avec TtgR (conformation, stéréochimie, taille). Certains composés comme la phlorétine se lient même aux deux sites. La capacité de TtgR à fixer de nombreuses molécules a été exploitée avec la mise au point d'un biosenseur destiné à mesurer la contamination d'un environnement par des produits toxiques. Ce biosenseur a été obtenu en créant une fusion transcriptionnelle entre le gène de la protéine fluorescente GFP et le promoteur du gène *ttgR* (Espinosa-Urgel *et al.*, 2015). Plus récemment, l'induction de l'expression de l'opéron *ttgABC* par l'indole, un produit volatil issu du métabolisme bactérien, a été décrite chez la souche KT2440, avec de façon concomitante une baisse de sensibilité à l'ampicilline (Kim *et al.*, 2017).

### **3.4 L'efflux actif chez *P. aeruginosa***

#### 3.4.1 Les systèmes RND de *P. aeruginosa*

Le génome de la souche PAO1 code pour 12 systèmes d'efflux de type RND, recensés dans le Tableau 6. Quatre d'entre eux sont considérés comme ayant un impact clinique potentiel dans la résistance aux antibiotiques ; il s'agit des systèmes MexAB-OprM, MexCD-OprJ (Köhler *et al.*, 1996), MexEF-OprN (Köhler *et al.*, 1997a) et MexXY(OprM) (Aires *et al.*, 1999) (Mine *et al.*, 1999). Le système MexXY(OprM) ayant été particulièrement étudié au cours de la thèse, il sera traité dans un chapitre spécifique (Voir chapitre 3.5.2, « Le système MexXY(OprM) »).



**Tableau 6 : Liste des pompes d'efflux de la famille RND chez la souche de *P. aeruginosa*, PAO1.**

	Substrats antibiotiques	Substrats non antibiotiques	Régulateurs	Références
<b>MexAB-OprM</b>	$\beta$ -lactamines (sauf imipénème)	Colorants	MexR	(Poole <i>et al.</i> , 1993)
	Fluoroquinolones	SDS	NalC	(Poole <i>et al.</i> , 1996a)
	Tétracyclines	Chlorexidine	NalD	(Srikumar <i>et al.</i> , 1997)
	Macrolides	Bromure d'éthidium	CpxR	(Evans <i>et al.</i> , 1998)
	Chloramphénicol	Solvants organiques	RocS1-RocS2- RocA2	(Morita <i>et al.</i> , 2006) (Tian <i>et al.</i> , 2016)
	Novobiocine	Homosérine-lactones	BrIR	(Maseda <i>et al.</i> , 2004)
	Triméthoprim	Triclosan	PA3225	(Hall <i>et al.</i> , 2017)
	Sulfonamides		MdrR1-MdrR2	(Heacock-Kang <i>et al.</i> , 2018)
	<b>MexCD-OprJ</b>	Fluoroquinolones	Chlorexidine	NfxB
Macrolides		Triclosan	EsrC	(Chuanchuen <i>et al.</i> , 2001)
Chloramphénicol				(Fraud <i>et al.</i> , 2008)
Novobiocine				(Okazaki and Hirai, 1992)
Tétracyclines				(Purssell <i>et al.</i> , 2015)
Triméthoprim				(Köhler <i>et al.</i> , 1996)
Céfépime				
Cefpirome				
Ceftazidime				
<b>MexEF-OprN</b>	Fluoroquinolones	HHQ	MexT	(Köhler <i>et al.</i> , 1997a)
	Tétracyclines		MexS	(Maseda <i>et al.</i> , 2004)
	Chloramphénicol		MvaT	(Köhler <i>et al.</i> , 1999)
	Triméthoprim		CmrA	(Lamarche and Déziel, 2011)
			ParRS	(Sobel <i>et al.</i> , 2005) (Westfall <i>et al.</i> , 2006)
<b>MexXY(OprM)</b>	Aminosides	Acriflavine	MexZ	(Aires <i>et al.</i> , 1999)
	Fluoroquinolones	Bromure d'éthidium	ParRS	(Mine <i>et al.</i> , 1999)
	Céfépime		AmgRS	(Westbrock-Wadman <i>et al.</i> , 1999)
	Macrolides			(Muller <i>et al.</i> , 2011a)
	Tétracyclines			(Lau <i>et al.</i> , 2015)

<b>MexGHI-OpmD</b>	Norfloxacine Vanadium	Bromure d'éthidium Acriflavine Rhodamine 6G 5-méthylphénazine-1- carboxylate	SoxR	(Aendekerk <i>et al.</i> , 2002) (Sakhtah <i>et al.</i> , 2016) (Sekiya <i>et al.</i> , 2003) (Palma <i>et al.</i> , 2005)
<b>MexJK(OprM)</b> <b>MexJK(OpmH)</b>	Tétracyclines Erythromycine	Triclosan	MexL	(Chuanchuen <i>et al.</i> , 2002) (Chuanchuen <i>et al.</i> , 2005)
<b>MexPQ-OpmE</b>	Fluoroquinolones Tétracyclines Macrolides Chloramphénicol	Hoechst 33342 Tétraphénylphospho- nium chlorure		(Mima <i>et al.</i> , 2005)
<b>MexVW(OprM)</b>	Fluoroquinolones Tétracyclines Chloramphénicol Erythromycine	Bromure d'éthidium Acriflavine		(Li <i>et al.</i> , 2003b)
<b>MexMN(OprM)</b>	Chloramphénicol Aztréonam Carbénicilline Moxalactam Sulbénicilline Ticarcilline Témocilline		MmnRS	(Mima <i>et al.</i> , 2005) (Ranjitkar <i>et al.</i> , 2019)
<b>TriABC(OpmH)</b>		Triclosan		(Mima <i>et al.</i> , 2007) (Ntreh <i>et al.</i> , 2016) (Weeks <i>et al.</i> , 2015)
<b>MuxABC- OpmB</b>	Aztréonam Macrolides Novobiocine Tétracyclines			(Mima <i>et al.</i> , 2009)
<b>CzcABC</b>		Cadmium Cobalt Zinc		(Nies, 1995)
<b>PA1435- PA1436</b>				Non caractérisé

L'opéron de trois gènes *mexAB-oprM* code pour un transporteur de type RND (MexB), une protéine adaptatrice (MexA) et une protéine de membrane externe (OprM) (Poole *et al.*, 1993). Exprimé de façon significative mais variable au cours de la phase de croissance, il participe à la résistance naturelle de la bactérie aux fluoroquinolones, aux  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipénème, aux tétracyclines, aux macrolides, au chloramphénicol, à la novobiocine, au triméthoprime et aux sulfonamides (Poole *et al.*, 1996a) (Srikumar *et al.*, 1997). En plus de ces substrats, la pompe peut exporter des solvants organiques tels que le toluène (Li and Poole, 1999), des colorants organiques tel que le cristal violet (Srikumar *et al.*, 1998), des molécules signal du *quorum sensing* telles que les homosérines-lactones (Evans *et al.*, 1998) et même des inhibiteurs de  $\beta$ -lactamases (Li *et al.*, 1998). Plusieurs régulateurs modulent l'expression de *mexAB-OprM* dont MexR, un régulateur « local » appartenant à la famille MarR. Son gène, localisé en amont de l'opéron *mexAB-OprM*, est souvent la cible de mutations inactivatrices chez les souches cliniques qui acquièrent ainsi une résistance de bas niveau à divers substrats de la pompe (mutants *nalB*). La protéine MexR est elle-même sous le contrôle d'un anti-répresseur, dénommé ArmR (Daigle *et al.*, 2007), capable de la séquestrer et de l'empêcher de se fixer sur la région opératrice en amont de *mexAB-oprM*. MexR ne peut plus alors jouer son rôle de répresseur et l'opéron est activé. L'interaction entre MexR et son anti-répresseur a été étudiée par cristallographie à une résolution de 1,8 Å. Ainsi, lors de la formation du complexe MexR/ArmR, une hélice  $\alpha$  C-terminale d'ArmR vient occuper une cavité hydrophobe au sein du dimère MexR, le stabilisant sous une forme particulière et l'empêchant de se lier à l'ADN (Wilke *et al.*, 2008). NalD, un autre répresseur de l'opéron *mexAB-oprM*, appartient à la famille TetR (Morita *et al.*, 2006). D'autres régulateurs encore ont été décrits tels que PA3225 (Hall *et al.*, 2017),

Mdr1 et Mdr2 (Heacock-Kang *et al.*, 2018) et le système à deux composants RocS-RocA (Sivaneson *et al.*, 2011). La délétion de leurs gènes chez PAO1 provoque la surexpression des gènes *mexAB* (entre 2,3 et 8 fois). Par ailleurs, les régulateurs de réponse BrlR et CpxR peuvent eux aussi dans certaines conditions d'activation aboutir au même résultats. Toutefois, les niveaux de résistance des mutants *nalB* sont les plus élevés (Liao *et al.*, 2013) (Tian *et al.*, 2016).

Le système MexCD-OprJ a été identifié par l'équipe de K. Poole en 1996 chez des mutants surproducteurs (*nfxB*) résistants aux fluoroquinolones (Poole *et al.*, 1996b). La pompe exporte, par ailleurs, les macrolides, le chloramphénicol, la novobiocine, la tétracycline, le triméthoprim, les  $\beta$ -lactamines zwitterioniques céfépime et ceftiofime, le triclosan et la chlorhexidine (Srikumar *et al.*, 1997) (Chuanchuen *et al.*, 2001). Les mutants surproduisant MexCD-OprJ présentent le plus souvent des mutations inactivatrices dans un gène, *nfxB*, dont le produit réprime à la fois l'expression de l'opéron adjacent *mexCD-oprJ* et celle de *nfxB* (Okazaki and Hirai, 1992). Paradoxalement, la multirésistance de ces mutants s'accompagne d'une sensibilité accrue à d'autres antibiotiques tels que les aminosides et certaines  $\beta$ -lactamines (ticarcilline, aztréonam, imipénème) en raison de la répression concomitante des opérons *mexXY* (Jeannot *et al.*, 2008) et *mexAB-oprM* et/ou d'un défaut d'induction de la  $\beta$ -lactamase naturelle AmpC (Gotoh *et al.*, 1998) (Masuda *et al.*, 2001). Une étude réalisée au laboratoire a montré que, parmi 110 souches cliniques résistantes à la ciprofloxacine (CMI  $\geq$  0,5 mg/L), 4 (3,6%) présentaient une altération du gène *nfxB* corrélée à une résistance plus élevée à la ciprofloxacine (8 fois), au céfépime (de 2 à 4 fois) et au chloramphénicol (2 fois), ainsi qu'une sensibilisation aux aminosides (de 2 à 8 fois) et aux  $\beta$ -lactamines (de 4 à 16 fois). Les mutations *nfxB* avaient un impact négatif variable sur la

production de plusieurs facteurs de virulence, notamment les rhamnolipides, l'élastase, la phospholipase C et la pyocyanine (Jeannot *et al.*, 2008). D'autres travaux ont révélé que les mutants *nfxB* sont plus sensibles au système du complément et moins virulents dans un modèle d'infection pulmonaire de la souris (Martínez-Ramos *et al.*, 2014). Un homologue du gène *nfxB* est également présent dans le génome de la souche PAO1, le gène *esrC* (PA4596). Sa délétion induit l'expression de l'opéron *mexCD-oprJ* d'un facteur 10X lorsque les bactéries subissent un stress membranaire par la chlorexidine. Cependant, le niveau de résistance aux fluoroquinolones des mutants *esrC* n'a pas été évalué (Purssell *et al.*, 2015). Enfin, il est à noter que l'exposition de *P. aeruginosa* à divers composés dont le chlorure de tétraphénylphosphonium, le bromure d'éthidium, la rhodamine 6G et l'acriflavine déclenche la production de la pompe MexCD-OprJ, alors que les antibiotiques ne sont pas inducteurs (Morita *et al.*, 2001a).

MexEF-OprN est la troisième pompe d'efflux présentant un intérêt en ce qui concerne la résistance aux antibiotiques (Köhler *et al.*, 1997a) (Köhler *et al.*, 1997b). Ses substrats préférentiels sont les fluoroquinolones, le chloramphénicol et le triméthoprim (Maseda *et al.*, 2000). La régulation de MexEF-OprN dépend essentiellement du produit du gène *mexT* (MexT), un activateur transcriptionnel de la famille LysR (Köhler *et al.*, 1999). Plusieurs types de mutations ont été décrites comme pouvant être à l'origine de l'expression de l'opéron *mexEF-oprN*. Certaines d'entre elles modifient la structure de MexT et la stabilisent sous une forme activée, tandis que d'autres inactivent une oxydo-réductase (MexS) dont le gène est adjacent au gène *mexT* (mutants *nfxC*) (Sobel *et al.*, 2005). Le phénotype particulier des mutants *nfxC* se caractérise par une hypersensibilité aux  $\beta$ -lactamines et aux aminosides, et une augmentation de CMI des carbapénèmes. En effet, MexT joue à la fois le rôle

d'activateur de la pompe MexEF-OprN, et de répresseur du système MexAB-OprM et de la porine OprD (la porte d'entrée des carbapénèmes dans la bactérie) (Maseda et al., 2004). Une étude transcriptomique comparant la souche sauvage PAO1 et un mutant dans lequel le gène *parR* ou *parS* a été délété, a mis en évidence une régulation positive de MexEF-OprN par le système à deux composants ParRS. Celui-ci contrôle l'expression du gène *mexS*, suggérant que l'effet des mutations implique indirectement le régulateur MexT (Wang et al., 2013). La caractérisation de clones résistants au chloramphénicol sélectionnés *in vitro* a révélé un autre type de mutants surproducteurs de la pompe MexEF-OprN, dénommés *nfxC2*. Ceux-ci présentent des altérations dans un gène, *cmrA* (PA2047), codant pour un activateur transcriptionnel de la famille AraC. Les mutations induisent un gain de fonction de la protéine CmrA et la double activation du gène *cmrA* et de l'opéron *mexEF-oprN* via MexS et MexT. La comparaison des transcriptomes d'un mutant *nfxC2* et de la souche parentale PAO1 a montré, par ailleurs, que CmrA influençait l'expression de 11 gènes, notamment du gène PA2048 situé en amont du gène *cmrA* (PA2047), dont la présence est nécessaire à l'activation de MexEF-OprN (Juarez et al., 2017). Enfin, d'autres facteurs tels que la protéine histone-like MvaT sont connues pour activer l'expression de l'opéron *mexEF-oprN* et augmenter modestement la résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques lorsqu'ils sont inactivés (Westfall et al., 2006). Plus généralement, *mexEF-oprN* est exprimé en réponse à divers stress, comme par exemple l'exposition à certains antibiotiques (chloramphénicol) (Fetar et al., 2011), à des agents nitrosants ou électrophiles (Juarez et al., 2017), ou à des molécules altérant l'enveloppe bactérienne (Tetard et al., 2019).

Au-delà des 4 pompes décrites plus haut, d'autres systèmes RND de *P. aeruginosa* se sont avérés pouvoir exporter des molécules antibiotiques sous certaines conditions, notamment

après clonage dans des plasmides d'expression. Par exemple, la surproduction du système MexGHI-OpmD contribue à augmenter la résistance de la bactérie à la norfloxacine, au bromure d'éthidium, à l'acriflavine, à la rhodamine 6G ainsi qu'au vanadium, un métal rare entrant dans la composition de certains alliages, potentiellement présent dans des environnements pollués (Aendekerk *et al.*, 2002) (Sekiya *et al.*, 2003). Cette pompe est aussi impliquée dans l'export du PQS (Aendekerk *et al.*, 2005) et du précurseur de la phénazine, le 5-méthylphénazine-1-carboxylate. Elle est sous le contrôle positif de SoxR, un régulateur transcriptionnel agissant sur un petit régulon de 6 gènes, en réponse au stress oxydant induit par l'anion superoxyde (Palma *et al.*, 2005).

Les protéines MexJK présentent la particularité de pouvoir transporter un antiseptique, le triclosan, lorsqu'elles forment une pompe tripartite avec la protéine de membrane externe OpmH, et de pouvoir exporter la tétracycline et l'érythromycine en association avec OprM. L'opéron *mexJK* est régulé par MexL, un répresseur de la famille TetR dont le gène est situé en amont de l'opéron (Chuanchuen *et al.*, 2002) (Chuanchuen *et al.*, 2005). Les protéines MexMN interagissent également avec OprM pour permettre l'efflux de divers antibactériens dont le chloramphénicol, l'aztréonam, la carbénicilline et la ticarcilline. Leur opéron (*mexMN*) est sous le contrôle d'un système à deux composants dénommé MmnRS (Mima *et al.*, 2005) (Ranjitkar *et al.*, 2019). La pompe MexPQ-OpmE compte, quant à elle, parmi ses substrats les fluoroquinolones, la tétracycline, les macrolides, le colorant Hoechst et le chlorure de tétraphénylphosphonium (Mima *et al.*, 2005). Les protéines MexVW ont une spécificité de substrats proche qui inclut les fluoroquinolones, la tétracycline, le chloramphénicol, l'érythromycine, le bromure d'éthidium et l'acriflavine (Li *et al.*, 2003b).

Enfin, la pompe MuxABC-OpmB peut prendre en charge l'aztréonam, les macrolides, la novobiocine et la tétracycline (Mima *et al.*, 2009).

Finalement, deux autres pompes RND de *P. aeruginosa* ne semblent pas impliquées dans l'efflux d'antibiotiques. Le triclosan est un substrat de TriABC-OpmH, un système original comprenant deux protéines adaptatrices (Mima *et al.*, 2007) (Weeks *et al.*, 2015), tandis que les ions zinc, cadmium et cobalt sont pris en charge par la pompe CzcCBA (Nies, 1995). Une pompe RND putative, codée par deux gènes, PA1435-PA1436, reste à caractériser.

Une étude dans laquelle les promoteurs de chaque opéron RND ont été individuellement clonés en amont des gènes rapporteurs *lux* dans un plasmide a permis d'établir que seuls *mexAB-oprM*, *mexXY*, *mexGHI-opmD*, *mexJK* *mexVW* et *muxABC-opmB* sont exprimés dans différentes conditions de culture, à des niveaux nettement supérieurs pour *mexAB-oprM* et dans une moindre mesure pour *mexJK* (Yang *et al.*, 2011).

En se basant sur les données du *Pseudomonas genome database* ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)), nous avons comparé les régions génomiques codant pour les systèmes RND chez *P. aeruginosa* PAO1 et chez *P. putida* KT2440. En nous basant sur l'identité de séquence protéique (tableau 7), nous avons déterminé l'existence de systèmes homologues entre ces deux souches, et nous avons comparé leurs locus génétiques (Figure 10).

### 3.4.2 Le système MexXY(OprM)

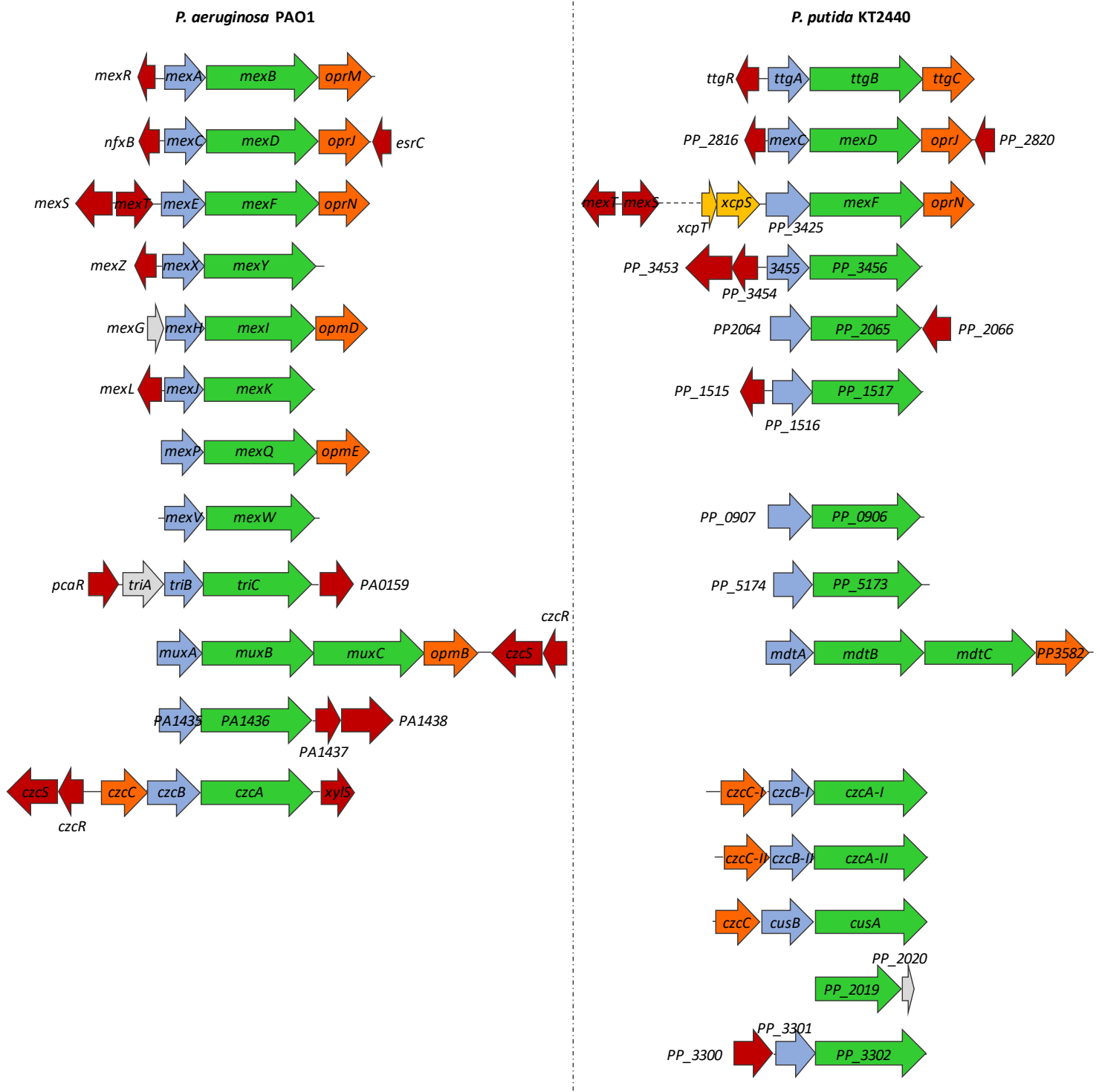
#### 3.4.2.1 Substrats de MexXY(OprM)

La première description du système d'efflux actif MexXY(OprM) chez *P. aeruginosa* remonte à 1999, année au cours de laquelle trois équipes différentes ont rapporté son identification



**Tableau 7. Identité en acides aminés entre les protéines des systèmes RND homologues chez les souches PAO1 de *P. aeruginosa* et KT2440 de *P. putida***

Système RND de <i>P. aeruginosa</i>	Identité en acides aminés des systems RND homologues chez <i>P. aeruginosa</i> / <i>P. putida</i> (%)							
	Transporteur RND		Protéine de membrane externe		Protéine adaptatrice		Régulateur associé	
MexAB-OprM	MexB/TtgB	78,4	OprM/TtgC	68,6	MexA/TtgA	68	MexR/TtgR	<30
MexCD-OprJ	MexC/MexC	72	OprJ/OprJ	74,9	MexD/MexD	82	nfxB/PP2816	47,9
MexEF-OprN	MexF/MexF	88,8	OprN/OprN	78,5	MexE/PP3425	70,9	MexT/PP2828	84,4
							MexS/PP2827	57,9
MexXY	MexY/PP3456	55,6	-	-	MexX/PP3455	48,1	-	-
MexGHI-OpmD	MexI/PP2065	77,3	-	-	MexH/PP2064	56,6	-	-
MexJK	MexK/PP1517	82,7	-	-	MexJ/PP1516	69,2	MexL/PP1515	59,5
MexVW	MexW/PP0906	82,5	-	-	MexV/PP0907	59,5	-	-
TriABC	TriC/PP5173	74,9	-	-	TriB/PP5174	59,9	-	-
MuxABC-OpmB	MuxB/MdtB	71,9	OpmB/PP3582	61,7	MuxA/MdtA	59,4	-	-
	MuxC/MdtC	59,2						
CzcABC	CzcA/CzcA-I	78,1	CzcC/CzcC-I	49,3	CzcB/CzcB-I	59,4	CzcR/PP1438	72,2
	CzcA/CzcA-II	77,6	CzcC/CzcC-II	50,9	CzcC/CzcB-II	60,1	CzcS/PP1437	47,4



**Figure 10. Comparaison des environnements géniques des gènes codant pour les systèmes d'efflux RND chez *P. aeruginosa* et *P. putida*.** A gauche sont représentés les 12 systèmes RND de la souche PAO1 et à droite, les 14 systèmes RND de la souche KT2440. Les systèmes similaires sont représentés côte à côte. En gris sont indiqués les gènes codant pour une protéine hypothétique non caractérisée, en jaune ceux ayant une fonction indépendante de la pompe d'efflux RND, en rouge les gènes des systèmes régulateurs, en bleu le gène de la protéine adaptatrice, en vert le gène du transporteur RND et en orange le gène de la protéine de membrane externe. Données issues de la base de données *Pseudomonas genome database* ([www.Pseudomonas.com](http://www.Pseudomonas.com)).

et sa caractérisation. Mine et coll. ont, les premiers, cloné les gènes *mexXY* (déterminant respectivement la protéine adaptatrice MexX et le transporteur MexY) chez la souche *E. coli* KAM3 dépourvue des gènes codant pour les protéines AcrAB. Il a été constaté que cette complémentation entraînait une augmentation de la résistance à l'acriflavine, au bromure d'éthidium, à l'érythromycine, aux fluoroquinolones, au chloramphénicol, à la kanamycine ainsi qu'à la tétracycline (Mine *et al.*, 1999). Par ailleurs, ces auteurs ont mis en évidence que les protéines de membrane externe TolC de *E. coli* et OprM de *P. aeruginosa* pouvaient s'associer aux protéines MexXY pour former un système fonctionnel. Au laboratoire, Aires et coll. ont révélé le rôle de MexXY(OprM) dans la résistance naturelle de *P. aeruginosa* aux aminosides, à la tétracycline et à l'érythromycine, à l'aide d'une banque d'insertions du transposon Tn501 chez la souche PAO1 (Aires *et al.*, 1999). Enfin, Westbrook et coll. ont décrit un mutant spontané de la souche PAO1 résistant aux aminosides, qui surexprimait l'opéron *mexXY*, dénommé par eux *amrAB* par analogie avec le système AmrAB de *B. pseudomallei* (Moore *et al.*, 1999). Ce groupe a également identifié la présence d'un represseur de la famille TetR en amont de l'opéron *mexXY* (*amrR*, aujourd'hui dénommé *mexZ*) (Westbrock-Wadman *et al.*, 1999).

Etant donné que plusieurs systèmes d'efflux actif ont des profils de substrats se superposant partiellement et incluant par exemple le chloramphénicol et les tétracyclines, l'identification des substrats respectifs de chacune des pompes Mex dites « majeures » (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN et MexXY(OprM)) a nécessité la création d'un quadruple mutant et sa recomplémentation par chaque pompe individuellement (Masuda *et al.*, 2000a). Ainsi, la délétion de l'opéron *mexXY* chez la souche PAO1 conduit à une augmentation de la sensibilité aux aminosides, aux tétracyclines et aux macrolides, tandis que sa surexpression

aboutit à une résistance accrue à ces molécules, en plus du céfépime, du cefpirome et des fluoroquinolones (Morita *et al.*, 2001b) (Hocquet *et al.*, 2006).

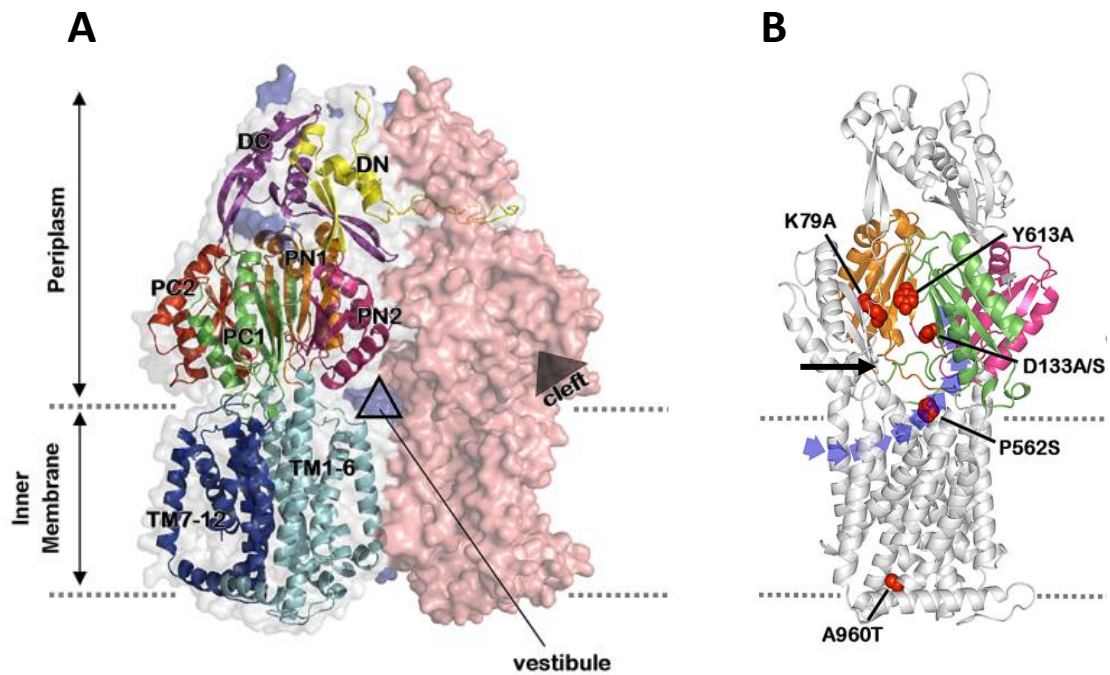
Contrairement à MexAB-OprM, l'opéron *mexXY* est dépourvu de gène codant pour une protéine de membrane externe chez la plupart des souches de *P. aeruginosa*, dont PAO1 et PA14. Seule les souches de type PA7 possèdent un tel gène, dénommé *oprA*, en aval de l'opéron *mexXY*. Une analyse de la séquence nucléotidique de la souche PAO1 a permis d'identifier un fragment d'*oprA*, suggérant la perte de ce locus au cours de l'évolution (Morita *et al.*, 2012). En plus d'OprM, d'autres protéines de membrane externe telles que OpmG, OpmI ou encore OpmH semblent pouvoir s'associer aux protéines MexXY pour former un système tripartite fonctionnel (Masuda *et al.*, 2000a) (Masuda *et al.*, 2000b) (Mine *et al.*, 1999). L'inactivation du gène *opmG* par insertion d'un transposon mini-Tn5 augmente la sensibilité de *P. aeruginosa* aux aminosides de 4 à 8 fois, celle du gène *opmI* de 4 à 16 fois et celle du gène *opmH* de 2 à 8 fois (Jo *et al.*, 2003). A noter que la protéine OprM ne serait pas l'orthologue de TolC de *E. coli*. Contrairement à *opmG* et *opmI*, *opmH* est un gène isolé ne faisant pas partie d'un opéron, ce qui suggère que son produit (OpmH) pourrait être un partenaire occasionnel de MeXY (Jo *et al.*, 2003). Dans une certaine limite, les protéines de membrane externe associées aux systèmes RND sont interchangeable (Poole, 2001) (Gotoh *et al.*, 1995).

L'analyse de la structure de MexY indique la présence de 12 segments transmembranaires (TMS) connectés entre eux par des boucles périplasmiques (Murakami *et al.*, 2002). Ainsi, les deux boucles, reliant les TMS 1 et 2 (boucle 1/2), et reliant les TMS 7 et 8 (boucle 7/8), sont allongées d'environ 300 résidus. Ces deux domaines périplasmiques déterminent la

sélectivité de substrats de la pompe MexXY(OprM). Leur remplacement par celles de MexB rend la pompe chimérique capable d'exporter les substrats de MexAB-OprM. Toutefois MexY(1/2–7/8 MexB) n'est plus capable d'interagir avec MexX, mais s'associe avec MexA (Eda *et al.*, 2003). Ces données montrent que les boucles périplasmiques de chaque système d'efflux possèdent une structure et une séquence spécifiques, leur permettant de reconnaître et d'interagir avec la protéine adaptatrice.

Il est intéressant de noter que des mutations spécifiques dans la poche de liaison du substrat (poche d'accès proximale) sont capables de modifier l'efficacité de MexXY(OprM) en modulant l'affinité de la pompe pour les aminosides. Ainsi, la substitution en alanine des résidus D133 et Y613 augmente la sensibilité aux aminosides par défaut de transport, tandis que la mutation K79A a un effet contraire (Figure 11) (Lau *et al.*, 2014).

La polyspécificité de MexY englobe des substrats ayant des propriétés physicochimiques très différentes, allant de molécules hydrophobes telles que les macrolides à des substances polycationiques hydrophiles comme les aminosides. En effet, au sein des principales poches de liaison des substrats, le transporteur présente un aspect en mosaïque associant des zones moyennement lipophiles (contrairement à AcrB qui est très peu lipophile) et des zones électrostatiques (Ramaswamy *et al.*, 2018). La comparaison des séquences en acides aminés des poches distale (DP) et proximale (AP) de MexB et MexY montre une plus faible identité (seulement 35%) que dans le reste de ces protéines (67%). Par ailleurs, la proportion d'acides aminés polaires (32% chez MexB, 23% chez MexY) ou chargés (11% chez MexB, 16% chez MexY) présents dans ces poches suggèrent l'existence de différences dans la reconnaissance de substrats (Ramaswamy *et al.*, 2018). Enfin, les résidus de la trappe hydrophobe (ou HP-trap), une petite cavité riche en phénylalanines située dans la poche

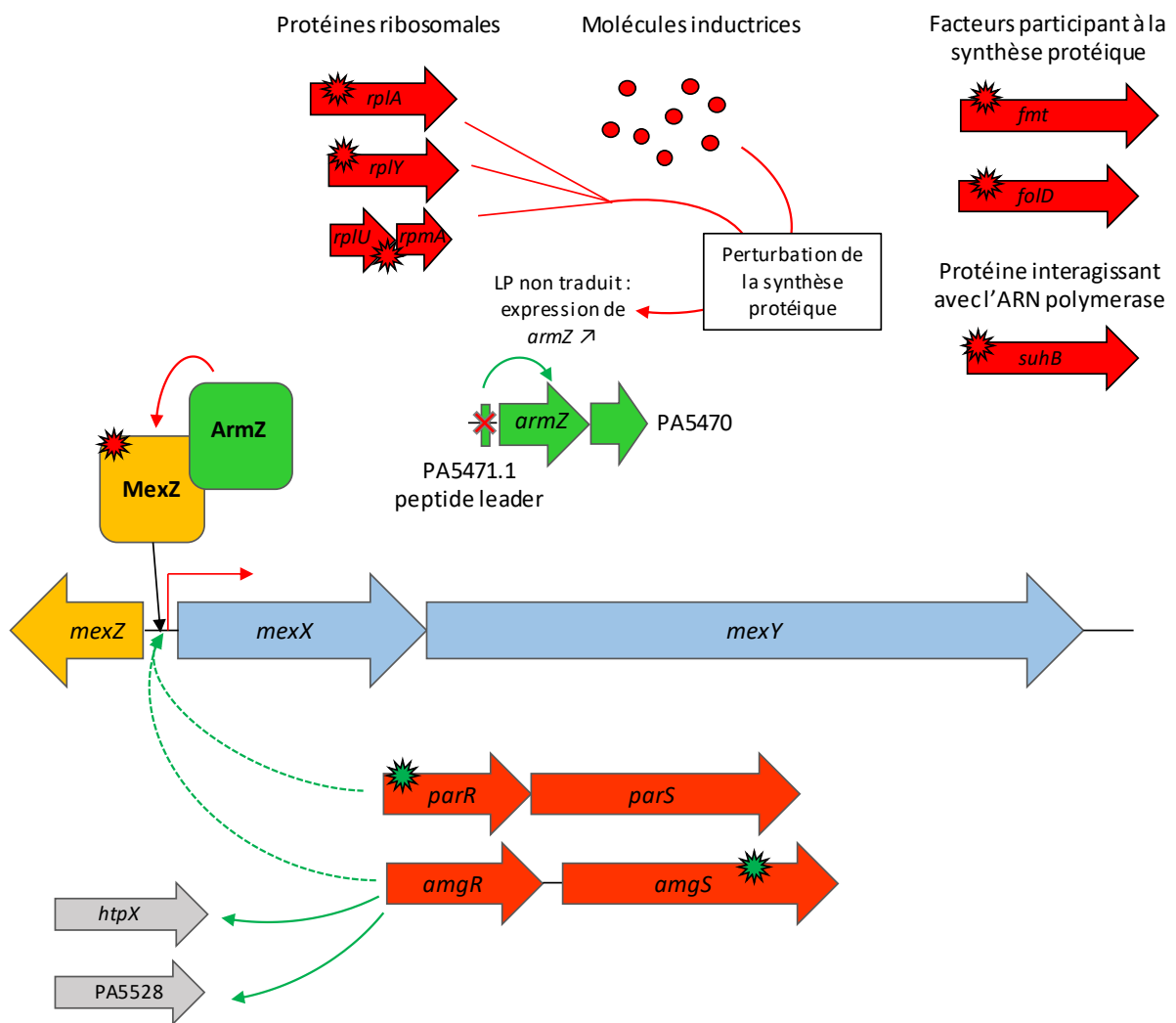


**Figure 11. Localisation des mutations impactant la résistance aux antibiotiques au sein d'un monomère de MexY.** **A.** Modèle d'un trimère de MexY reconstruit par modélisation. Les trois monomères sont colorés en rose, gris et bleu. Seule la structure du monomère gris est développée. Les différents sous-domaines sont représentés par différentes couleurs ; la partie N-terminale du domaine d'ancrage en jaune (DN), la partie C-terminale du domaine d'ancrage en violet (DC), les quatre sous-domaines du domaine du pore en orange (PN1), rose (PN2), en vert (PC1) et en rouge (PC2) et les segments du domaine transmembranaire en bleu clair (TM1-6) et bleu foncé (TM7-12). **B.** Monomère de MexY sur lequel sont représentées les mutations impactant la résistance aux antibiotiques. La poche d'accès proximale est mise en évidence par une flèche noire (Lau *et al*, 2014).

distale, sont parfaitement conservés dans les protéines MexB et AcrB, mais très différents dans MexY (Nakashima *et al.*, 2013). Cette cavité serait la zone de fixation des inhibiteurs d'efflux (Opperman and Nguyen, 2015). En dépit d'une structure générale très conservée au sein des pompes de type RND, la protéine MexY affiche des spécificités en lien avec sa fonction physiologique et la nature des substrats dont MexXY(OprM) assure l'efflux.

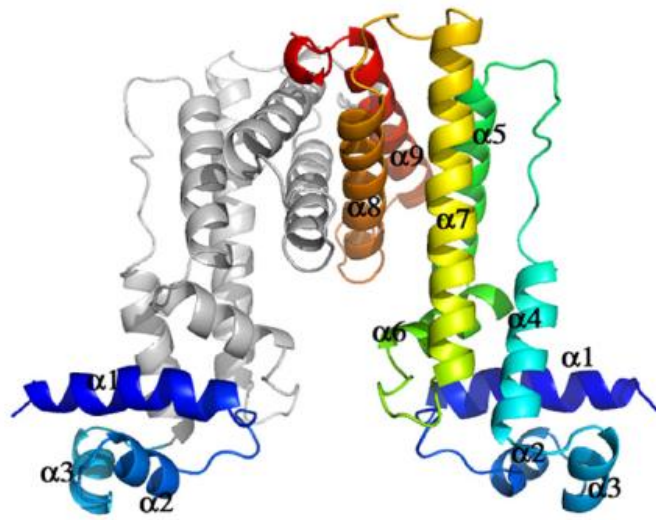
#### 3.4.2.2 Régulation de l'opéron *mexXY*

Les voies de régulation de l'opéron *mexXY* sont représentées sur la Figure 12. En amont de l'opéron *mexXY* et disposé en sens inverse, le gène *mexZ* code pour un régulateur transcriptionnel de la famille TetR dont la structure a été résolue en 2010 (Aires *et al.*, 1999) (Westbrock-Wadman *et al.*, 1999) (Alguel *et al.*, 2010). Cette protéine s'assemble pour former un dimère dont chaque monomère est composé de 9 hélices  $\alpha$  comprenant un domaine de liaison à l'ADN (hélices  $\alpha$ 1- $\alpha$ 3) et un domaine C-terminal (CTD) de fixation du ligand, entre les hélices  $\alpha$ 4 et  $\alpha$ 9 (Alguel *et al.*, 2010) (Figure 13). La région intergénique entre *mexX* et *mexZ* comprend les promoteurs chevauchants de ces deux gènes (Yamamoto *et al.*, 2009). Des expériences de retard sur gel ont montré que le dimère MexZ se fixe sur une séquence palindromique de 20 pb au sein de cette région promotrice, ce que empêche la transcription à la fois de l'opéron *mexXY* et du gène *mexZ* (Matsuo *et al.*, 2004). Une étude de 2014 sur 57 isolats cliniques surexprimant l'opéron *mexXY* a révélé que 44 d'entre eux (77%) renfermaient des mutations inactivant le gène *mexZ*. Ces mutants ont été dénommés *agrZ* pour « *aminoglycoside resistant depending on gene mexZ* » (Guénard *et al.*, 2014) (Llanes *et al.*, 2004).



**Figure 12. Régulation de l'opéron *mexXY* chez la souche PAO1.** L'opéron *mexXY* est représenté au centre et sa régulation par des flèches vertes (activation) ou rouges (repression). Les traits pleins représentent une régulation directe, et les pointillés une régulation indirecte. Les gènes ne participant pas à la régulation de l'opéron *mexXY* sont en gris, en orange les systèmes à deux composants, en jaune le répresseur MexZ et son gène, en vert l'antirépresseur ArmZ et son gène, en rouge les gènes perturbant le LP PA5471.1 et en bleu l'opéron *mexXY*. Les mutations ayant un impact sur la fonction sont représentées par des étoiles rouges (perte de fonction, inactivation) ou verte (gain de fonction).





**Figure 13: Structure en 3D du dimère de MexZ.** Les hélices  $\alpha 1$ - $\alpha 3$  correspondent au domaine de liaison à l'ADN (en bleu foncé) et les hélices  $\alpha 4$ - $\alpha 9$  permettant la reconnaissance du ligand. La dimérisation s'effectue à l'interface des hélices  $\alpha 8$ - $\alpha 9$  (Alguel *et al*, 2010).

Les antibiotiques inhibant la synthèse protéique comme les tétracyclines, les aminosides, les macrolides et le chloramphénicol induisent, à concentration subinhibitrice, l'expression de *mexXY* (Jeannot *et al.*, 2005). Cette induction requiert la présence d'une protéine, ArmZ (gène PA5471), qui interagit avec la partie N-terminale de MexZ pour l'empêcher de se fixer sur la région promotrice *mexX-mexZ* (Hay *et al.*, 2013) (Kawalek *et al.*, 2019). A une distance de 250 pb en amont du gène PA5471 (*armZ*), une petite séquence nucléotidique code pour un peptide leader (LP) de 13 acides aminés, annoté PA5471.1. Dans des conditions standard de croissance (sans antibiotique), l'ARN messenger de PA5471.1 forme une structure de type tige-boucle qui constitue un signal de terminaison bloquant la transcription en aval de PA5471 et d'un gène codant pour un *peptide Releasing Factor* accessoire (PA5470) (Morita *et al.*, 2009). Lorsque la synthèse protéique est ralentie par des mutations ou des antibiotiques ciblant le chromosome, cette structure secondaire n'est plus formée et l'opéron PA5471-PA5470 est transcrit (Morita *et al.*, 2009). Il s'agit d'une régulation directe par atténuation de la transcription. L'antirépresseur ArmZ séquestre alors MexZ, levant la répression exercée sur l'opéron *mexXY* et activant l'efflux des substrats de la pompe. Des composés antimicrobiens en développement, comme l'argyrine B, sont également capables d'activer la production des protéines MexXY. Ce peptide cyclique produit par les myxobactéries et les actinomycètes se fixe sur le facteur d'élongation EF-G et ainsi inhibe l'assemblage du complexe ribosomal nécessaire à la synthèse protéique. Une étude décrit la surexpression des gènes *mexX* (23 fois), *mexY* (8 fois), PA5471 (11 fois) et PA5470 (16 fois) chez la souche PAO1 cultivée en présence de 128 mg/L d'argyrine, confirmant l'activation de la voie de régulation ArmZ (Jones *et al.*, 2017).

En l'absence d'inhibiteur dans le milieu de culture, l'expression de l'opéron *mexXY* peut être rendue constitutive par des mutations altérant divers constituants du ribosome comme les protéines L1 (gène *rplA*) (Westbrock-Wadman *et al.*, 1999), L25 (*rplY*) (El'Garch *et al.*, 2007) et L21/L27 (opéron *rplU-rpmA*) (Lau *et al.*, 2012), ou d'autres nécessaires à la traduction comme la méthionyl-tRNA formyltransférase FMT (*fmt*) et l'oxydase FOLD (*fold*), une enzyme de la biosynthèse du folate, principal donneur de groupement formyl (Caughlan *et al.*, 2009).

Par ailleurs, Fraud et Poole ont obtenu des résultats suggérant que l'antirépresseur ArmZ est sensible aux espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species*, ROS) et au peroxyde d'hydrogène, ce qui provoque la surexpression de *mexXY* mais sans résistance associée (tétracycline et aminosides) (Fraud and Poole, 2011). Les auteurs suggèrent qu'une exposition prolongée des bactéries au stress oxydant, comme c'est le cas lors de la colonisation chronique de voies aériennes dans la mucoviscidose, pourrait favoriser l'émergence de mutants surproduisant la pompe MexXY(OprM) (Shawar *et al.*, 1999) (Fraud and Poole, 2011). Enfin, l'inactivation de la protéine SuhB aurait pour conséquence d'activer la production des protéines MexXY *via* la voie ArmZ. SuhB interagit avec l'ARN polymérase et régule de nombreux facteurs de virulence, tels que les systèmes de sécrétion de type III et IV, ainsi que la formation de biofilm (Li *et al.*, 2013) (Shi *et al.*, 2015).

La caractérisation de mutants résistants sélectionnés *in vitro* à partir de la souche PAO1 a permis à notre équipe d'identifier un nouveau type de mutations n'activant pas la voie ArmZ et n'affectant pas le régulateur MexZ. Ces mutants ont été appelés *agrW* par opposition aux mutants *agrZ* déjà cités. Ainsi, a été mise en évidence une mutation dans le gène *parR*, qui code pour le régulateur de réponse d'un système à deux composants (S2C) dénommé ParRS.

L'augmentation de l'activité phosphokinase de ParR entraîne la surexpression des opérons *mexXY*, *arnBCADTEF*, ainsi que la répression du gène (*oprD*) de la porine spécifique OprD, porte d'entrée des carbapénèmes dans la cellule (Muller et al., 2011). Ce S2C, qui intervient à la fois dans la résistance aux aminosides, aux carbapénèmes et aux polymyxines, sera présenté plus en détail dans le chapitre 3.5.

Un second S2C, dénommé AmgRS et homologue à CpxRA de *E. coli*, est à l'origine de la surproduction des protéines MexXY en réponse à un stress de membrane. L'activité des aminosides sur le ribosome conduit à l'accumulation de peptides aberrants, mal repliés, qui altèrent la membrane cytoplasmique (Busse et al., 1992). Le senseur AmgS pourrait percevoir la présence de ces peptides et activer une réponse adaptative permettant le maintien de l'intégrité membranaire (Lee et al., 2009b). Le régulon d'AmgR englobe 173 gènes (89 réprimés et 84 activés) dont un codant la protéase HtpX, localisée dans la membrane cytoplasmique (Lee et al., 2009b), et un autre, PA5528, dont la fonction est inconnue (Hinz et al., 2011). Ces deux protéines participent à la résistance intrinsèque aux aminosides. La substitution R182C dans le senseur AmgS conduit à la surexpression des deux gènes (*htpX* et PA5528), ainsi qu'une résistance 2 à 4 fois supérieure aux aminosides (Lau et al., 2013). Des résultats similaires ont été observés chez un mutant V121G de la souche PAO1 (Lau et al., 2015). Par ailleurs, l'exposition de PAO1 au ZnCl<sub>2</sub> provoque la dépolarisation de la membrane cytoplasmique, l'activation du système AmgRS et la surexpression de l'opéron *mexXY*. Cependant, le fait que cette surexpression ne soit pas abolie par l'inactivation de l'opéron *amgRS* suggère l'intervention d'un autre S2C dans la dérégulation de *mexXY*, notamment ParRS. Il est à noter que AmgRS contribue à la protection de *P. aeruginosa* contre le ZnCl<sub>2</sub>, indépendamment de la pompe MexXY(OprM).

Parallèlement, l'exposition de la bactérie au  $ZnCl_2$  n'entraîne pas une augmentation de la résistance aux aminosides (Poole *et al.*, 2019). La Figure 12 montre les différentes voies de régulation connues de l'opéron *mexXY*.

#### 3.4.2.3 La pompe MexXY(OprM) chez les souches cliniques de *P. aeruginosa*

Les aminosides, comme la tobramycine et l'amikacine, en association avec les  $\beta$ -lactamines, sont fréquemment utilisés dans le traitement des infections aiguës et des infections chroniques à *P. aeruginosa* (Döring *et al.*, 2000). Certaines souches CF et non CF deviennent résistantes aux aminosides par l'acquisition d'enzymes modificatrices ou la surproduction de la pompe MexXY(OprM) (Vogne *et al.*, 2004) (Yoneda *et al.*, 2005) (Vettoretti *et al.*, 2009). Les niveaux de résistance conférés par le système sont généralement faibles (2 à 4 fois), mais viennent très fréquemment s'ajouter à ceux des enzymes modificatrices. Par exemple, la délétion de l'opéron *mexXY* dans la souche PA7 (produisant une AAC(6')-I) ou la souche IMCJ2.S1 (AAC(6')Iae) réduit fortement les CMI de l'amikacine (de 8 à 32 fois), de la gentamicine (de 32 fois), de la tobramycine (16 à 32 fois) et de l'arbécacine (de 16 à 64 fois) (Morita *et al.*, 2012).

Plusieurs études réalisées au laboratoire ont précisé le rôle de MexXY(OprM) dans la résistance de souches cliniques au céfépime, aux fluoroquinolones et/ou aux aminosides. Ainsi, une étude statistique a mis en évidence une corrélation entre la prévalence des mutants surproduisant la pompe et la consommation de ces antibiotiques en milieu hospitalier. Ces observations ont été confirmées par des expériences de sélection de mutants *in vitro* à partir de la souche PAO1 (Hocquet *et al.*, 2008). Un autre travail portant sur 85 souches de sensibilité réduite à la ciprofloxacine (CMI entre 0,25 et 2 mg/L) a montré

que 31 et 39 souches surproduisaient respectivement les pompes MexAB-OprM et MexXY(OprM) (Llanes *et al.*, 2011). De même, chez 38 souches pour lesquelles la CMI du céfépime (substrat de MexXY(OprM)) était plus de 4 fois supérieure à celle de la ceftazidime (non substrat), 32 surexprimaient significativement les gènes *mexXY* (Hocquet *et al.*, 2006). Enfin, l'analyse de 57 souches cliniques surproduisant MexXY(OprM) a révélé que 77% d'entre elles étaient des mutants de type *agrZ* (inactivation de MexZ), 14% des mutants *agrW1* (altération ribosomale) et 9% des mutants *agrW2* (activation de ParRS) (Guénard *et al.*, 2014).

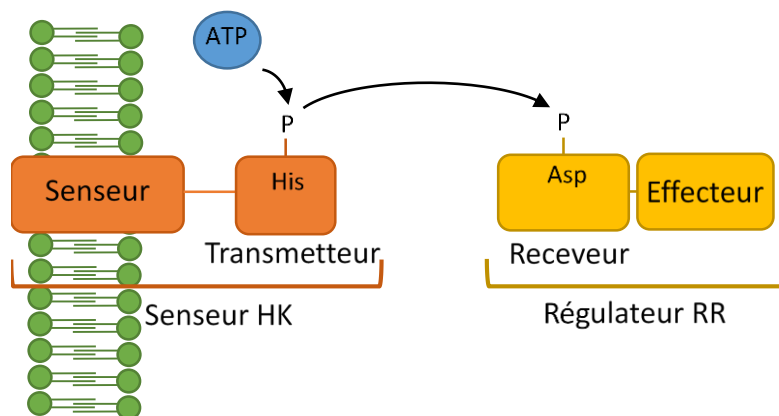
Par ailleurs, MexXY(OprM) contribue à l'émergence de la résistance aux aminosides chez les souches CF (Sobel *et al.*, 2003) (Vogne *et al.*, 2004) (Islam *et al.*, 2009). Plusieurs études génomiques rapportent l'altération très fréquente du gène *mexZ* dans le contexte de la mucoviscidose (Smith *et al.*, 2006) (Marvig *et al.*, 2015). Selon un travail récent, la prévalence des mutants surproduisant MexXY(OprM) est apparue beaucoup plus importante (65%) chez les patients colonisés de façon chronique que les patients primo-colonisés (0%) (Prickett *et al.*, 2017). Ces résultats sont en accord avec l'étude de Smith *et coll.* suggérant que les traitements répétés par aminoside favorise l'émergence et le maintien de ce type de mutants *in vivo* (Smith *et al.*, 2006). Enfin, l'analyse des génomes de 474 souches CF a permis l'identification de mutations dans le gène *mexZ* chez 40% d'entre elles, en association avec une plus grande résistance aux aminosides et aux fluoroquinolones (Frimodt-Møller *et al.*, 2018). Le gène *mexZ* de *P. aeruginosa* est donc la cible prioritaire de mutations pathoadaptatives dans la mucoviscidose.

### 3.5 Le système à deux composant ParRS

Comme nous l'avons mentionné précédemment, ParRS contrôle l'activité d'au moins trois mécanismes de résistance aux antibiotiques : (i) l'activation de la pompe MexXY(OprM) accroît l'efflux des aminosides, du céfépime, des macrolides et des fluoroquinolones (Muller et al., 2011) ; (ii) l'activation de l'opéron *arn* permet l'addition de 4-amino-4-désoxy-L-arabinose (Ara4N) au lipide A du LPS réduisant ainsi l'interaction des polymyxines avec la surface bactérienne (Fernández et al., 2010) ; (iii) la répression du gène de la porine OprD réduit la perméabilité de la membrane externe aux carbapénèmes (Muller et al., 2011).

Le système ParRS est un S2C classique, constitué d'un senseur inséré dans la membrane cytoplasmique ayant des activités d'histidine kinase (HK) et de phosphatase, et d'un régulateur de réponse cytoplasmique (RR), seul médiateur de la réponse cellulaire (Bhagirath *et al.*, 2019) (Figure 14). La protéine ParS présente deux domaines transmembranaires de 22 résidus chacun, localisés de part et d'autre d'une boucle périplasmique de 106 résidus, support de la fonction senseur (Fernández et al., 2010). Lorsqu'un effecteur extracellulaire est détecté par le senseur, celui-ci s'autophosphoryle au niveau d'un résidu histidine. Le groupement phosphate est ensuite transféré à un résidu aspartate conservé du domaine receveur du RR ParR, dont la forme phosphorylée permet au domaine effecteur d'interagir avec des séquences régulatrices en amont de gènes-cibles (Rodrigue *et al.*, 2000).

Le système ParRS a été identifié par Fernandez et coll. en 2010. La culture de la souche PAO1 en présence de certains peptides antimicrobiens cationiques tels que l'indolicidine (4 mg/L), la colistine (1 mg/L) ou la polymyxine B (1 mg/L) conduit à l'activation de ParRS et, par



**Figure 14. Structure schématique d'un système à deux composants classique.** En orange, le senseur histidine kinase (HK) et en jaune, le régulateur de réponse (RR). La cascade activatrice, dite phospho-relai, est représentée par des flèches noires. His : résidu histidine conservé du domaine transmetteur ; Asp : résidu aspartate conservé du domaine receveur. Schéma réalisé d'après Bhagirath *et al*, 2019.



conséquent, à l'induction de l'opéron *arnBCADTEF-ugd* gouvernant la synthèse d'Ara4N et son ajout sur le LPS. La délétion de l'opéron *parRS* entraîne une hypersensibilité aux polymyxines (CMI passant de 1 à 0,25 mg/L), soulignant le rôle du S2C dans la résistance naturelle à ces antibiotiques. Au laboratoire, l'analyse génomique d'un mutant de PAO1 sélectionné en présence d'amikacine (6 mg/L) et résistant aux aminosides (2 à 8 fois), aux fluoroquinolones (4 fois), au céfépime (2 fois), aux carbapénèmes (4 fois) et aux polymyxines (2 fois) a mis en évidence une substitution M59I dans la protéine ParR. Les mutants présentant un gain de fonction de ParS et/ou ParR ont été appelés *agrW2*. La multirésistance qui les caractérise s'explique par la répression du gène *oprD* et la double surexpression des opérons *mexXY* et *arnBCADTEF-ugd* (Muller et al., 2011).

En tout, trois études transcriptomiques se sont intéressées au régulon ParR, avec des approches un peu différentes. La souche sauvage PAO1 a été comparée, soit à des mutants PAO1 $\Delta$ *parS*, PAO1 $\Delta$ *parR* en présence ou non d'indolicidine, soit au mutant *agrW2* (Tableau 8). Les résultats obtenus précisent le rôle de ParRS dans une souche sauvage (Wang et al., 2013), une souche sauvage exposée à l'indolicidine (Fernández et al., 2010) et chez un mutant dont le RR ParR est activé de façon constante (Muller et al., 2011). Ils confirment l'implication de ParRS dans l'activation de l'opéron *arnBCADTEF* chez les bactéries exposées à l'indolicidine et chez le mutant ParR, ainsi que l'augmentation modeste de la résistance aux polymyxines qui en résulte. Cependant, la suppression des gènes *parRS* n'impacte pas l'expression basale de l'opéron *arn* dans la souche sauvage non exposée. En outre, le fait que le mutant ParR(M59I) surexprime le gène *mexY* en l'absence de toute exposition à des agents polycationiques démontre clairement que le S2C ParRS contrôle l'activité de la pompe MexXY(OprM) lorsqu'il est activé. L'expression de l'opéron *mexXY* n'étant pas induite

**Tableau 8. Liste des gènes sous la dépendance du système à deux composants ParRS.** Les gènes ont été identifiés par des analyses de données transcriptomiques comparant différents mutants à la souche parentale PAO1, dans diverses conditions de culture. Les noms des gènes déjà caractérisés sont écrits en gras. D'après les données de Muller et coll., 2011, Fernandez et coll., 2010, Wang et coll., 2013.

Gène (PAO1)	Nom / Fonction	Expression relative à PAO1		
		Mutant PAO1 $\Delta$ parR / PAO1 $\Delta$ parS	Mutant agrW2	Mutant PAO1 $\Delta$ parR + indolicidine (4 mg/L)
<b>Sélection de gènes activés par ParRS</b>				
PA1559-PA1560	Reductase/déshydrogénase <b>CprA</b>		28,9	-4,2
PA1797	Protéine hypothétique		45,7	-3,3
PA1942	Protéine hypothétique	-158 / -88		
PA1970	Protéine hypothétique	-499 / -170		
PA2018	Transporteur RND <b>MexY</b>		4,6	
PA2358	Protéine hypothétique		25,5	
PA2493	Protéine adaptatrice RND <b>MexE</b>	-157 / -296		
PA2494	Transporteur RND <b>MexF</b>	-658 / -429		
PA2495	Protéine de membrane externe RND <b>OprN</b>	-370 / -138		
PA2655	Protéine hypothétique		33,6	
PA2759	Protéine hypothétique	-33 / -108		
PA3229	Protéine hypothétique	-183 / -168		
PA3552	Aminotransférase <b>ArnB</b>		11	-1,6
PA3553	Glycosyltransférase <b>ArnC</b>		11,6	-2,0
PA3554	Formyltransférase <b>ArnA</b>		15,3	-2,5
PA3556	Arabinosyltransférase <b>ArnT</b>		8,5	-2,1
PA3557	Flippase <b>ArnE</b>		3,1	-3,3
PA3558	Flippase <b>ArnF</b>		9,2	
PA3559	UDP-glucose / GDP-mannose deshydrogénase <b>Ugd</b>		16,1	
PA4881	Protéine hypothétique	-561/-1640		
PA4773	Biosynthèse de polyamines <b>SpeD2</b>		36,8	-5,1
PA4774	Biosynthèse de polyamines <b>SpeE2</b>		12,5	-7,4
PA4775	Protéine hypothétique		7,1	-3,3
PA4776	Régulateur de réponse <b>PmrA</b>			-2,1
PA4777	Senseur histidine kinase <b>PmrB</b>		15,9	-1,7

**Sélection de gènes réprimés par ParRS**

PA0051	Modification des phénazines <b>PhzH</b>	2,6 / 11,8
--------	---	------------

PA0523	Réductase de l'oxyde nitrique <b>NorC</b>	5,7 / 12,2		6,0
PA0524	Réductase de l'oxyde nitrique <b>NorB</b>	3,5 / 9,4		10,7
PA0525	Protéine de dénitrification <b>NorD</b>	2,5 / 5,9		
PA0958	Porine <b>OprD</b>	6,9 / 3,1	-7,5	
PA0996	Coenzyme A ligase <b>PqsA</b>	40 / 156		
PA0997	Thiolase <b>PqsB</b>	43 / 130		
PA0998	Thiolase <b>PqsC</b>	18,7 / 60		
PA0999	3-oxoacyl-[acyl-protéine] synthase <b>PqsD</b>	17,7 / 75		
PA1000	Quinolone signal réponse <b>PqsE</b>	6,7 / 31		
PA1001	Anthranilate synthase, sous unité I <b>PhnA</b>	3,9 / 16,8		
PA1002	Anthranilate synthase, sous unité II <b>PhnB</b>	14 / 60		
PA3392	Oxyde nitreux réductase <b>NosZ</b>			2,1
PA3394	Transporteur ABC <b>NosF</b>	1 / 3,8		
PA3395	Transporteur ABC <b>NosY</b>	3,9 / 12,5		
PA3396	Nitrous oxide réductase accessoire <b>NosL</b>			2,0
PA3476	Protéine autoinductrice <b>RhII</b>	3,9 / 4,1		
PA3477	Régulateur transcriptionnel <b>RhIR</b>	2,2 / 2,4		

---

chez des bactéries mises en présence d'indolicidine, il apparaît enfin que le régulon ParR varie selon le type de stress. L'opéron *mexEF-oprN* voit son niveau basal d'expression diminuer suite à la délétion des gènes du S2C, mais aucune surexpression n'est constatée lorsque ce dernier est activé constitutivement par une mutation ParR. Un autre S2C, PmrAB, impliqué dans la résistance acquise aux polymyxines (McPhee *et al.*, 2003) se trouve également sous le contrôle positif de ParRS, de même que les gènes adjacents PA4773, PA4774 et PA4775 impliqués dans la synthèse de polyamines telles que la norspermidine (Bolard *et al.*, 2019). Le gène *cprA* est également activé par ParRS. Ce gène qui est tronqué chez PAO1 (PA1559 et PA1560) mais fonctionnel chez les souches PA14 et PAK contribue à la résistance aux polymyxines. En effet, sa délétion chez un mutant PAK *pmrB* résistant à la polymyxine B réduit fortement la CMI de la polymyxine B (de 32 à 2 mg/L) (Gutu *et al.*, 2015). Enfin, un certain nombre de gènes codant pour des protéines non caractérisées sont affectés par la délétion du locus *parRS*, tel que le gène PA4881 dont le produit est un petit peptide de 113 acides aminés. Un site de fixation de MexT est prédit en amont de PA4881 (<http://www.pseudomonas.com>).

D'autres ont une expression sous régulation négative, tels que le gène *oprD* (7,5 fois moins transcrit chez le mutant *agrW2* que dans la souche sauvage). Les gènes *rhIR* et *rhII* ainsi qu'une partie du régulon contrôlé par le système de *quorum sensing* RhIR-RhII, incluant l'opéron *pqsABCDE* (synthèse de la molécule signal PQS) et l'opéron *phnAB* (biosynthèse de la pyocyanine), sont surexprimés lorsque le gène *parR* ou *parS* est délété de la souche PAO1, ce qui démontre l'impact négatif de ParRS sur la virulence médiée par le PQS. Une augmentation de production de la pyocyanine est, par exemple, visible après inactivation de *parR*, *parS* (Wang *et al.*, 2013). Chez ces mutants, on observe aussi une augmentation de la

transcription des gènes de dénitrification *norC,B,D* et *nosF,Y,L,Z* (Fernández et al., 2010) (Wang et al., 2013) (Tableau 8). Toutes ces données montrent que le régulon de ParRS peut être relativement large, et différent selon les conditions d'induction.

## 4 Mécanismes de résistance aux polymyxines

### 4.1 Structure des polymyxines

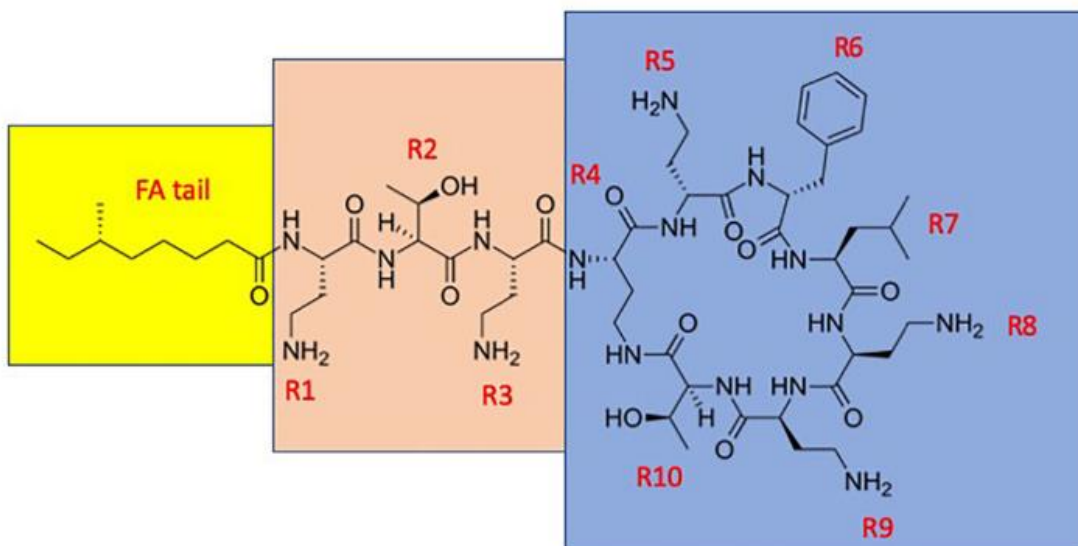
Les polymyxines sont des polypeptides antimicrobiens découverts en 1947 (Benedict and Langlykke, 1947) (Ainsworth *et al.*, 1947) (Stansly *et al.*, 1947). Ces molécules ont été commercialisées dès 1959 pour le traitement des infections à bacille à Gram négatif. Toutefois, plusieurs études ayant rapporté une forte néphrotoxicité liée à leur usage (Ryan *et al.*, 1969) (Koch-Weser *et al.*, 1970), elles ont été abandonnées au profit d'autres plus efficaces et moins toxiques, comme les quinolones et les  $\beta$ -lactamines. L'augmentation de la résistance aux antibiotiques et l'émergence de souches XDR a été à l'origine d'une réintroduction des polymyxines, surtout la colistine, dans l'arsenal thérapeutique anti-infectieux. Leur utilisation restreinte a permis jusqu'ici de préserver leur efficacité sur certaines espèces nosocomiales mais cette situation tend à se dégrader dans les pays où ces molécules sont administrées de façon régulière (Li *et al.*, 2006) (Biswas *et al.*, 2012) (Falagas and Kasiakou, 2005).

La colistine (polymyxine E) est produite par un bacille à Gram positif du sol, *Paenibacillus polymyxa* variété *colistinus*, grâce à un processus impliquant des synthétases non ribosomales (NRPS) (Finking and Marahiel, 2004). Au total, une quinzaine de polymyxines différentes sont produites par cette espèce bactérienne (Trimble *et al.*, 2016). Parmi ces molécules, deux sont utilisées en clinique : la polymyxine B et la colistine. Les polymyxines

ont un poids moléculaire d'environ 1200 Da et sont composées d'un heptapeptide cyclique et d'un tripeptide formant une chaîne latérale acylée par un acide gras à son extrémité N-terminale. Elles sont chargées positivement grâce à cinq fonctions amines libres, trois au niveau du peptide cyclique et deux sur le tripeptide de la chaîne latérale (Figure 15) (Nation *et al.*, 2014) (Li *et al.*, 2006). La structure de la polymyxine B se différencie de celle de la colistine par un acide aminé (phénylalanine/leucine) au sein de l'heptapeptide cyclique (Nation *et al.*, 2014). La colistine est administrée sous la forme d'une prodrogue, la colistine méthane sulfonate (CMS), spontanément hydrolysée dans l'organisme, tandis que la polymyxine B est administrée sous sa forme active (Li *et al.*, 2005). Les polymyxines interagissent en premier lieu avec le LPS, constituant principal du feuillet externe de la membrane externe des bactéries à Gram négatif.

#### **4.2 Structure de la paroi d'une bactérie à Gram négatif**

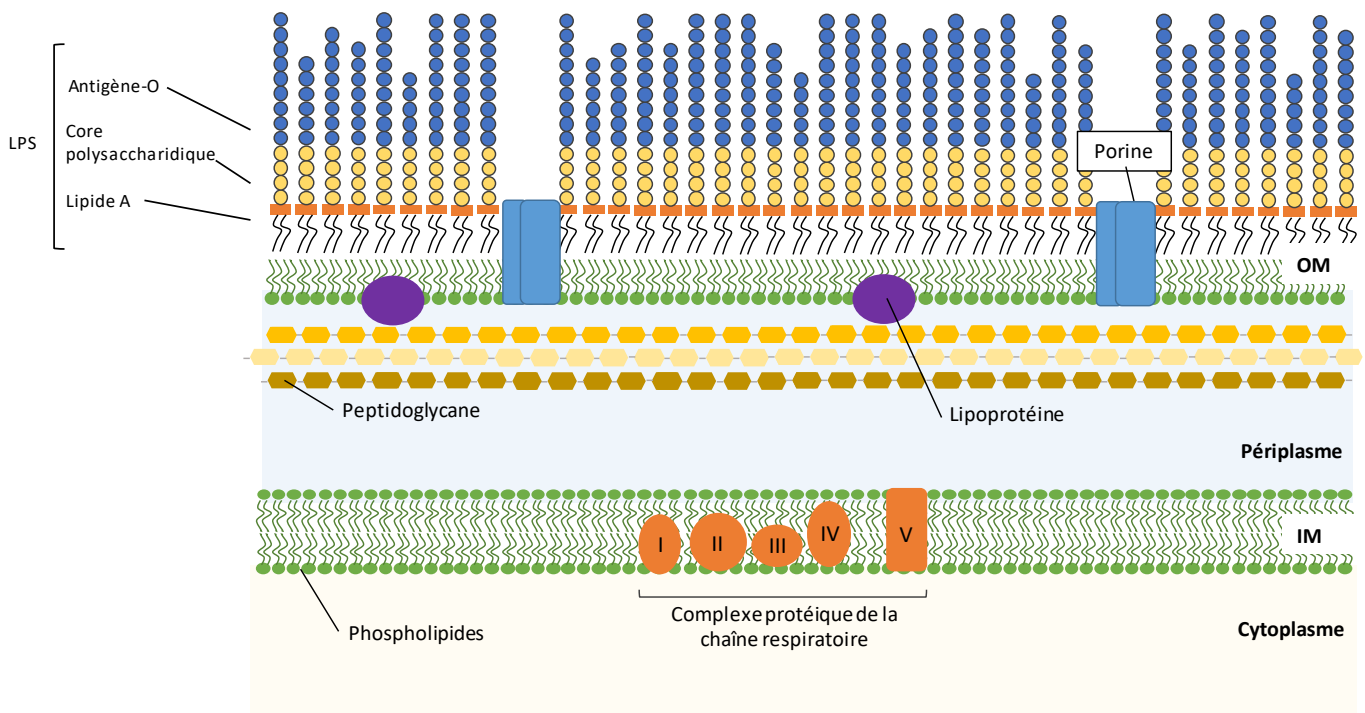
Cette paroi est composée de trois structures successives : (i) la membrane externe (OM, *outer membrane*), elle-même constituée d'un feuillet interne de phospholipides et d'un feuillet externe de glycolipides, majoritairement des lipopolysaccharide (LPS), (ii) le peptidoglycane, composé de répétitions dissaccharidiques de N-acétyl-glucosamine et d'acide N-acétyl-muramique ; (iii) et la membrane interne ou cytoplasmique (IM, *inner membrane*), bicouche phospholipidique dans laquelle de nombreuses protéines sont insérées. Cette dernière est le lieu de réactions biochimiques essentielles telles que la production d'énergie via les chaînes respiratoires, la biosynthèse des lipides et la sécrétion protéique (Silhavy *et al.*, 2010) (Figure 16).



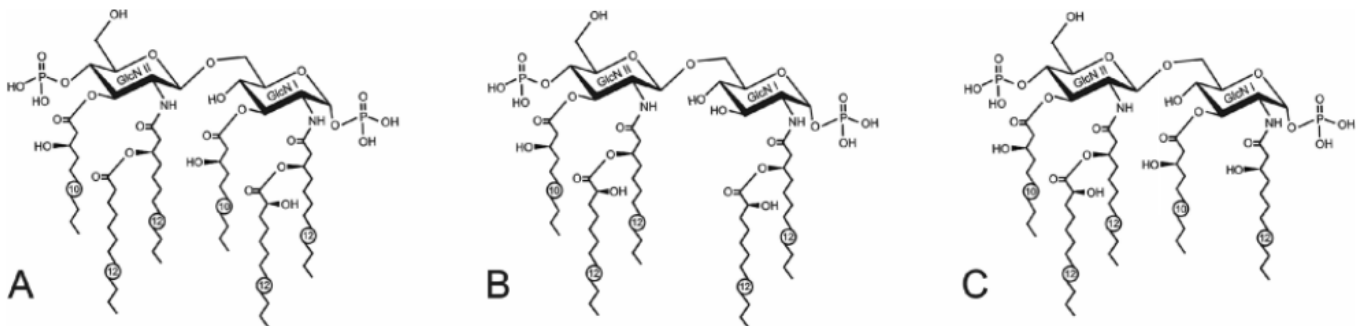
**Figure 15. Structure secondaire de la polymyxine B.** La partie cyclique hydrophile est encadrée en bleu, la chaîne hydrophobe est encadrée en rose et le résidu d'acide gras à l'extrémité est encadré en jaune. Les 10 acides aminés formant le polypeptide sont annotés R1 à R10. Les résidus de  $\alpha, \gamma$ -diaminobutyrate R1, R3, R5, R8 et R9 sont chargés positivement. La différence entre la polymyxine B et E se situe au niveau du résidu R6 (phénylalanine pour la polymyxine B et leucine pour la colistine). FA tail : fatty acyl tail. D'après Vaara, 2019.

La membrane externe est composée d'une bicouche asymétrique de phospholipides (feuillet interne) et de glycoprotéines (feuillet externe). Au sein de cette membrane figurent des lipoprotéines, ancrées dans le feuillet interne, et des protéines en tonneaux- $\beta$  (porines) traversant la membrane externe et par lesquelles diffusent passivement les petites molécules hydrophiles. Le lipopolysaccharide est le constituant principal du feuillet externe de cette membrane. L'arrangement compact de ses molécules joue un rôle majeur dans les propriétés de la membrane externe, notamment son rôle de barrière semi-perméable. Le LPS est composé (i) du lipide A (responsable du choc endotoxique lors de sa libération dans la circulation sanguine) comprenant un dissaccharide (2 unités de N-acétyl-glucosamine) sur lequel sont fixées des chaînes aliphatiques (5 à 7 selon les souches), (ii) d'un core intermédiaire et (iii) d'une chaîne polysaccharidique plus ou moins longue formée d'unités répétées de sucres et support de l'antigène O dans les LPS de type bande B (Figure 17). Toutefois, la majorité de molécules de LPS chez *P. aeruginosa* (environ 85%) ne contiennent pas d'antigène O et se terminent par un polymère neutre de D-rhamnose déterminant un antigène dit « commun » (Lam et al., 2011). Les molécules adjacentes de LPS sont reliées les unes aux autres au niveau des résidus phosphate présents sur le lipide A, par des ponts électrostatiques impliquant des cations divalents, surtout le  $Mg^{2+}$ . Les chaînes d'acides gras du lipide A sont saturées, et forment entre elles un assemblage serré pseudo-cristallin constituant une barrière efficace contre le passage des molécules hydrophiles et de la plupart des molécules hydrophobes (Silhavy *et al.*, 2010) (Plésiat and Nikaido, 1992).





**Figure 16. Représentation schématique de l'enveloppe d'une bactérie à Gram négatif.** OM : membrane externe, IM : membrane interne, LPS : lipopolysaccharide. D'après la thèse d'A. Bolard, 2019.



**Figure 17. Structures possibles du lipide A de *P. aeruginosa*.** Le lipide A chez cette espèce peut être (A) penta-acylé, (B) hexa-acylé ou (C) hepta-acylé selon les souches. La longueur préférentielle des groupements acyl est de 10 ou 12 carbones chez cette espèce. D'après Knirel *et al*, 2006.

### 4.3 Mode d'action des polymyxines

Les résidus d'acide  $\alpha,\gamma$ -diaminobutyrique des polymyxines interagissent de façon électrostatique avec les groupements phosphate du lipide A, rompant les ponts formés par les cations divalents et le packaging des molécules de LPS (Trimble *et al.*, 2016). A la manière d'un détergent, l'insertion des polymyxines désorganise la membrane externe, qui se décolle par endroits pour former des boursoufflures (*blebs*) et devient perméable aux molécules hydrophobes ou amphipathiques (Dixon and Chopra, 1986). L'ajout de cations divalents dans le milieu de culture tend à contrecarrer ces effets (Chen and Feingold, 1972) (Schindler and Osborn, 1979).

L'origine de l'effet bactéricide des polymyxines n'est pas encore complètement élucidée. En revanche, le modèle dit « self-promoted uptake » rendant compte de l'action initiale des polymyxines sur la membrane externe est accepté assez largement. Ce modèle prend en compte la structure amphiphile et rigide (structure en anneau) de ces antibiotiques, dont une partie interagit avec les groupements hydrophiles (phosphate) des molécules de LPS et la partie hydrophobe avec les longues chaînes acylées du lipide A.

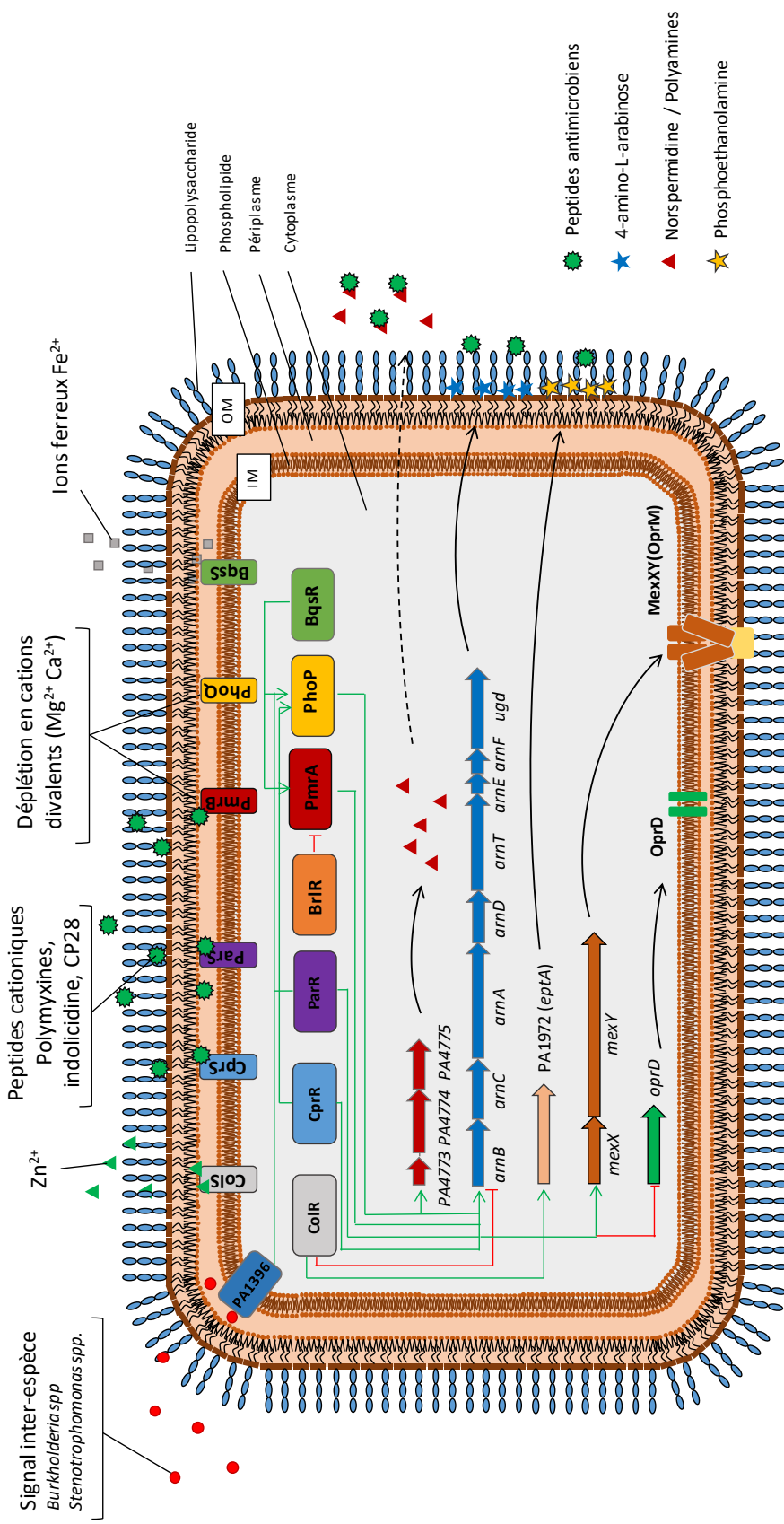
La suite du processus bactéricide fait l'objet de diverses hypothèses dont (i) la rupture de l'intégrité de la membrane cytoplasmique par les polymyxines, conduisant à la fuite des constituants intra-cellulaires (Velkov *et al.*, 2010) (Poirel *et al.*, 2017), (ii) la fusion du feuillet périplasmique de la membrane externe avec le feuillet périplasmique de la membrane interne, ce qui provoquerait un échange des phospholipides entre les deux membranes et une déstabilisation de la balance osmotique (Velkov *et al.*, 2013) (Clausell *et al.*, 2003), (iii) l'inhibition de certaines enzymes des chaînes respiratoires (Deris *et al.*, 2014), (iv) la

libération d'espèces réactives de l'oxygène (Yu *et al.*, 2017), et enfin (v) la fixation des polymyxines sur l'ADN (chargé électronégativement) aboutissant à l'inhibition de la réplication et de la transcription du chromosome (Kong *et al.*, 2011).

#### **4.4 Mécanismes de résistance aux polymyxines chez *P. aeruginosa***

Chez cette espèce, la résistance aux polymyxines est due principalement à l'ajout de 4-amino-4-désoxy-L-arabinose (Ara4N) sur 1 ou 2 groupements phosphate (position 1' ou 4') du lipide A. Les enzymes responsables de la synthèse, du transport et de la fixation de cette molécule sur le lipide A sont codées par l'opéron de 8 gènes *arnBCADTEF-ugd* (ou opéron *arn*) (Trent *et al.*, 2001) (McPhee *et al.*, 2003). Ce dernier est finement régulé par plusieurs S2C sensibles à des stimuli environnementaux, tels que (i) de fortes concentrations d'ions  $Zn^{2+}$  (système ColRS (Nowicki *et al.*, 2015)), (ii) un appauvrissement du milieu extérieur en  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  (systèmes PhoPQ (Macfarlane *et al.*, 1999) et PmrAB (McPhee *et al.*, 2003)), ou (iii) l'effet sur les membranes de divers agents polycationiques antimicrobiens (systèmes PmrAB, ParRS (Fernández *et al.*, 2010) et CprRS (Fernández *et al.*, 2012)) (Figure 18).

Le système PhoPQ identifié chez *P. aeruginosa* est homologue à un S2C du même nom décrit chez *Salmonella enterica*. Non activé par une exposition de la bactérie aux polymyxines ou d'autres peptides antimicrobiens, il est sensible à la carence du milieu extérieur en ions  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  (Macfarlane *et al.*, 1999) (McPhee *et al.*, 2006). Contrairement à d'autres S2C, la phosphorylation du senseur PhoQ entraîne l'inactivation, et non l'activation, du régulateur de réponse PhoP (Macfarlane *et al.*, 1999). La perte de fonction de PhoQ (Lee and Ko, 2014)



**Figure 18. Schéma représentant les mécanismes de résistance aux polymyxines chez *P. aeruginosa*.** Les différents systèmes à deux composants impliqués dans la résistance aux polymyxines sont représentés, avec le senseur encaissé dans la membrane interne et le régulateur transcriptionnel associé, situé dans le cytoplasme. Les flèches vertes indiquent une action activatrice et les lignes rouges une action répressive.

(Gutu *et al.*, 2013) ou le gain de fonction de PhoP (Lee *et al.*, 2012) sous l'effet de mutations rend compte de la résistance de certaines souches cliniques aux polymyxines. PhoP contrôle un régulon de plus de 450 gènes, dont certains sont impliqués dans diverses fonctions physiologiques telles que la mobilité par twitching et la formation de biofilm. Le régulon PhoP englobe aussi l'opéron *arn* et plusieurs systèmes régulateurs comme, par exemple le S2C PrmAB, dont l'activité se trouve *de facto* sous l'influence de PhoPQ (Gooderham *et al.*, 2009). L'opéron *phoPQ* est adjacent à un gène codant pour une protéine de membrane externe, OprH. Celle-ci n'est pas nécessaire à la résistance aux polymyxines mais semble permettre la stabilisation de la membrane externe lors d'une carence en Mg<sup>2+</sup> de l'environnement (Edrington *et al.*, 2011).

La délétion du gène *brlR* (mutant PAO1Δ*brlR*) augmente la CMI de la colistine d'un facteur 2, tandis que sa surexpression chez la souche parentale PAO1 se traduit par une sensibilisation à l'antibiotique (CMI de 1,2 à 0,6 mg/L). Il est important de préciser que ce phénomène n'est observé que dans des conditions de culture en biofilm. La surexpression de *brlR* va de paire avec la sous-expression des gènes *phoP* (- 2,1 fois), *phoQ* (-2,8 fois) et *arnC* (-1,8 fois), soulignant le contrôle négatif exercé par le RR BrlR sur *phoPQ* (Chambers and Sauer, 2013). D'un autre côté, l'opéron *phoPQ* est surexprimé dans le mutant PAO1Δ*brlR*, par comparaison avec PAO1. BrlR est un régulateur transcriptionnel de la famille MerR, qui en plus de l'opéron *phoPQ*, influence l'expression de *mexAB-oprM*, *mexEF-oprN* et *mexGHI-opmD*. Ainsi, des expériences de cinétique de bactéricidie ont mis en évidence un nombre de survivants 15 à 30 fois inférieur chez le mutant PAO1Δ*brlR* par rapport à la souche parentale, suite à l'exposition de biofilms à la tobramycine (100 mg/L), à la norfloxacine (450 mg/L), au triméthoprime (150 mg/L), à la tétracycline (100 mg/L) et à la kanamycine (150 mg/L) (Liao

and Sauer, 2012). Ces résultats suggèrent que la tolérance des biofilms de *P. aeruginosa* vis-à-vis de ces antibiotiques est partiellement dépendante des pompes MexAB-OprM et MexEF-OprN contrôlées par BrIR (Liao et al., 2013).

PmrAB est le second S2C capable de moduler la sensibilité de *P. aeruginosa* aux polymyxines. Comme ParRS, PmrAB est activé chez la souche PAO1 exposée aux polymyxines ou cultivée dans un milieu carencé en Mg<sup>2+</sup> et Ca<sup>2+</sup> (McPhee et al., 2003). Par ailleurs, des substitutions d'acide aminé dans le senseur PmrB ont été associées à différents niveaux de résistance aux polymyxines chez des mutants sélectionnés *in vitro* ou *in vivo* dans un contexte infectieux (Barrow and Kwon, 2009) (Abraham and Kwon, 2009) (Moskowitz et al., 2012). Le site de fixation du RR PmrA sur l'ADN a été identifié par MCPhee et coll. en 2003. Il est constitué de deux motifs GTTAAG/CTTAAG distants de 5 pb (McPhee et al., 2003). PmrA contrôle un régulon assez conséquent de 233 gènes, dont 201 surexprimés et 32 réprimés (Bolard et al., 2019). Parmi les gènes activés figurent l'opéron *pmrAB* lui-même et l'opéron *arn* responsable de la résistance aux polymyxines (McPhee et al., 2003). Toutefois, la résistance des mutants présentant des altérations du S2C PmrAB n'est pas uniforme, et des CMI de la colistine comprises entre 2 et 128 mg/L ont été décrites. Ces variations ne sont pas corrélées aux niveaux d'expression de l'opéron *arn* (Moskowitz et al., 2004) (Moskowitz et al., 2012) (Bricio-Moreno et al., 2018) (Lee and Ko, 2014). L'intervention d'autres mécanismes dans le phénotype est donc plus que probable.

En plus de leur rôle dans la résistance aux polymyxines, certaines mutations dans PmrB ou PmrA sont à l'origine d'une élévation des niveaux de résistance aux aminosides (Bolard et al., 2019). Grâce à des analyses transcriptomiques, des expériences de délétion et de re-

complémentation génique, notre équipe a montré que cette résistance aux aminosides était associée à un cluster de 3 gènes (PA4773-PA4774-PA4775) localisé en amont de l'opéron *pmrAB*. Ces trois gènes avaient précédemment été décrits comme étant impliqués dans une voie alternative de biosynthèse de la spermidine, une polyamine susceptible de protéger *P. aeruginosa* contre les polymyxines en présence d'ADN extracellulaire (Johnson *et al.*, 2012). L'analyse par ESI-MS/MS des produits fixés à la surface de différents mutants *pmrB* a révélé qu'ils étaient en réalité responsables de la production de norspermidine (Bolard *et al.*, 2019). Cette autre polyamine, proche de la spermidine, porte trois fonctions amines chargées positivement à pH physiologique (Hamana, 1997). Sa synthèse reposerait sur l'enzyme SpeE2 (gène PA4774), dont l'activité aminopropyltransférase prédite permettrait de transférer un groupement aminopropyl sur diverses polyamines dont le 1,3-diaminopropane (Bolard *et al.*, 2019).

Enfin, il est apparu qu'une molécule signal produite par *Stenotrophomonas maltophilia*, appelée *facteur signal diffusible* (DSF) (ou acide *cis*-11-méthyl-2-dodécénoïque) était capable d'activer le produit du gène PA1396 chez *P. aeruginosa*, un senseur orphelin jouant un rôle dans la formation de biofilm et la tolérance aux polymyxines (Ryan *et al.*, 2008b). L'addition de 10 ou 50  $\mu$ M de DSF dans le milieu de culture de la souche PAO1 induit la formation d'un biofilm filamenteux dépendant de PA1396. En outre, des approches protéomiques ont révélé que la délétion du gène PA1396 ou l'ajout de DSF conduit à l'hyperproduction de la protéine PA4774. De façon complémentaire, le DSF s'est avéré capable de déclencher l'expression de *pmrB* (environ 5 fois) et de protéger la souche PAO1 contre l'activité létale de 2 mg/L de colistine. Il en a été déduit que la régulation négative de l'opéron *pmrAB* par le

senseur PA1396 est levée en présence de DSF et que le RR PmrA peut être activé par des senseurs autres que PmrB (Ryan *et al.*, 2008b).

Un quatrième système à deux composants, CprRS décrit par Fernandez et coll. en 2012, participe lui aussi à la résistance aux polymyxines (Fernández *et al.*, 2012). L'inactivation de CprRS supprime toute induction de l'expression de l'opéron *arn* par le peptide antimicrobien CP28. Contrairement aux S2C cités précédemment (PhoPQ et PmrAB), CprRS répond à la présence de nombreux peptides antimicrobiens tels que CRAMP-64, HH17-64, CP29-4 et la pleurocidine-64 en plus des polymyxines, dans le milieu de culture. Comme le système PhoPQ, l'activation de l'opéron *arn* par CprR nécessite la présence de PmrAB. Une analyse transcriptomique comparant la souche PAO1 à son mutant PAO1 $\Delta$ *cprR*, tous deux cultivés en présence de CP28 (12 mg/L), a mis en évidence un nombre assez restreint de gènes régulés positivement par CprR, dont *cprA* (PA1559-1560), l'opéron *arn*, les gènes PA4773-PA4774-PA4775 et le locus *pmrAB* (Fernández *et al.*, 2012). En outre, il a été constaté que la délétion de l'opéron *cprRS* chez un mutant PAK $\Delta$ *phoQ* diminuait la résistance à la colistine de ce dernier de 50 mg/L à 7 mg/L (CMI), indiquant une contribution de CprRS dans le phénotype des mutants *phoQ*. A l'appui de cette hypothèse, une mutation Arg241Cys dans CprS a été identifiée conjointement à une mutation inactivant le gène *phoQ* dans des souches cliniques hautement résistantes aux polymyxines (Gutu *et al.*, 2013).

Indépendamment des S2C, le gène *cprA* contribue à la résistance acquise des souches de *P. aeruginosa* PA14 et PAK à la polymyxine B. Chez PAO1, le cadre de lecture de *cprA* est interrompu par une délétion. Les ORFs PA1559 et PA1560 (initialement annotés *cprA* et PA1560 dans le génome de PAO1 (Stover *et al.*, 2000) correspondent finalement à un seul



gène, *cprA*. Celui-ci semble nécessaire à *P. aeruginosa* pour atteindre de très hauts niveaux de résistance à la polymyxine B ainsi qu'à la protégrine-1 et le C18G. La concentration de ces différents produits permettant de tuer 50% d'une population résistante (mutant *pmrAB*) a ainsi été réduite de 32, 12 et 256 mg/L, respectivement, à 2, 2 et 64 mg/L par la délétion de *cprA*. A noter que tous les S2C présentés dans cette revue (ParRS, CprRS, PhoPQ et PmrAB) sont capables d'activer l'expression du gène *cprA* dans des conditions adéquates d'induction (Gutu *et al.*, 2015) (Fernández *et al.*, 2012).

ColRS est le seul S2C connu à ce jour chez *P. aeruginosa* dont l'activation entraîne la répression de l'opéron *arn* et l'activation d'un gène *eptA-like* (PA1972) codant pour une phosphoéthanolamine transférase homologue à celles identifiées chez *A. baumannii* et *E. coli*. Cette enzyme est capable de transférer une phosphoéthanolamine sur un groupement phosphate en position 4' du lipide A (Nowicki *et al.*, 2015). Curieusement, la surexpression du gène *eptA-like* chez *P. aeruginosa* n'a pas d'effets sur la sensibilité aux polymyxines. Selon une hypothèse, l'activation de ColRS pourrait réduire la quantité de lipide A modifié par l'Ara4N au profit de la phosphoéthanolamine avec, au final, un bilan inchangé en ce qui concerne le pourcentage de groupements phosphate saturés. Fait intéressant, une forte concentration en  $Zn^{2+}$  (2 mM) est capable d'activer le senseur ColS, et par conséquent le gène *eptA-like* PA1972 (Nowicki *et al.*, 2015). Enfin, Gutu et coll. ont montré que les hauts niveaux de résistance à la polymyxine B (CMI = 50 mg/L) du mutant PAK (*PAKΔphoQ*) étaient en partie dépendants de la présence de ColRS (*PAKΔphoQΔcolRS*, CMI = 10 mg/L). De façon surprenante, il a été observé que la délétion des gènes *colS* ou *colR* réduisait la quantité d'Ara4N présente initialement sur le lipide A du mutant *PAKΔphoQ* (Gutu *et al.*, 2013).

Enfin, le dernier S2C à jouer un rôle dans la résistance aux peptides antimicrobiens est BqsRS. Ce système répond à la présence d'ions  $Fe^{2+}$  dans l'environnement, et en cascade active l'opéron *arn* via PhoP et PmrB (Kreamer *et al.*, 2015). L'ensemble de ces données montre à quel point la régulation de l'opéron *arn* est complexe (Figure 18). Les différents S2C à disposition de la bactérie lui permettent de percevoir une multitude de signaux de stress l'informant sur l'état de l'enveloppe, et d'adapter sa réponse en fonction de la nature et de l'importance de l'agression.

## II. RESULTATS

---

# **1 La pompe d'efflux MexXY/OprM est impliquée dans la tolérance et la résistance acquise à la colistine chez *P. aeruginosa***

## **1.1 Contexte**

Les polymyxines B et E (colistine) sont des antibiotiques de dernier recours pour le traitement des infections à *P. aeruginosa* liées à des souches XDR (Nation et al., 2015). Toutefois, des souches résistantes aux polymyxines ont été rapportées. La résistance à cette famille d'antibiotiques chez cette espèce bactérienne est uniquement associée à la modification du lipide A du LPS par l'addition de 4-déoxy-4-amino-arabinose diminuant la charge négative de la surface bactérienne (Ernst et al., 1999). Ce mécanisme est lié à l'expression d'un grand opéron de 8 gènes (*arnBCADTEF-ugd*), régulé par plusieurs systèmes à deux composants (TCS) dont certains (PmrAB, ParRS, CprRS) sont inductibles par les polymyxines (Jeannot et al., 2017).

## **1.2 Objectifs de l'étude**

Le but de ce travail était d'étudier la réponse d'une souche sauvage PAO1 cultivée en présence de différentes concentrations de colistine et d'identifier le rôle des différents S2C impliqués dans l'induction de l'opéron *arn*. A l'aide de mutants de délétion construits à partir de la souche PAO1, nous avons évalué le rôle de chacun des S2C (PmrAB, ParRS et CprRS). De façon surprenante nous avons observé que le système ParRS jouait un rôle majeur dans la tolérance à la colistine contrairement aux systèmes CprRS et PmrAB. Compte tenu que ParRS contrôle l'expression de plusieurs gènes codant des mécanismes de résistance comme le système d'efflux actif MexXY(OprM), nous avons déterminé l'impact de sa délétion en présence de colistine chez la souche PAO1. Nous avons ainsi mis en évidence

le rôle de MexXY(OprM) dans la protection de *P. aeruginosa* contre la colistine. Enfin, nous avons évalué le rôle de ce système dans la résistance acquise à la colistine, chez des souches cliniques et des mutants sélectionnés *in vitro*, surproduisant l'opéron *arn* suite à une mutation dans le senseur PmrB. Nos résultats montrent que la tolérance et la résistance aux polymyxines dépendent à la fois de l'imperméabilité membranaire assurée par la modification du lipide A par l'ajout d'Ara4N et du système d'efflux actif MexXY/OprM, bien que le rôle de ce dernier ne soit pas encore complètement élucidé. Au cours de ce travail, j'ai participé à la construction des mutants de délétion ainsi qu'à l'évaluation de l'effet bactéricide des polymyxines chez ces mutants. L'ensemble de ce travail a été réalisé en collaboration avec Arnaud Bolard, un doctorant du laboratoire qui s'est focalisé sur la caractérisation des mutants *pmrB*.

### **1.3 Résultats publiés**

#### **1.3.1 Article**

Hélène Puja, Arnaud Bolard, Aurélie Noguès, Patrick Plésiat, Katy Jeannot.

« The efflux pump MexXY/OprM contributes to the tolerance and acquired resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to colistin. »

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2020. Jan 21; pii: AAC.02033-19. doi: 10.1128/AAC.02033-19

1 **The efflux pump MexXY/OprM contributes to the tolerance and acquired resistance of**  
2 ***Pseudomonas aeruginosa* to colistin**

3

4

5 Hélène Puja<sup>a</sup>, Arnaud Bolard<sup>a</sup>, Aur elie Nogu es<sup>a</sup>, Patrick Pl esi at<sup>a,b</sup>, Katy Jeannot<sup>a,b</sup> #

6

7 <sup>a</sup>UMR 6249 Chrono-environnement, UFR Santé, Université de Bourgogne-Franche Comt e,

8 Besançon, France

9 <sup>b</sup>Centre National de R eference de la résistance aux antibiotiques, Centre Hospitalier Universitaire

10 de Besançon, France

11

12

13

14

15 **Running Head:** MexXY/OprM-dependent colistin resistance

16 # Address correspondence to Katy Jeannot, katy.jeannot@univ-fcomte.fr

17 **Present address :** Centre National de R eference de la résistance aux antibiotiques, laboratoire

18 de bactériologie, CHU Jean Minjoz, 3 boulevard Fleming, 25030 Besançon, France

19

20 **Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, colistin resistance, MexXY/OprM

## 21 Abstract

22 The intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to polymyxins in part relies on the addition  
23 of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (Ara4N) molecules to the lipid A of lipopolysaccharide (LPS),  
24 through induction of operon *arnBCADTEF-ugd* expression (*arn*). As demonstrated previously, at  
25 least three two-component regulatory systems (PmrAB, ParRS, and CprRS) are able to  
26 upregulate this operon when bacteria are exposed to colistin. In the present study, gene deletion  
27 experiments with bioluminescent strain PAO1::*lux* showed that ParRS is a key element in the  
28 tolerance of *P. aeruginosa* to this last resort antibiotic (i.e., resistance to early drug killing). Other  
29 loci of the ParR regulon such as those encoding the efflux proteins MexXY, the polyamine  
30 biosynthetic pathway PA4773-4775 and Ara4N LPS modification process also contribute to the  
31 bacterial tolerance in an intricate way with ParRS. Furthermore, we found that both the stable  
32 upregulation of operon *arn* and drug-induced ParRS-dependent overexpression of genes *mexXY*  
33 account for the elevated resistance of *pmrB* mutants to colistin. Deletion of genes *mexXY* in a  
34 constitutively activated ParR mutant of PAO1 was associated with a significantly increased  
35 expression of genes *arnA*, PA4773 and *pmrA* in the absence of colistin exposure, thereby  
36 highlighting a functional link between the MexXY/OprM pump, the PA4773-4775 pathway and  
37 Ara4N-based modification of LPS. The role played by MexXY/OprM in the adaptation of  
38 *P. aeruginosa* to polymyxins open new perspectives for restoring the susceptibility of resistant  
39 mutants, through the use of efflux inhibitors.

40

## 41 Introduction

42 *Pseudomonas aeruginosa* is a notorious cause of healthcare-associated infections and lung  
43 function deterioration in cystic fibrosis (CF). Because of an increasing prevalence of extensively  
44 drug-resistant strains in hospitals (1, 2), polymyxins B and E (colistin) have been reconsidered as  
45 potentially useful drugs to treat severely-ill patients (3, 4).

46 The resistance of *P. aeruginosa* to these polycationic antimicrobial peptides (AMPs) is considered  
47 to rely essentially on the addition of 4-amino-4-L-deoxyarabinose (Ara4N) to the phosphate  
48 groups of lipopolysaccharide (LPS) (5). Such a post-translational modification of LPS mitigate the  
49 penetration of polymyxins across the outer membrane by reducing the net negative charge of the

50 bacterial surface (5). The whole process is encoded by a large operon named *arnBCADTEF-ugd*  
51 (hereafter called *arn*) that governs the biosynthesis, transmembrane transport and enzymatic  
52 graft of Ara4N to one or two phosphate groups of lipid A (5, 6). Operon *arn* expression is  
53 upregulated in response to outer membrane damages or perturbations via at least four two-  
54 component systems (TCSs) (7-12). Whereas PhoPQ is sensitive to divalent cations depletion  
55 destabilizing the outer membrane lipid bilayer, PmrAB, ParRS, and CprRS are activated when  
56 bacteria are exposed to various AMPs (7-10). However, the respective contributions of these  
57 three later systems to the natural resistance of *P. aeruginosa* to polymyxins have not been fully  
58 elucidated so far.

59 Over the last years, it has become evident that higher levels of resistance to polymyxins can be  
60 reached by the pathogen when mutations in genes *pmrB*, *phoQ*, *parS*, *parR*, *cprS*, and/or *colS*  
61 stably activate the corresponding TCSs, thus causing a constitutive overexpression of operon *arn*  
62 and subsequent LPS modification (9, 13-17). Recently, we found that in addition to colistin some  
63 *pmrB* mutants are more resistant to aminoglycosides than wild-type parental strains (18). In these  
64 mutants, increased aminoglycoside resistance levels (but not that of polymyxins) result from  
65 activation of a gene cluster, PA4773-PA4774-PA4775, which codes for a pathway of  
66 norspermidine biosynthesis. The active efflux system MexXY/OprM, which is related to the RND  
67 family (Resistance-Nodulation-cell Division) of bacterial transporters, also contributes to  
68 aminoglycoside resistance in *pmrB* mutants (18). This pump has a remarkable wide substrates  
69 specificity that encompasses diverse antibiotics such as aminoglycosides, cephalosporins  
70 (cefepim, cefpirome, ceftobiprole), fluoroquinolones, tetracyclines, tigecycline, and macrolides  
71 (19). Its role in the wild-type resistance phenotype of *P. aeruginosa* is limited to those of the pump  
72 substrates that target the ribosome and indirectly trigger operon *mexXY* expression through a  
73 sophisticated transcription attenuation mechanism involving an antirepressor protein, named  
74 ArmZ (20, 21). Loss-of-function mutations in gene *mexZ*, which encodes the TetR-like local  
75 repressor of *mexXY*, are a common cause of decreased susceptibility (2- to 16-fold) to  
76 aminoglycosides in clinical strains of *P. aeruginosa* (19, 22). Besides *mexZ* mutations (in mutants  
77 called *agrZ*) and various alterations in the ribosomal machinery alleviating the transcription  
78 attenuation mechanism cited above (mutants *agrW1*) (23, 24), a third class of mutations in TCS



79 ParRS was discovered, which activates expression of operons *mexXY* and *arn*, with concomitant  
80 repression of the carbapenem-specific porin-encoding gene *oprD* (9). These findings highlighted  
81 a functional link between MexXY/OprM and the Ara4N-based modification of LPS, via the ParRS  
82 phospho-relay. Whether the mutationally-activated response regulator ParR directly binds to the  
83 promoter region of operon *mexXY* could not be demonstrated so far by DNA footprinting  
84 experiments (unpublished data).

85 In the continuity of these previous results, here we show that the efflux system MexXY/OprM and  
86 Arn modification pathway cooperate to provide *P. aeruginosa* with a protection against colistin.

87

## 88 **Results and discussion**

89 **Inoculum-dependent bactericidal activity of colistin.** Polymyxins exert a rapid, concentration-  
90 dependent bactericidal activity on *P. aeruginosa* when used at concentrations near or above the  
91 MIC (25, 26). However as previously demonstrated by pharmacodynamic studies, high bacterial  
92 inoculums tend to attenuate this killing activity (25, 27). In order to analyze the impact of colistin  
93 under controlled experimental conditions, we carried out time-kill experiments with increasing  
94 inoculums of bioluminescent strain PAO1::*lux*. The bacterial suspensions were exposed to static  
95 concentrations of colistin, from 0.25 to 16  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (0.5- to 32 X MIC). As expected, the minimal  
96 concentrations needed to reduce the initial bacterial load of at least 2  $\log_{10}$  after 2 h of contact  
97 ( $\text{MBC}_{2\text{h}}$ ) varied with the cell density (16  $\mu\text{g ml}^{-1}$  with  $5 \cdot 10^8$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ ; 4  $\mu\text{g ml}^{-1}$  with  $10^8$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ ; 2  
98  $\mu\text{g ml}^{-1}$  with  $5 \cdot 10^7$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ ; 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  with  $10^7$  and  $5 \cdot 10^6$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ ; 0.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  with  $10^6$  CFU  $\text{ml}^{-1}$ ).  
99 The relationship between the inoculum size and the  $\text{MBC}_{2\text{h}}$  is represented in Fig. 1. According to  
100 these data, a colistin concentration of 2  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , which corresponds to the susceptibility  
101 breakpoint defined by both CLSI (28) and EUCAST ([http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)),  
102 would remain bactericidal up to  $5 \cdot 10^7$  bacteria but might fail to eradicate more dense populations,  
103 as those found in the airways of some CF patients heavily colonized by *P. aeruginosa*.

104

105 **Role of ParRS in intrinsic resistance of *P. aeruginosa* to colistin-induced killing.** The TCSs  
106 PmrAB, CprRS, and ParRS are activated upon polymyxin exposure (5, 7, 9, 10). To better assess  
107 their respective roles in the protection of wild-type strains of *P. aeruginosa* against colistin, their

108 encoding genes were deleted to construct single- and multiple-gene knock out mutants from  
109 strain PAO1::*lux*. Inoculums of  $5.10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> were used to determine the extent of bacterial  
110 killing after 2 h of drug exposure at 8 µg ml<sup>-1</sup> (Table 1). While suppression of PmrAB and CprRS  
111 had virtually no impact on the early bactericidal activity of colistin as compared with parent  
112 PAO1::*lux*, ParRS inactivation resulted in a ca. 100-fold higher CFU decline (Table 1). Similar  
113 results were obtained at lower cell densities ( $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>) with a 0.4 µg ml<sup>-1</sup> drug concentration,  
114 consistent with the inoculum-dependent effects of polymyxins (Fig. 2). To evaluate the specificity  
115 of ParRS in response to colistin, we also measured the bactericidal effect of ciprofloxacin (2 µg  
116 ml<sup>-1</sup>) in similar conditions ( $5.10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>) (data not shown). After, 2h of drug exposure, the  
117 amount of surviving bacteria was not different between the strain PAO1::*lux* and its mutant  
118 PAO1Δ*parRS*, indicating that the impact of ParRS on bactericidal effect of colistin is specific to  
119 this molecule. Rather surprisingly, inactivation of LPS modification operon *arn* sensitized  
120 PAO1::*lux* only 15-fold (Table 1). Moreover, impairment of this major mechanism of adaptation to  
121 AMPs in *P. aeruginosa* did not further increase the killing efficacy of the polymyxin in a *parRS*  
122 deletion mutant (compare PAO1::*lux*-Δ*parRS* with mutant PAO1::*lux*-Δ4TCS-Δ*arn* that lacks  
123 operons *parRS*, *pmrAB*, *cprRS*, *phoPQ* and *arn*, in Table 1). Finally, additional experiments  
124 showed that the MIC of colistin, which reflects the bacteriostatic potency of this antibiotic, was not  
125 affected by the deletion of any of the aforementioned loci except *parRS*, which was associated  
126 with a modest 2-fold decrease in MIC value relative to PAO1::*lux* (0.25 versus 0.5 µg ml<sup>-1</sup>; Table  
127 1). Altogether, these data suggested a contribution of Arn-independent, ParRS-regulated  
128 mechanisms to the tolerance of *P. aeruginosa* toward colistin.

129

130 **Gene cluster PA4773-4775 mitigates the lethal effects of colistin.** By applying the same  
131 experimental conditions as described above ( $5.10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> and 8 µg ml<sup>-1</sup> colistin), we assessed  
132 the protective role of various loci belonging to the ParR regulon, through a similar gene deletion  
133 strategy (9). This approach showed that genes *oprD*, PA1797, PA2358 and PA2655 have no  
134 influence on the bactericidal and bacteriostatic activities of colistin (data not shown). In contrast,  
135 inactivation of PA4773, PA4774 or PA4775, which together form a cluster promoting the  
136 presence of norspermidine at the bacterial surface and subsequent aminoglycoside resistance in

137 *pmrB* mutants (18, 29), reduced the number of surviving bacteria from 10- to 20-fold after 2 h of  
138 drug treatment, though without significant change in colistin MIC (Table 1). To assess whether  
139 the lack of surface-localized norspermidine accounts for this sensitization effect, we exogenously  
140 added the polyamine at a 150  $\mu$ M final concentration to the growth medium of strain PAO1::*lux*. A  
141 similar experiment was carried out in parallel with spermidine. However, these polyamines failed  
142 to reduce colistin activity (data not shown), suggesting that other protective molecules are  
143 produced under the control of the three-gene locus. In the bacterium *Thermus thermophilus*, a  
144 triamine/agmatine aminopropyl transferase (TAAPT) is able to add an aminopropyl residue from  
145 decarboxylated S-adenosylmethionine to various precursors, thus giving rise to the synthesis of  
146 different polyamines (30). Interestingly, we discovered that gene PA4774 encodes a close  
147 homolog of TAAPT from *T. thermophilus* strain HB8 (60% amino acid sequence identity)  
148 (1UIR\_A) (30). Thus, it is tempting to speculate that one or several polyamines in addition to  
149 norspermidine are produced upon colistin stress, and in contrast to norspermidine contribute to  
150 the tolerance of *P. aeruginosa* toward this AMP. However further investigations are required to  
151 confirm this hypothesis.

152

153 **Efflux system MexXY/OprM, a third player in the bacterial tolerance to colistin.** Like the *arn*  
154 operon and gene cluster PA4773-4775, genes *mexXY* belong to the ParR regulon and are *de*  
155 *facto* overexpressed in polymyxin-exposed bacteria through activation of ParRS (9, 10).  
156 Unexpectedly, we found that the lack of operon *mexXY* sensitized strain PAO1::*lux* to the lethal  
157 effects of colistin by 12-fold (Table 1). On the other hand, complementation of the mutant  
158 PAO1::*lux*- $\Delta$ *mexXY* with a plasmid-borne copy of the operon (pAK1900-derived construct  
159 pAGH97) suppressed this sensitization (Table 1). Pioneering works aimed to identify the  
160 substrates of MexXY/OprM were based on MIC determinations, and thereby excluded polymyxins  
161 from the list of potentially transported molecules (31). Consistent with these findings, inactivation  
162 of that pump in PAO1::*lux* had no impact on the bacteriostatic activity of colistin (MIC of 0.5  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>;  
163 Table 1). Reinforcing the notion that this molecule is not a good substrate for MexXY/OprM, no  
164 increase in the drug MIC was noted when the *mexXY* genes were overexpressed from plasmid  
165 pAGH97 in PAO1::*lux*- $\Delta$ *mexXY* (Table 1). In comparison, introduction of vector pAK1900 carrying

166 the entire *arn* operon (construct pAKArn) in PAO1::*lux* caused a 8-fold increase in colistin  
167 resistance ( $4 \mu\text{g ml}^{-1}$  versus  $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Clearly indicating that while MexXY/OprM is not  
168 supposed to export colistin significantly, it cooperates with the Arn LPS modification pathway for  
169 protecting *P. aeruginosa* against this antibiotic, transformation of PAO1::*lux*- $\Delta$ *mexXY* with plasmid  
170 pAKArn rendered this mutant only 2-fold more resistant to the antibiotic ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  versus  $0.5 \mu\text{g}$   
171  $\text{ml}^{-1}$ ; Table 1). A possible explanation for these results might be that colistin is actually substrate  
172 for MexXY/OprM, its active export becoming evident in terms of resistance only when its  
173 permeation across the outer membrane is strongly decreased by Ara4N-based modification of  
174 LPS, which would increase its efflux-to-influx rates ratio. Other examples of RND pumps involved  
175 in AMP resistance have been reported for *Klebsiella pneumoniae* (AcrAB-TolC and H239\_3064)  
176 and *Neisseria gonorrhoeae* (MtrCDE) (32-34). Alternatively, MexXY/OprM might export some  
177 constituents of LPS, as previously envisaged (35) or might actively transfer specific molecules  
178 from the periplasm to the bacterial surface to counteract the electrostatic binding of colistin. To  
179 rule out the possibility that the lack of MexXY efflux pump is counterbalanced by the  
180 overproduction of another one, we measured by RT-qPCR the expression levels of genes *mexA*  
181 and *mexC* in strain PAO1::*lux* and its *mexXY* deletion mutant (PAO1 $\Delta$ *mexXY*::*lux*). Neither the  
182 genes *mexB* (1.9-fold  $\pm$  0.31) and *mexC* (1.6-fold  $\pm$  0.36) were upregulated in the absence of  
183 MexXY, indicating that MexAB-OprM and MexCD-OprJ do not relay MexXY/OprM in this  
184 condition. Finally, impact of the triple deletion  $\Delta$ *mexXY*- $\Delta$ PA4773- $\Delta$ *arn* was also tested, and found  
185 similar to that of single mutants regarding both the killing (12-fold CFU reduction compared with  
186 PAO1::*lux*) and bacteriostatic (MIC equal to  $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) parameters of colistin action (Table 1).  
187 The absence of additive effects between these gene deletions supports the idea that the  
188 physiological functions determined by the three loci are intimately intricated to protect wild-type  
189 strains of *P. aeruginosa* against colistin. As mentioned previously, additional protective  
190 mechanisms regulated by ParRS still remain to be identified.

191

192 **Interplays between MexXY/OprM and PmrAB.** As shown previously, exposure of *P. aeruginosa*  
193 to ribosome-targeting antibiotics (e.g., chloramphenicol and spectinomycin), induces operon  
194 *mexXY* expression while downregulating that of the *arn* locus and genes PA4773-PA4774 (35).

195 As a result, these inhibitors increase the susceptibility (2- to 4-fold) of *P. aeruginosa* to colistin  
196 (35). In line with these observations, we carried out RT-qPCR experiments to assess the  
197 transcript levels of genes *arnA* (as a representative gene of *arn* operon), *mexY* (for operon  
198 *mexXY*), and PA4773 (for cluster PA4773-4775) in strain PAO1::*lux* and mutants PAO1::*lux-Δarn*,  
199 PAO1::*lux-ΔmexXY*, and PAO1::*lux-ΔPA4773*, submitted to 8 μg ml<sup>-1</sup> colistin for 2 h. Suppression  
200 of operon *arn* and gene PA4773 did not modify *mexY* expression in both colistin-treated and  
201 untreated cells of PAO1::*lux* (Fig. 3A). In contrast, inactivation of *mexXY* caused a significant  
202 upregulation of *arnA* (9.5-fold more than in PAO1::*lux*) and PA4773 (5.3-fold) upon colistin  
203 exposure exclusively (Fig. 3B and C), suggesting that the Ara4N modification pathway and  
204 polyamine biosynthetic pathway PA4773-4775 somehow compensate for the lack of  
205 MexXY/OprM in colistin-treated bacteria. As genes PA4773 and *arnA* belong to the regulon of  
206 response regulator PmrA (12), we quantified the gene *pmrA* transcripts in PAO1::*lux-ΔmexXY*  
207 and PAO1::*lux* exposed to colistin (Fig. 3D). These transcripts appeared to be 4.8-fold higher in  
208 the deletion mutant, which confirms that the absence of MexXY/OprM generates an  
209 overactivation of the TCS PmrAB upon colistin treatment, which in turn enhances the expression  
210 of Arn and polyamines pathways. While the role of MexXY/OprM in the rapid adaptation of  
211 *P. aeruginosa* to colistin stress remains unclear, one could assume that the efflux system clears  
212 the periplasm of molecules or ions that are sensed by the sensor PmrB, an hypothesis fully  
213 consistent with the observation of K. Poole's group that the upregulation of MexXY upon  
214 aminoglycoside exposure (i.e., independently of the ParRS signaling pathway) is associated with  
215 lower *arn* expression levels and diminished polymyxin resistance (35).

216 In a previous work, we showed that *P. aeruginosa* cells exposed to sub-MIC concentrations of  
217 colistin upregulate operon *mexXY* as a result of the activation of TCS ParRS (9). Thus, it was  
218 potentially interesting in this work to determine if gene *pmrA* is upregulated in a mutant exhibiting  
219 a stable activation of ParRS in absence of colistin exposure. We used the PAO1-derived mutant  
220 PAOW2 that constitutively overexpresses the *arn* and *mexXY* operons together with gene cluster  
221 PA4773-75, subsequent to a mutation (M59I) in the regulator ParR (9). Compared to PAO1::*lux*,  
222 PAOW2 exhibited much higher transcript levels of genes *arnA* (70-fold), PA4773 (200-fold), *pmrA*  
223 (21-fold), and *mexY* (21-fold) (Fig 4). While the loss of operon *arn* had not effects on PA4773 and

224 *pmrA* transcriptional activities, suppression of operon *mexXY* was associated with a significant  
225 increase in mRNA amounts of *arnA* and *pmrA* in the activated ParRS background of PAOW2.  
226 The absence of colistin in the growth medium of these various mutants explicitly highlights  
227 ParRS-mediated interactions between MexXY/OprM and the Arn LPS modification pathway. It  
228 remains to be clarified however whether ParR directly (i.e., through a direct binding to promoter  
229 sequences) or indirectly activates PmrAB in PAOW2 and in the colistin-treated wild-type strain  
230 PAO1. Of note, colistin MIC for mutant PAOW2 ( $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) was reduced 2-fold upon operon  
231 *mexXY* deletion ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), a result consistent with MexXY/OprM contributing to both the  
232 tolerance of *P. aeruginosa* to early bactericidal effects of colistin, and the acquired resistance to  
233 this compound (Table 1).

234

235 **MexXY/OprM and the Arn LPS modification pathway are both involved in the high colistin**  
236 **resistance of *pmrB* mutants**

237 Mutational activation of TCS PmrAB is a major cause of resistance to polymyxins in clinical  
238 strains of *P. aeruginosa*. To assess whether MexXY/OprM contributes to the phenotype conferred  
239 by mutations activating sensor PmrB (V28G,  $\Delta$ L172, Q105P and G188D in the following strains,  
240 respectively), we compared two PAO1-derived *pmrB* spontaneous mutants named AB8.2 (colistin  
241 MIC equal to  $128 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) and AB16.2 ( $128 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), as well as two resistant *pmrB* clinical isolates  
242 named 2243 and 3795 ( $128 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), with their respective *mexXY* knock-out counterparts (18). As  
243 indicated in Table 2, suppression of this efflux system led to a strong reduction in colistin MIC  
244 (from 16- to  $> 128$ -fold) in all these bacteria, but left a residual resistance ( $4$  or  $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) relative  
245 to wild-type strain PAO1 ( $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). A more pronounced effect was obtained by deleting the  
246 whole operon *arn* in mutants AB8.2 and AB16.2 (Table 2). Indeed, impairment of Ara4N-based  
247 LPS modification almost completely restored the parental susceptibility in the two strains (MIC of  
248  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). Confirming that MexXY/OprM somehow reinforces this outer membrane  
249 impermeability mechanism, ectopic expression of genes *mexXY* from plasmid pAGH97 fully  
250 complemented the four  $\Delta$ *mexXY* mutants (Table 2). Because *mexXY* expression is repressed in  
251 *P. aeruginosa* (36), a rapid activation of the operon may occur upon colistin stress to allow the  
252 synthesis of protective amounts of pump MexXY/OprM. Consistent with that, the expression of



253 *mexY* was not upregulated in both *pmrB* mutants (AB 8.2, and AB16.2) in the absence of colistin.  
254 But it remained strongly inducible (8-fold) when the bacteria were exposed to colistin similarly to  
255 the strain PAO1 (Fig S1). As demonstrated previously, the low basal transcription level of *mexXY*  
256 is induced when wild-type *P. aeruginosa* cells are submitted to subMIC concentrations of colistin,  
257 as a result of ParRS activation (9). In support to the notion that a similar upregulation also occurs  
258 in *pmrB* mutants through the activation of ParRS, suppression of these latest genes in mutant  
259 AB16.2 partially reversed the resistance to this antibiotic. Compared with AB16.2, mutant  
260 AB16.2 $\Delta$ *parRS* exhibited a 32-fold higher susceptibility to colistin (MIC 4  $\mu\text{g ml}^{-1}$  versus 128  $\mu\text{g}$   
261  $\text{ml}^{-1}$ ; Table 2). Conversely, a slight but reproducible 2-fold increase in the drug MIC was noticed in  
262 AB8.2 and AB16.2 upon deletion of the repressor MexZ-encoding gene and consecutive  
263 overexpression of operon *mexXY*. All these data agree with MexXY/OprM reinforcing the outer  
264 membrane permeability barrier of *pmrB* mutants toward colistin, through active efflux of still  
265 undetermined substrates. To rule out the possibility that this pump might export Ara4N to the cell  
266 surface or promote its addition to LPS molecules via the Arn pathway, lipid A fractions from  
267 AB16.2 and AB16.2 $\Delta$ *mexXY* were extracted and compared by MALDI-TOF (Matrix Assisted  
268 Laser Desorption Ionisation - Time of Flight) (37). The MALDI mass spectra showed similar  
269 patterns of molecular species substituted with 4AraN, thereby indicating that the LPS modification  
270 process is independent of the activity of MexXY/OprM (data not shown). Finally, neither the  
271 deletion of gene *armZ* that encodes the antirepressor protein of MexZ, named ArmZ, nor that of  
272 genes encoding TCSs PhoPQ and CprRS, respectively had an impact on the resistance  
273 phenotype of mutants AB8.2 and AB16.2 (data not shown). Therefore, these results demonstrate  
274 that the high resistance of *pmrB* mutants to colistin relies on concomitant overexpression of  
275 operons *arn* and *mexXY*, induced by dual activation of TCSs PmrAB and ParRS, respectively.

276

## 277 **Conclusion**

278 Polymyxins exert a straightforward and potent antibacterial activity against susceptible Gram-  
279 negative species. Recent metabolomic and transcriptomic studies have demonstrated that, in  
280 addition to their well-known membrane disrupting effects, these agents induce important

281 perturbations in multiple cellular functions including lipid metabolism, LPS production and  
282 peptidoglycan synthesis (38).

283 In the present work, we show that the wild-type susceptibility as well as mutation-driven  
284 resistance of *P. aeruginosa* to colistin mainly depends on synergistic interactions between the  
285 outer membrane impermeability mechanism based on Ara4N-based LPS decoration, and the  
286 active efflux system MexXY/OprM. TCS ParRS definitely appears as a key element in the  
287 adaptive (i.e., drug-induced) response of the pathogen to colistin, as ParRS inactivation strongly  
288 affects (i) bacterial survival in the presence of lethal drug concentrations, and (ii) drug MICs in  
289 mutants constitutively overproducing the Arn LPS modification pathway (e.g, *pmrB* mutants). In  
290 apparent contradiction with this pivotal role, mutations activating ParRS poorly impact the  
291 resistance of *P. aeruginosa* to colistin, with a modal 2-fold increase in their MIC (9). Likely  
292 accounting for these results, we noticed that mutational activation of ParRS is associated with a  
293 relatively modest overexpression of *arn* locus (i.e., ca 50-fold over the level of wild-type PAO1)  
294 compared with similar mutations in other TCSs such as PmrAB (e.g., 400-600-fold) (9, 18). Mass  
295 spectrometry experiments (MALDI-TOF) would surely be useful to study the correlation between  
296 the degree of substitution of LPS molecules with Ara4N, and colistin MICs. More puzzling was our  
297 observation that while deletion of genes *parRS* causes a 2-fold reduction in colistin MIC (this  
298 study and (9)), it otherwise quite strongly sensitizes *P. aeruginosa* to early drug killing (Table 1).  
299 In addition, neither the suppression of operon *mexXY* nor that of locus PA4773-4775 further  
300 sensitizes the PAO1::*lux-ΔparRS* mutant to colistin. While our experiments finally demonstrate a  
301 functional interdependence of the Arn LPS modification process, efflux pump MexXY/OprM, and  
302 the polyamine biosynthetic pathway determined by PA4773-4775, the poor impact of the  
303 inactivation of ParRS on colistin MIC may appear somewhat surprising. Actually as shown in Fig.  
304 S2, exposure of mutant PAO1::*lux-ΔparRS* to colistin triggers a rapid but transient decline in  
305 viable cell counts, a phase that is followed by a regrowth after 4 h of contact with the drug. Such  
306 growth rebound likely involves complex adaptive mechanisms developed by surviving bacteria to  
307 counteract the pleiotropic effects of colistin. This delayed adaptation process tends to mitigate the  
308 early killing effects of colistin and would explain the relatively low impact of ParRS inactivation on  
309 drug MIC (i.e., as the MIC is determined after 18 h of drug contact). Finally, a scenario emerges



310 in which, upon colistin exposure wild-type cells of *P. aeruginosa* rapidly decorate their LPS with  
311 Ara4N, increase the amounts of polyamines at their surface and activate the MexXY/OprM-  
312 dependent efflux of still unknown molecules, in a coordinated way involving TCS ParRS. In  
313 addition, the present study highlights the important contribution of MexXY/OprM pump to elevated  
314 colistin resistance of *pmrB* mutants, a finding which opens new therapeutic perspectives for efflux  
315 inhibitors. Such inhibitors would potentially reverse the resistance of *pmrB* mutants (and possibly  
316 *pmrA*, *phoPQ* and *cprRS* mutants) to colistin and prevent their emergence under therapy.

317

### 318 **Materials and Methods**

319 **Bacterial Strains, plasmids and growth conditions.** The bacterial strains and plasmids used in  
320 this study are listed in Table S1. All bacterial cultures were performed at 35 °C ± 1 in Mueller-  
321 Hinton broth (MHB, Biorad), on Mueller-Hinton agar (MHA, Becton Dickinson) with adjusted  
322 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>), or M9 minimal  
323 medium (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 42 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 22 mM, NH<sub>4</sub>Cl 19 mM, NaCl 8.5 mM) supplemented with 5%  
324 sucrose as sole carbon source. The plasmid-containing *Escherichia coli* strains were selected on  
325 MHA supplemented with kanamycin 50 µg ml<sup>-1</sup>, gentamicin 5 µg ml<sup>-1</sup>, ampicillin 100 µg ml<sup>-1</sup> or  
326 streptomycin 50 µg ml<sup>-1</sup>. Single- and multiple-knockout mutants lacking *parRS*, *pmrAB*, *phoPQ*,  
327 *cprRS*, *arnBCADTEF-ugd* (*arn*), PA4773, PA4774, PA4775, PA1797, PA2359, PA2655, *mexXY*,  
328 and/or *mexZ* genes were constructed by using overlapping PCR and recombination events, as  
329 previously reported (9, 39), and the primers listed in Table S2.

330

331 **Construction of bioluminescent strain PAO1::luxCDABE.** Wild-type reference strain  
332 *P. aeruginosa* PAO1 was rendered strongly bioluminescent by insertion of operon *luxCDABE* into  
333 chromosomal site *atfTn7*, thanks to recombinant plasmid pUC18-mini-Tn7T-Gm<sup>R</sup>-*lux* modified as  
334 follows. The *lac* promoter region of plasmid pCR2.1-TOPO<sup>®</sup> (Invitrogen) was PCR amplified with  
335 primers PlacA1 and PlacA2 (Table S2). The resulting amplicon was digested with SpeI and  
336 BamHI endonucleases, and then was cloned upstream of the *luxCDABE* coding sequence in  
337 pUC18-mini-Tn7T-Gm<sup>R</sup>-*lux*. The new construct, pUC18-mini-Tn7T-Gm<sup>R</sup>-P<sub>lac</sub>*lux*, was transferred  
338 into strain PAO1 and various derivative mutants by electroporation, allowing the integration of

339 mini-Tn7 into the bacterial chromosome, as previously described (40). To determine the  
340 correlation between viable cell counts (Colony Forming Units; CFU) and emitted bioluminescence  
341 (Relative Light Unit; RLU), strain PAO1::*lux* was grown in MHB up to an  $A_{600\text{nm}}$  of 1 ( $\approx 10^9$  CFU ml<sup>-1</sup>)  
342 <sup>1</sup>). Then, the culture was serially diluted 1:10 (from  $10^8$  to  $10$  CFU ml<sup>-1</sup>) in MHB and aliquots of  
343 0.2 ml were removed from each dilution. In parallel, 100  $\mu$ l were spread onto MHA plates.  
344 Colonies of survivors were counted after an overnight incubation at  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . The data presented  
345 in the text are means of three independent experiments. The correlation between the number of  
346 living bacteria ( $\text{Log}_{10}$  CFU ml<sup>-1</sup>) and bioluminescence ( $\text{Log}_{10}$  RLU) was linear for inoculums  
347 greater than  $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>, and is defined by the equation  $y=0.8993 x-1.966$ , with  $R^2 = 0.992$ .

348

349 **Strain complementation with plasmid pAKArn.** Genomic DNA of strain PAO1 was extracted  
350 by using the Wizard genomic DNA purification kit (Promega Corporation, Charbonnières-les-  
351 Bains, France). A fragment of 8,953-bp containing the whole operon *amBCADTEF-ugd* was then  
352 amplified by PCR, with specific primers PA3552Fw and PA3559Rv (Table S2). This amplicon was  
353 first cloned into vector pCR-Blunt II-TOPO. Next, a 9,059-bp fragment was sub-cloned into  
354 HindIII-XbaI plasmid pAK1900 (to yield pAKArn), and transferred by electroporation into strain  
355 PAO1::*lux* and its deletion mutant PAO1::*lux-ΔmexXY*. The transformants were selected on MHA  
356 supplemented with  $150 \mu\text{g ml}^{-1}$  ticarcillin.

357

358 **Antibiotic susceptibility testing.** The minimal inhibitory concentration (MIC) of colistin was  
359 determined by the standard serial twofold microdilution method in MHB, following the CLSI  
360 recommendations (28).

361

362 **Drug bactericidal activities.** Overnight cultures of strain PAO1 and derived mutants were diluted  
363 into fresh pre-warmed MHB to yield an absorbance of  $A_{600\text{nm}} = 0.5 \pm 0.05$ . The bacteria were  
364 incubated with constant shaking (250 rpm) at  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  for 30 min ( $5 \times 10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>). Further  
365 dilutions were performed to obtain appropriated inoculums, from  $5 \times 10^8$  to  $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>, prior to  
366 addition of colistin at a final concentration ranging from 0.25 to  $16 \mu\text{g ml}^{-1}$ . 200  $\mu$ l volumes of  
367 culture were then removed and transferred into the wells of a microtiter plate, at selected time

368 points. Bioluminescence (RLU) emitted by living cells was measured on a multilabel plate  
369 luminometer Victor<sup>2</sup><sup>TM</sup> (PerkinElmer). The results were expressed as means of at least three  
370 independent experiments, each including two measures at each time point. Because of  
371 insufficient sensitivity of bioluminescence at inoculums  $\leq 10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>, colony counting was  
372 performed on MHA plates for the highest dilution sample. Briefly, at selected time points after  
373 colistin addition, 100  $\mu$ l of culture were spread onto a MHA plate ( $10^{-1}$ ), and 100  $\mu$ l were added to  
374 900  $\mu$ l of MHB in a sterile microtube to achieve serial 1:10 dilutions from  $10^{-2}$  to  $10^{-6}$  into MHB.  
375 100  $\mu$ l of each suspension were spread onto MHA plates ( $n=3$ ), and the survivors were counted  
376 after an overnight incubation at 35°C.

377

378 **Real-time quantitative PCR experiments (RT-qPCR).** Total RNA was extracted from bacteria  
379 cultivated in drug-free MHB or in MHB supplemented with 8  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> colistin, up to an absorbance  
380 of  $A_{600nm} = 0.8 \pm 0.05$ . mRNA of target genes was reverse transcribed into cDNA, and quantified  
381 on a Rotor gene RG6000 Real Time PCR instrument (Qiagen) by using the primers listed in  
382 Table S2 and Fast SybrGreen kit (Qiagen). Gene expression was relativized to that of untreated  
383 strain PAO1 (set at 1) after internal normalization with gene *uvrD* taken as reference, as  
384 previously described (9). The data presented are means of at least three independent  
385 experiments.

386

387 **Lipid A isolation and analyzes by matrix assisted laser desorption/ionisation mass**  
388 **spectrometry (MALDI-TOF).**

389 The lipid A was directly extracted from bacterial cells by hydrolysis as previously described (37,  
390 41). Briefly, lyophilized bacteria were suspended in a mixture of 200  $\mu$ L of isobutyric acid and 1M  
391 ammonium hydroxide and placed for 1h30 at 100°C. The suspension was cooled and centrifuged  
392 10 min at 2 000 g. The supernatant was diluted in water and dried. The sample was solubilized in  
393 200  $\mu$ L of methanol and centrifuged at 2 000 g for 10 min. The lipid A was extracted from the  
394 pellet in a mixture of chloroform, methanol, and water (3: 1.5: 0.25, v:v:v). The lipid A then were  
395 analyzed by matrix assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry (Shimadzu AXIMA  
396 Performance) in linear mode by the LPS-BioSciences partner (Evry, France). Negative-ion and

397 positive ion mass spectra were recorded. Aliquots of 1 $\mu$ L of the solution were deposited on the  
398 target and covered with the matrix dihydroxybenzoic acid (DHB). The results were compared with  
399 data from previous publications (42).

400

#### 401 **Acknowledgments**

402 We are grateful to Loïs Andrey for his technical assistance.

403

404

#### 405 **Funding information**

406 This work was funded by the French ministry of health through the Santé publique France  
407 agency.

408

#### 409 **References**

410 1. Shlaes DM, Sahm D, Opiela C, Spellberg B. 2013. The FDA reboot of antibiotic  
411 development. *Antimicrob Agents Chemother* 57:4605-4607.

412 2. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B,  
413 Bartlett J. 2009. Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the Infectious Diseases  
414 Society of America. *Clin Infect Dis* 48:1-12.

415 3. Nation RL, Li J, Cars O, Couet W, Dudley MN, Kaye KS, Mouton JW, Paterson DL, Tam VH,  
416 Theuretzbacher U, Tsuji BT, Turnidge JD. 2015. Framework for optimisation of the clinical use  
417 of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. *Lancet Infect Dis* 15:225-234.

418 4. Michalopoulos A, Falagas ME. 2008. Colistin and polymyxin B in critical care. *Crit Care Clin*  
419 24:377-391.

420 5. Ernst RK, Yi EC, Guo L, Lim KB, Burns JL, Hackett M, Miller SI. 1999. Specific  
421 lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science*  
422 286:1561-1565.

- 423 6. Yan A, Guan Z, Raetz CR. 2007. An undecaprenyl phosphate-aminoarabinose flippase  
424 required for polymyxin resistance in *Escherichia coli*. J Biol Chem 282:36077-36089.
- 425 7. McPhee JB, Lewenza S, Hancock RE. 2003. Cationic antimicrobial peptides activate a two-  
426 component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and  
427 cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol 50:205-217.
- 428
- 429
- 430 8. Fernandez L, Gooderham WJ, Bains M, McPhee JB, Wiegand I, Hancock RE. 2010. Adaptive  
431 resistance to the "last hope" antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa*  
432 is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. Antimicrob Agents  
433 Chemother 54:3372-3382.
- 434 9. Muller C, Plésiat P, Jeannot K. 2011. A two-component regulatory system interconnects  
435 resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and beta-lactams in  
436 *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 55:1211-1221.
- 437 10. Fernandez L, Jensen H, Bains M, Wiegand I, Gooderham WJ, Hancock RE. 2012. The two-  
438 component system CprRS senses cationic peptides and triggers adaptive resistance in  
439 *Pseudomonas aeruginosa* independently of ParRS. Antimicrob Agents Chemother 56:6212-  
440 6222.
- 441 11. Macfarlane EL, Kwasnicka A, Ochs MM, Hancock RE. 1999. PhoP-PhoQ homologues in  
442 *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and  
443 polymyxin B resistance. Mol Microbiol 34:305-316.
- 444 12. McPhee JB, Bains M, Winsor G, Lewenza S, Kwasnicka A, Brazas MD, Brinkman FS,  
445 Hancock RE. 2006. Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB two-component

- 446 regulatory systems to Mg<sup>2+</sup>-induced gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol  
447 188:3995-4006.
- 448 13. Barrow K, Kwon DH. 2009. Alterations in two-component regulatory systems of phoPQ  
449 and pmrAB are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas*  
450 *aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 53:5150-5154.
- 451 14. Abraham N, Kwon DH. 2009. A single amino acid substitution in PmrB is associated with  
452 polymyxin B resistance in clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett  
453 298:249-254.
- 454 15. Miller AK, Brannon MK, Stevens L, Johansen HK, Selgrade SE, Miller SI, Hoiby N,  
455 Moskowitz SM. 2011. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin  
456 resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients.  
457 Antimicrob Agents Chemother 55:5761-5769.
- 458 16. Moskowitz SM, Brannon MK, Dasgupta N, Pier M, Sgambati N, Miller AK, Selgrade SE,  
459 Miller SI, Denton M, Conway SP, Johansen HK, Hoiby N. 2012. PmrB mutations promote  
460 polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic  
461 fibrosis patients. Antimicrob Agents Chemother 56:1019-1030.
- 462 17. Gutu AD, Sgambati N, Strasbourger P, Brannon MK, Jacobs MA, Haugen E, Kaul RK,  
463 Johansen HK, Hoiby N, Moskowitz SM. 2013. Polymyxin resistance of *Pseudomonas*  
464 *aeruginosa* phoQ mutants is dependent on additional two-component regulatory systems.  
465 Antimicrob Agents Chemother 57:2204-2215.
- 466 18. Bolard A, Schniederjans M, Haussler S, Triponney P, Valot B, Plésiat P, Jeannot K. 2019.  
467 Production of norspermidine contributes to aminoglycoside resistance in *pmrAB* mutants of  
468 *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 63.

- 469 19. Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. 2015. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in  
470 Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* 28:337-418.
- 471 20. Jeannot K, Sobel ML, El Garch F, Poole K, Plésiat P. 2005. Induction of the MexXY efflux  
472 pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction. *J Bacteriol*  
473 187:5341-5346.
- 474 21. Morita Y, Sobel ML, Poole K. 2006. Antibiotic inducibility of the MexXY multidrug efflux  
475 system of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the antibiotic-inducible PA5471 gene  
476 product. *J Bacteriol* 188:1847-1855.
- 477 22. Guénard S, Muller C, Monlezun L, Benas P, Broutin I, Jeannot K, Plésiat P. 2014. Multiple  
478 mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of  
479 *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 58:221-228.
- 480 23. Westbrook-Wadman S, Sherman DR, Hickey MJ, Coulter SN, Zhu YQ, Warrenner P, Nguyen  
481 LY, Shawar RM, Folger KR, Stover CK. 1999. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa*  
482 efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. *Antimicrob Agents Chemother*  
483 43:2975-2983.
- 484 24. Caughlan RE, Sriram S, Daigle DM, Woods AL, Bucu J, Peterson RL, Dzink-Fox J, Walker S,  
485 Dean CR. 2009. Fmt bypass in *Pseudomonas aeruginosa* causes induction of MexXY efflux  
486 pump expression. *Antimicrob Agents Chemother* 53:5015-5021.
- 487 25. Bergen PJ, Bulitta JB, Forrest A, Tsuji BT, Li J, Nation RL. 2010.  
488 Pharmacokinetic/pharmacodynamic investigation of colistin against *Pseudomonas*  
489 *aeruginosa* using an *in vitro* model. *Antimicrob Agents Chemother* 54:3783-3789.
- 490 26. Tam VH, Schilling AN, Vo G, Kabbara S, Kwa AL, Wiederhold NP, Lewis RE. 2005.  
491 Pharmacodynamics of polymyxin B against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents*  
492 *Chemother* 49:3624-3630.

- 493 27. Bulitta JB, Yang JC, Yohonn L, Ly NS, Brown SV, D'Hondt RE, Jusko WJ, Forrest A, Tsuji BT.  
494 2010. Attenuation of colistin bactericidal activity by high inoculum of *Pseudomonas*  
495 *aeruginosa* characterized by a new mechanism-based population pharmacodynamic model.  
496 *Antimicrob Agents Chemother* 54:2051-2062.
- 497 28. CLSI. 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-  
498 Seventh Informational Supplement. CLSI Document M100-S27. Clinical and Laboratory  
499 Standards Institute, Wayne, PA.
- 500 29. Johnson L, Mulcahy H, Kanevets U, Shi Y, Lewenza S. 2012. Surface-localized spermidine  
501 protects the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane from antibiotic treatment and  
502 oxidative stress. *J Bacteriol* 194:813-826.
- 503 30. Ohnuma M, Ganbe T, Terui Y, Niitsu M, Sato T, Tanaka N, Tamakoshi M, Samejima K,  
504 Kumasaka T, Oshima T. 2011. Crystal structures and enzymatic properties of a  
505 triamine/agmatine aminopropyltransferase from *Thermus thermophilus*. *J Mol Biol* 408:971-  
506 986.
- 507 31. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. 2000. Substrate  
508 specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas*  
509 *aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:3322-3327.
- 510 32. Shafer WM, Qu X, Waring AJ, Lehrer RI. 1998. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae*  
511 susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the  
512 resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1829-1833.
- 513 33. Padilla E, Llobet E, Domenech-Sanchez A, Martinez-Martinez L, Bengoechea JA, Alberti S.  
514 2010. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and  
515 virulence. *Antimicrob Agents Chemother* 54:177-183.



- 516 34. Cheng YH, Lin TL, Lin YT, Wang JT. 2018. A putative RND-type efflux pump, H239\_3064,  
517 contributes to colistin resistance through CrrB in *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob  
518 Chemother 73:1509-1516.
- 519 35. Poole K, Lau CH, Gilmour C, Hao Y, Lam JS. 2015. Polymyxin Susceptibility in  
520 *Pseudomonas aeruginosa* Linked to the MexXY-OprM Multidrug Efflux System. Antimicrob  
521 Agents Chemother 59:7276-7289.
- 522 36. Matsuo Y, Eda S, Gotoh N, Yoshihara E, Nakae T. 2004. MexZ-mediated regulation of  
523 *mexXY* multidrug efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa* by binding on the  
524 *mexZ-mexX* intergenic DNA. FEMS Microbiol Lett 238:23-28.
- 525 37. El Hamidi A, Tirsoaga A, Novikov A, Hussein A, Caroff M. 2005. Microextraction of  
526 bacterial lipid A: easy and rapid method for mass spectrometric characterization. J Lipid Res  
527 46:1773-1778.
- 528 38. Han ML, Zhu Y, Creek DJ, Lin YW, Gutu AD, Hertzog P, Purcell T, Shen HH, Moskowitz SM,  
529 Velkov T, Li J. 2019. Comparative Metabolomics and Transcriptomics Reveal Multiple  
530 Pathways Associated with Polymyxin Killing in *Pseudomonas aeruginosa*. mSystems 4.
- 531 39. Kaniga K, Delor I, Cornelis GR. 1991. A wide-host-range suicide vector for improving  
532 reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia*  
533 *enterocolitica*. Gene 109:137-141.
- 534 40. Choi KH, Schweizer HP. 2006. mini-Tn7 insertion in bacteria with single *attTn7* sites:  
535 example *Pseudomonas aeruginosa*. Nat Protoc 1:153-161.
- 536 41. Ciornei CD, Novikov A, Beloin C, Fitting C, Caroff M, Ghigo JM, Cavaillon JM, Adib-Conquy  
537 M. 2010. Biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* bacteria undergo lipopolysaccharide  
538 structural modifications and induce enhanced inflammatory cytokine response in human  
539 monocytes. Innate Immun 16:288-301.

- 540 42. Hoiby N, Krogh Johansen H, Moser C, Song Z, Ciofu O, Kharazmi A. 2001. *Pseudomonas*  
541 *aeruginosa* and the *in vitro* and *in vivo* biofilm mode of growth. *Microbes Infect* 3:23-35.  
542  
543

544 **TABLE 1** Impact of Ara4N synthesis pathway and genes belonging to the ParRS regulon on the  
545 bactericidal and bacteriostatic effects of colistin.

Strain	Killing of bacteria (log <sub>10</sub> CFU ml <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	MIC of colistin (μg ml <sup>-1</sup> )
PAO1	ND	0.5
PAO1:: <i>lux</i>	- 0.68 ± 0.07	0.5
PAO1:: <i>lux-ΔpmrAB</i>	- 0.70 ± 0.19	0.5
PAO1:: <i>lux-ΔcprRS</i>	- 0.78 ± 0.20	0.5
PAO1:: <i>lux-ΔparRS</i>	<b>- 3.06 ± 0.34</b>	0.25
PAO1:: <i>lux-Δarn</i>	<b>- 1.85 ± 0.10</b>	0.5
PAO1:: <i>lux-Δ4TCS-Δarn</i> <sup>b</sup>	<b>-3.05 ± 0.28</b>	0.25
PAO1:: <i>lux-ΔPA4773</i>	<b>- 1.98 ± 0.02</b>	0.5
PAO1:: <i>lux-ΔPA4774</i>	<b>-1.69 ± 0.46</b>	0.5
PAO1:: <i>lux-ΔPA4775</i>	<b>-1.72 ± 0.53</b>	0.5
PAO1:: <i>lux-ΔmexXY</i>	<b>- 1.77 ± 0.34</b>	0.5
PAO1:: <i>lux-ΔmexXY-Δarn</i>	<b>-1.66 ± 0.49</b>	0.5
PAO1:: <i>lux-ΔmexXY-ΔPA4773</i>	<b>-1.99 ± 0.68</b>	0.5
PAO1:: <i>lux-ΔmexXY-ΔPA4773-Δarn</i>	<b>-1.76 ± 0.42</b>	0.5
PAO1:: <i>lux-ΔmexXY</i> (pAK1900)	<b>-1.19 ± 0.33</b>	0.5
PAO1:: <i>lux-ΔmexXY</i> (pAGH97)	-0.77 ± 0.16	0.5
PAO1:: <i>lux</i> (pAK1900)	ND	0.5
PAO1:: <i>lux</i> (pAKarn)	ND	4
PAO1:: <i>lux-ΔmexXY</i> (pAKarn)	ND	1
PAO1:: <i>lux-Δarn</i> (pAGH97)	ND	0.5
PAOW2	ND	2
PAOW2Δarn	ND	1
PAOW2ΔmexXY	ND	1

546 <sup>a</sup> The indicated values correspond to the reduction of an initial inoculum of  $5.10^8$  CFU ml<sup>-1</sup> after  
547 2 h of colistin exposure ( $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), and are the means of at least three independent experiments.  
548 Values in boldface indicate a bacterial killing at least  $1.5 \log_{10}$  higher than those of PAO1::*lux*.  
549 Standard deviation is mentioned.

550 <sup>b</sup> Mutant PAO1::*lux-Δ4TCS-Δam* lacks the four operons *pmrAB*, *cprRS*, *parRS* and *phoPQ*, in  
551 addition to operon *arnBCADTEF-ugd*  
552 ND : not determined  
553

554 **TABLE 2** MexXY/OprM contributes to the acquired resistance of *pmrB* mutants to colistin

Strain	MIC ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )			
	Colistin	Amikacin	Ciprofloxacin	Cefepime
PAO1	0.5	2	0.06	1
AB8.2	128	4	0.06	1
AB8.2 $\Delta$ mexXY	4	0.25	0.03	0.5
AB8.2 $\Delta$ mexXY(pAK1900)	4	0.25	0.03	0.5
AB8.2 $\Delta$ mexXY(pAGH97)	128	16	0.25	4
AB8.2 $\Delta$ arn	1	4	0.12	1
AB8.2 $\Delta$ mexZ	256	16	0.25	4
AB16.2	128	8	0.12	2
AB16.2 $\Delta$ mexXY	8	0.25	0.06	1
AB16.2 $\Delta$ mexXY(pAK1900)	8	0.25	0.06	1
AB16.2 $\Delta$ mexXY(pAGH97)	256	32	0.25	4
AB16.2 $\Delta$ arn	1	8	0.12	2
AB16.2 $\Delta$ parRS	4	8	0.06	2
AB16.2 $\Delta$ mexZ	256	32	0.25	4
2243	256	8	16	2
2243 $\Delta$ mexXY	8	0.25	8	0.5
2243 $\Delta$ mexXY(pAK1900)	8	0.25	8	0.5
2243 $\Delta$ mexXY(pAGH97)	512	16	>16	4
3795	>512	32	4	4
3795 $\Delta$ mexXY	4	0.5	1	2
3795 $\Delta$ mexXY(pAK1900)	4	0.5	1	2
3795 $\Delta$ mexXY(pAGH97)	>512	64	8	16

555

556

557 **Figure legends**

558

559 **FIG 1** Relationship between the bacterial inoculum size and concentration of colistin required to  
560 reduce  $\geq 2 \text{ Log}_{10} \text{ CFU ml}^{-1}$  of strain PAO1::*lux* after 2h of drug exposure. The exponential  
561 correlation between the two parameters is the following:  $y=0.001^{e^{1.3252x}}$ .

562

563 **FIG 2** ParRS contributes to the protection of *P. aeruginosa* against colistin. (A) Low ( $10^6 \text{ CFU ml}^{-1}$ )  
564 and (B) high inoculums ( $5.10^8 \text{ CFU ml}^{-1}$ ) of strain PAO1::*lux* and mutant PAO1::*lux*- $\Delta$ *parRS*  
565 were exposed to 0.4 and 8  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of colistin, respectively. White and black bars represent the  
566 number of living cells at the beginning ( $t=0$ ) and after 2 h of colistin treatment, respectively.  
567 Statistically significant ( $p<0.05^*$ ,  $p<0.005^{**}$ ) differences between the strains were established with  
568 the paired student *t* test.

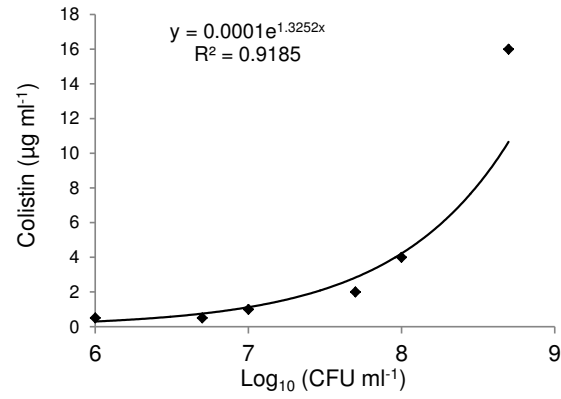
569

570 **FIG 3** Influence of pump MexXY on the expression of genes *arnA*, PA4773, and *pmrA*. Transcript  
571 levels of genes *mexY* (A), *arnA* (B), PA4773 (C), and *pmrA* (D) were assessed in PAO1::*lux* by  
572 real-time quantitative PCR (RT-qPCR), and various deletion mutants. Log phase bacteria were  
573 grown in absence (white bars) or presence of 8  $\mu\text{g ml}^{-1}$  colistin during 2h (black bars). Error bars  
574 indicate SD of three biological replicates. Statistically significant ( $p<0.05^*$ ,  $p<0.005^{**}$ ) differences  
575 between the strains were established with the paired student *t* test.

576

577 **FIG 4** Impact of mutationally activated ParR on expression of genes *arnA* (A), PA4773 (B), and  
578 *pmrA* (C). RT-qPCR experiments were performed on strain PAO1::*lux*, PAOW2 (that carries the  
579 M59I substitution in regulator ParR) and various deletion mutants grown in presence of 8  $\mu\text{g ml}^{-1}$   
580 colistin for 2h (black bars). Error bars indicate SD of three biological replicates. Statistically  
581 significant ( $p<0.05^*$ ,  $p<0.005^{**}$ ) differences between the strains were established with the paired  
582 student *t* test.

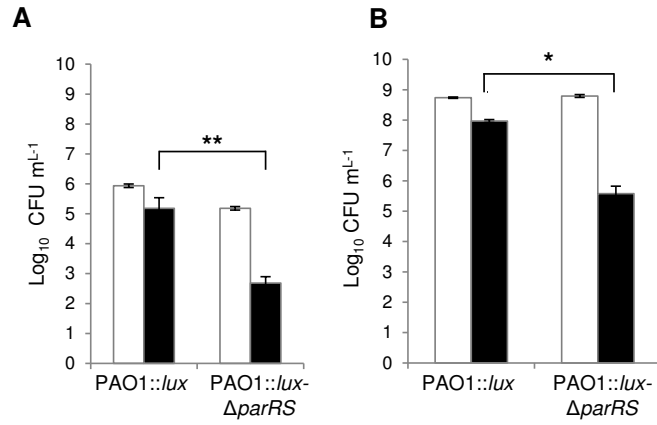
583



**FIG 1** Relationship between the bacterial inoculum size and concentration of colistin required to reduce  $\geq 2$  Log<sub>10</sub> CFU ml<sup>-1</sup> of strain PAO1::*lux* after 2h of drug exposure.

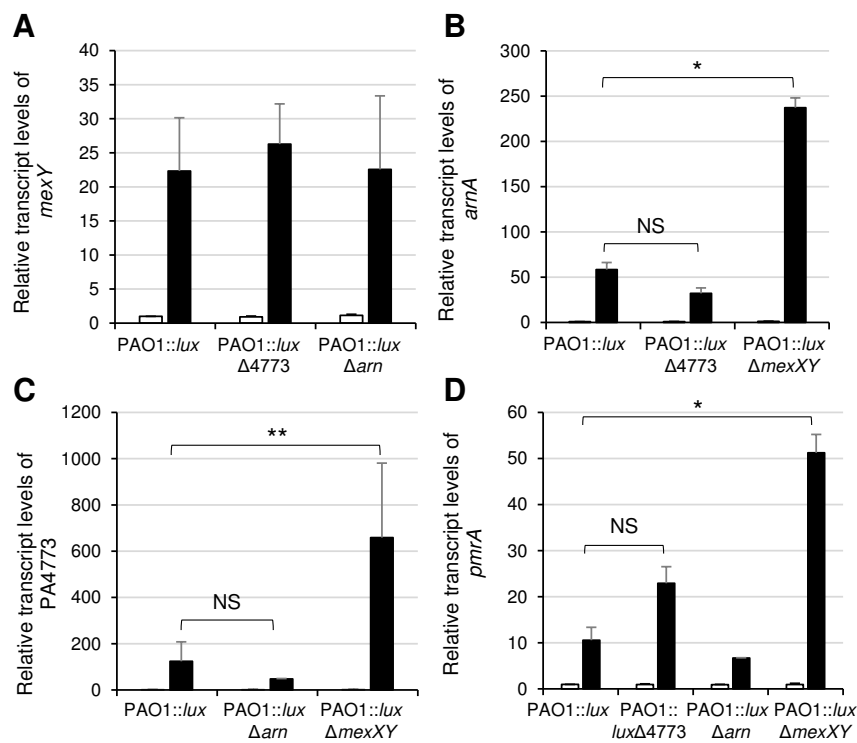
The exponential correlation between the two parameters is the following :

$$y=0.001e^{1.3252x}$$

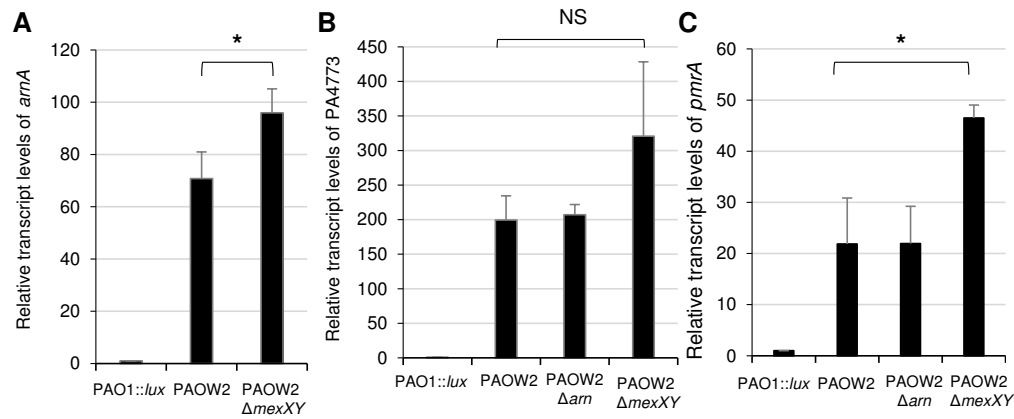


**FIG 2** ParRS contributes to the protection of *P. aeruginosa* against colistin. (A) Low ( $10^6$  CFU ml<sup>-1</sup>) and (B) high inoculums ( $5.10^8$  CFU ml<sup>-1</sup>) of strain PAO1::lux and mutant PAO1::lux-ΔparRS were exposed to 0.4 and 8 μg ml<sup>-1</sup> of colistin, respectively. White and black bars represent the number of living cells at the beginning (t=0) and after 2 h of colistin treatment, respectively. Statistically significant ( $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.005^{**}$ ) differences between the strains were established with paired student t test.





**FIG 3** Influence of pump MexXY on the expression of genes *arnA*, PA4773, and *pmrA*. Transcript levels of genes *mexY* (A), *arnA* (B), PA4773 (C), and *pmrA* (D) were assessed in PAO1::lux by real-time quantitative PCR (RT-qPCR), and various deletion mutants. Log phase bacteria were grown in absence (white bars) or presence of 8  $\mu\text{g ml}^{-1}$  colistin during 2h (black bars). Error bars indicate SD of three biological replicates. Statistically significant ( $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.005^{**}$ ) differences between the strains were established with the paired student *t* test.



**FIG 4** Impact of mutationally activated ParR on expression of genes *arnA* (A), PA4773 (B), and *pmrA* (C). RT-qPCR experiments were performed on strain PAO1::lux, PAOW2 (that carries the M59I substitution in regulator ParR) and various deletion mutants grown in presence of 8  $\mu\text{g ml}^{-1}$  colistin for 2h (black bars). Error bars indicate SD of three biological replicates. Statistically significant ( $p < 0.05^*$ ,  $p < 0.005^{**}$ ) differences between the strains were established with the paired student *t* test.

### 1.3.2 Matériel supplémentaire de l'article

**TABLE S1** Strains and plasmids used in the study

Strains or plasmids	Genotype or description	Source
<b><i>P. aeruginosa</i></b>		
PAO1	Wild-type, colistin susceptible reference strain	(1)
PAO1:: <i>lux</i>	PAO1:: <i>attTn7</i> ( <i>P<sub>lac-luxCDABE</sub></i> ) <sup>a</sup>	Present study
PAO1:: <i>lux-ΔpmrAB</i>	PAO1:: <i>lux</i> lacking 1,941-bp from operon <i>pmrAB</i>	Present study
PAO1:: <i>lux-ΔcprRS</i>	PAO1:: <i>lux</i> lacking 1,499-bp from operon <i>cprRS</i>	Present study
PAO1:: <i>lux-ΔparRS</i>	PAO1:: <i>lux</i> lacking 1,815-bp from operon <i>parRS</i>	Present study
PAO1:: <i>lux-Δarn</i>	PAO1:: <i>lux</i> lacking 8,755-bp from operon <i>arnBCADTEF-ugd</i>	Present study
PAO1:: <i>lux-ΔTCS-Δarn</i>	PAO1:: <i>lux</i> lacking <i>parRS</i> , <i>pmrAB</i> , <i>cprRS</i> , <i>phoPQ</i> and <i>arn</i>	Present study
PAO1Δ <i>oprD</i>	PAO1 lacking 910-bp from gene <i>oprD</i>	(2)
PAO1ΔPA1797	PAO1 lacking 1,794-bp from gene PA1797	Present study
PAO1Δ2358	PAO1 lacking 379-bp from gene PA2358	Present study
PAO1Δ2655	PAO1 lacking 263-bp from gene PA2655	Present study
PAO1:: <i>lux-ΔPA4773</i>	PAO1:: <i>lux</i> lacking 465-bp from gene PA4773	Present study
PAO1:: <i>lux-ΔPA4774</i>	PAO1:: <i>lux</i> lacking 921-bp from gene PA4774	Present study
PAO1:: <i>lux-ΔPA4775</i>	PAO1:: <i>lux</i> lacking 714-bp from gene PA4775	Present study
PAO1:: <i>lux-ΔmexXY</i>	PAO1:: <i>lux</i> lacking 4,185-bp from operon <i>mexXY</i>	Present study
PAO1:: <i>lux-ΔmexXY-Δarn</i>	PAO1:: <i>lux</i> lacking operons <i>mexXY</i> and <i>arn</i>	Present study
PAO1:: <i>lux-ΔmexXY-ΔPA4773</i>	PAO1:: <i>lux</i> lacking operon <i>mexXY</i> and gene PA4773	Present study
PAO1:: <i>lux-ΔmexXY-ΔPA4773-Δarn</i>	PAO1:: <i>lux</i> lacking operons <i>mexXY</i> and <i>arn</i> , and gene PA4773	Present study
PAOW2	Spontaneous ParR (M59I) mutant from PAO1, AMK <sup>R</sup>	(3)
PAOW2Δ <i>mexXY</i>	PAOW2 lacking operon <i>mexXY</i>	Present study
AB8.2	Spontaneous PmrB (V28G) mutant derived from PAO1, CST <sup>R</sup>	(4)
AB8.2Δ <i>mexXY</i>	AB8.2 lacking operon <i>mexXY</i>	Present study
AB8.2Δ <i>arn</i>	AB8.2 lacking operon <i>arnBCADTEF-ugd</i>	Present study
AB16.2	Spontaneous PmrB (ΔL172) mutant derived from PAO1, CST <sup>R</sup>	(4)
AB16.2Δ <i>mexXY</i>	AB16.2 lacking operon <i>mexXY</i>	(4)
AB16.2Δ <i>arn</i>	AB.2 lacking operon <i>arnBCADTEF-ugd</i>	(4)
2243	Clinical PmrB mutant (Q105P), CST <sup>R</sup>	(4)
2243Δ <i>mexXY</i>	2243 lacking operon <i>mexXY</i>	Present study
3795	Clinical PmrB mutant (G188D), CST <sup>R</sup>	(4)
3795Δ <i>mexXY</i>	3795 lacking operon <i>mexXY</i>	Present study

***E. coli***

DH5 $\alpha$	F- $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>argF-lacZYA</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> ( <i>r<sub>K</sub></i> , <i>m<sub>K</sub></i> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44</i> $\lambda$ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Life technologies
HB101	<i>supE44 hsdS20</i> ( <i>r<sub>B</sub></i> , <i>m<sub>B</sub></i> <sup>-</sup> ) <i>recA13 ara14 proA2 lacY1 galk2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 leuB6 thi-1</i>	(5)
CC118 $\lambda$ pir	$\Delta$ ( <i>ara-leu</i> ) <i>araD</i> $\Delta$ <i>lacX74 galE galk phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE</i> (Am) <i>recA1</i> $\lambda$ pir lysogen	(6)

**Plasmids**

pAK1900	Cloning vector carrying <i>lac</i> promoter (AMP <sup>R</sup> )	(7)
pAKAm	pAK1900 carrying full-length operon <i>arnBCADTEF-ugd</i> cloned on a 9,059-bp HindIII/XbaI DNA fragment	Present study
pAGH97	pAK1900 carrying full-length operon <i>mexXY</i> and the <i>mexZ-mexX</i> intergenic region cloned on a 5,000-bp HindIII/XbaI DNA fragment	(8)
pRK2013	Helper vector for mobilization of non-self-transmissible plasmids (KAN <sup>R</sup> )	(9)
pKNG101	Marker exchange suicide vector, <i>sacBR</i> , <i>mobRK2</i> , <i>oriR6K</i> (STR <sup>R</sup> )	(10)
pCR2.1-TOPO	TA cloning vector, <i>lacZ<math>\alpha</math></i> ColE1 f1 <i>ori</i> (AMP <sup>R</sup> , KAN <sup>R</sup> )	Life technologies
pCR-Blunt II-TOPO	Cloning vector, <i>lacZ<math>\alpha</math></i> <i>ccdB</i> pUC <i>ori</i> (KAN <sup>R</sup> , ZEO <sup>R</sup> )	Life technologies
pKNG $\Delta$ <i>pmrAB</i>	BamHI/ApaI 1,241 kb fragment composed of sequences flanking the 5' and 3' ends of <i>pmrAB</i> , cloned in pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	(3)
pKNG $\Delta$ <i>cprRS</i>	BamHI/ApaI 1,004-bp fragment composed of sequences flanking the 5' and 3' ends of <i>cprRS</i> , cloned in pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	Present study
pKNG $\Delta$ <i>parRS</i>	ApaI/ApaI 1,045 kb fragment composed of sequences flanking the 5' and 3' ends of <i>parRS</i> , cloned in pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	(3)
pKNG $\Delta$ <i>phoPQ</i>	BamHI/ApaI 1,551-bp fragment composed of sequences flanking the 5' and 3' ends of <i>phoPQ</i> , cloned in pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	Present study
pKNG $\Delta$ <i>arn</i>	BamHI/ApaI 1,135-kb fragment composed of sequences flanking the 5' and 3' ends of <i>arnBCADTEF-ugd</i> ( <i>arn</i> ), cloned in pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	(4)
pKNG $\Delta$ PA1797	BamHI/ApaI 1,216-kb fragment composed of sequences flanking the 5' and 3' ends of PA1797, cloned in pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	Present study
pKNG $\Delta$ PA2358	BamHI/ApaI 1,285-kb fragment composed of sequences flanking the 5' and 3' ends of PA2358, cloned in pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	Present study

pKNGΔPA2655	BamHI/ApaI 1,171-kb fragment composed of sequences flanking the 5' and 3' ends of PA2655, cloned into pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	Present study
pKNGΔPA4773	BamHI/ApaI 1,045-kb fragment composed of sequences flanking the 5' and 3' ends of PA4773, cloned into pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	(4)
pKNGΔPA4774	BamHI/ApaI 1,070-kb fragment composed of sequences flanking the 5' and 3' ends of PA4774, cloned in pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	(4)
pKNGΔPA4775	BamHI/ApaI 1,027-kb fragment composed of sequences flanking the 5' and 3' ends of PA4775, cloned in pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	(4)
pKNGΔ <i>mexXY</i>	BamHI/ApaI 1,756-kb fragment composed of sequences flanking the 5' and 3' ends of <i>mexXY</i> , cloned in pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	(11)
pKNGΔ <i>mexZ</i>	BamHI/ApaI 1.212 kb fragment composed of sequences flanking the 5' and 3' ends of <i>mexZ</i> , cloned in pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	(3)
pUC18-mini-Tn7T-Gm <sup>R</sup> - <i>lux</i>	Mobilizable mini-Tn7 <i>luxCDABE</i> transcriptional fusion vector (GEN <sup>R</sup> , AMP <sup>R</sup> )	(12)
pUC18-mini-Tn7T-Gm <sup>R</sup> -P <sub><i>lac</i></sub> - <i>lux</i>	Mobilizable mini-Tn7 overexpressing <i>luxCDABE</i> from promoter P <sub><i>lac</i></sub> , used for construction of luminescent bacteria (GEN <sup>R</sup> , AMP <sup>R</sup> )	Present study
pTNS3	Source of <i>tnsABCD</i> genes for transposition of mini-Tn7 (AMP <sup>R</sup> )	(13)
pFLP2	Source of Flp recombinase (AMP <sup>R</sup> )	(14)

Selective markers encoding resistance to amikacin (AMK<sup>R</sup>), colistin (CST<sup>R</sup>), ampicillin or ticarcillin (AMP<sup>R</sup>), kanamycin (KAN<sup>R</sup>), streptomycin (STR<sup>R</sup>), , zeocin (ZEO<sup>R</sup>), or gentamicin (GEN<sup>R</sup>).

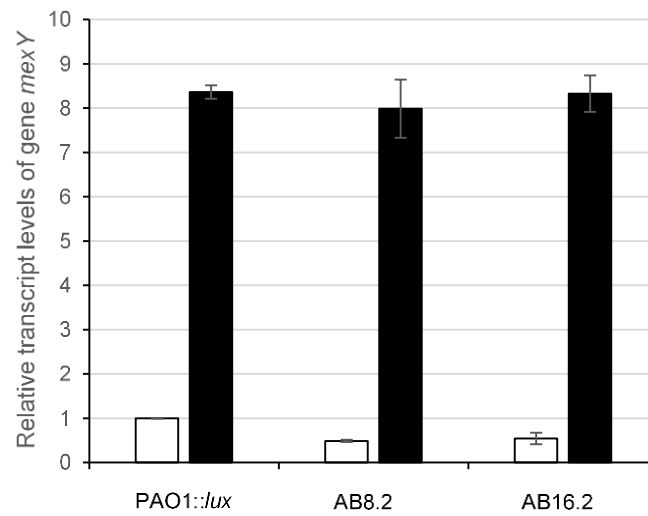
<sup>a</sup>The P<sub>*lac*</sub>-*luxCDABE* sequence is located as a single copy in the *attTn7* insertion site of PAO1 chromosome.

**TABLE S2** Primers used in the study

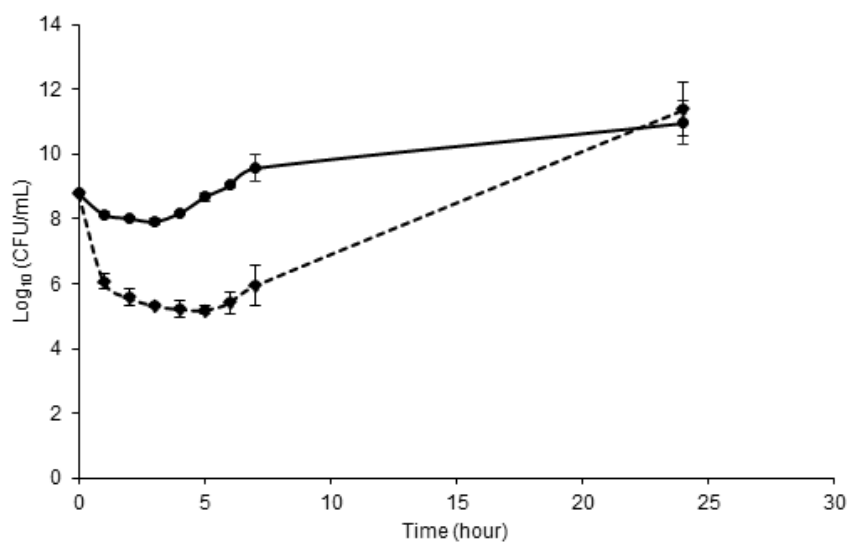
Primer name	Sequence (5' – 3')	Source
<b>Oligonucleotides for gene inactivation</b>		
PCR-iphopQA1	GCAGAACGGAGAAACACCAT	This study
PCR-iphopQA2	GTATGCGCCAGCAGTTTCATGAGGTTC	This study
PCR-iphopQA3	CTGCTGGCGCATACGTTTCGCTACAGT	This study
PCR-iphopQA4	AAGCTGATCACCAGGGTCAC	This study
PCR-icprRSA1	CACCTGGAAGCTGTTCGATG	This study
PCR-icprRSA2	TTCATGCTGCTCTGGAACAT	This study
PCR-icprRSA3	GATGATCGCAGCTGGCGACAGACCT	This study

PCR-icprRSA4	CAGCTGCGATCATCATCGGCAACCTG	This study
PCR-i2655A1	GATTGCGCCGAGGAGTTG	This study
PCR-i2655A2	CCAGATCCATCGTCCAAGACCTCCTT	This study
PCR-i2655A3	GACGATGGATCTGGGGGACCTACGG	This study
PCR-i2655A4	GAGCAGACCAACCTGCTG	This study
PCR-i2358A1	CTGGCCGAGTACTTCATCGT	This study
PCR-i2358A2	GCCTGGAGTCCGGCCAACGAGATTC	This study
PCR-i2358A3	GCCGGACTCCAGGCCTACAAGCTGAAC	This study
PCR-i2358A4	GGTGATCGCCTGGAAGAAG	This study
PCR-i1797A1	CTGGCTGGATAGCGTCGT	This study
PCR-i1797A2	ACTCCTTGAAAGATGCATTGCACGAAA	This study
PCR-i1797A3	ATCTTTCAAGGAGTCCCATGAGAAG	This study
PCR-i1797A4	CGGGTCCGTATATGCAGTCT	This study
<b>Oligonucleotides for RT-qPCR</b>		
uvrD-RT-1	CACGCCTCGCCCTACAGCA	(3)
uvrD-RT-2	GGATCTGGAAGTTCTGCTCAGC	(3)
arnA-RT-1	GTGGCTCGAATACCATGTGA	This study
arnA-RT-2	TGCCGTATTTACGCAGTAG	This study
mexY-RT-1	TTACCTCCTCCAGCGGC	This study
mexY-RT-2	GTGAGGCGGGCGTTGTG	This study
PA4773-RT-1	CAGTGGATCGAGGAAAGCAT	This study
PA4773-RT-2	GTACTIONCGGCCAGGTATGG	This study
pmrB-RT1	ACGAACCTCAACCTCCTGCTG	This study
pmrB-RT2	ATCTGCTCCATCAAGGTGCT	This study
<b>Oligonucleotides for complementation with pAKarn</b>		
PA3552fw	GCAGCATTCAGCGACATAAA	This study
PA3559Rv	GGAGAACCGGCGGATAAC	This study
<b>Oligonucleotides for <i>placluxBCADE</i> construction</b>		
PlacA1	CGGACTAGTCGATTCATTAATGCAGCTGG	This study
PlacA2	CGGGGATCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT	This study

**FIG S1** Expression levels of gene *mexY* in PAO1::*lux* and the *in vitro* PmrB mutants AB8.2 and AB16.2, non- (white bars) or exposed to colistin (black bars).



**FIG S2** Impact of two-component system ParRS on the bactericidal effect of colistin. Surviving cells of strains PAO1::*lux* (solid line) and PAO1::*lux* $\Delta$ *parRS* (dashed line) exposed to 8  $\mu\text{g ml}^{-1}$  of colistin were counted by luminometry over 24h, and expressed as CFU per ml. These data represent the means and standard deviations of three independent experiments.



## 1.4 Résultats complémentaires

### 1.4.1 Rôle des S2C dans l'induction de l'opéron *arn* en présence de colistine

Afin de mieux comprendre la réponse de *P. aeruginosa* à la colistine, nous avons mesuré par RTq-PCR les niveaux d'expression du gène *arnA*, premier gène de l'opéron *arnBCADTEF-ugd*, et des gènes codant les différents systèmes à deux composants (S2C) inductibles par les peptides polycationiques (notamment *pmrB*, PA1797 et *cprS*) (**Figure 19A**). Etant donné que le niveau d'expression de l'opéron *parRS* n'est pas modifié en présence de colistine (données non présentées), nous avons choisi de mesurer les niveaux de transcrits du gène PA1797, situé en amont et dont l'expression est totalement dépendante de l'activité de ParRS (Muller et al., 2011).

En accord avec les précédents travaux sur les effets inducteurs de la colistine, l'opéron *arn* (9,5 fois) (Moskowitz et al., 2004) ainsi que les gènes codant pour les S2C le régulant, c'est-à-dire *pmrB* (9,1 fois), *cprS* (3,6 fois) (Fernández et al., 2012) et PA1797 (32 fois) (Muller et al., 2011) étaient induits par l'ajout de 8 mg/mL de colistine. Afin de déterminer le rôle de chacun des S2C dans l'induction de l'opéron *arn*, nous avons mesuré l'impact de leur délétion sur l'expression du gène *arnA*. Comme l'indique la figure 19B, la délétion d'un seul de ces S2C ne permet pas d'abolir l'induction de l'opéron *arn*. La délétion des opérons *parRS* ou *cprRS* contribue à une diminution significative (4 fois) de l'expression de *arn*, tandis que celle de l'opéron *pmrAB* a un effet plus modéré (1,3 fois). La double délétion de l'opéron *parRS* avec les opérons *pmrAB* ou *cprRS* n'a pas eu d'effet supplémentaire sur l'expression de l'opéron *arn* (données non présentées). Ces données suggèrent que les S2C ParRS et

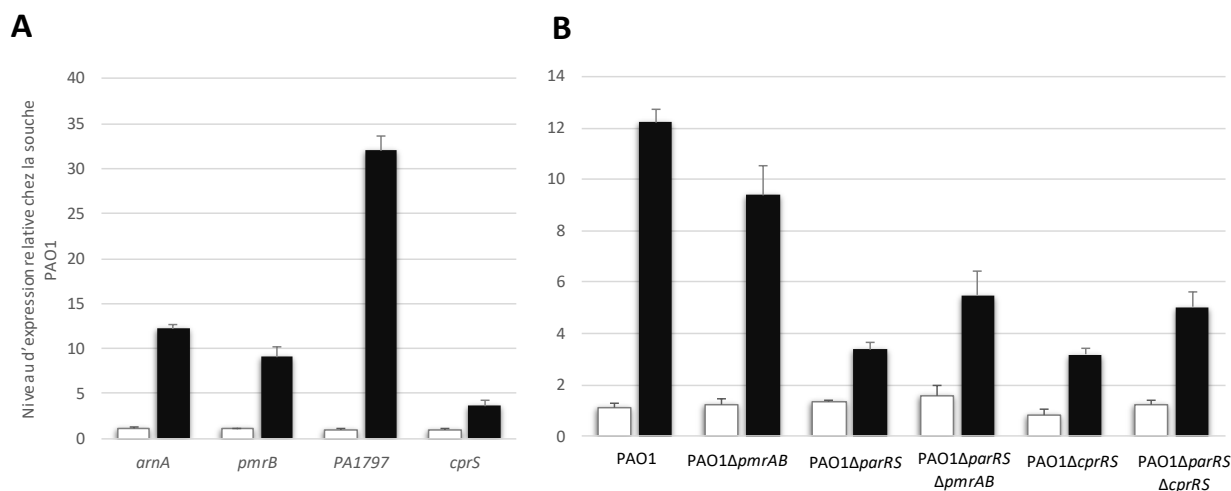


CprRS jouent un rôle plus important dans la tolérance à la colistine que le système PmrAB. Cependant, les résultats publiés dans l'article ont permis d'aller plus loin, et de montrer que la délétion de l'opéron *cprRS* n'avait pas d'effet sur la tolérance à la colistine chez *P. aeruginosa*, contrairement à celle de l'opéron *parRS* (Puja et al., 2020).

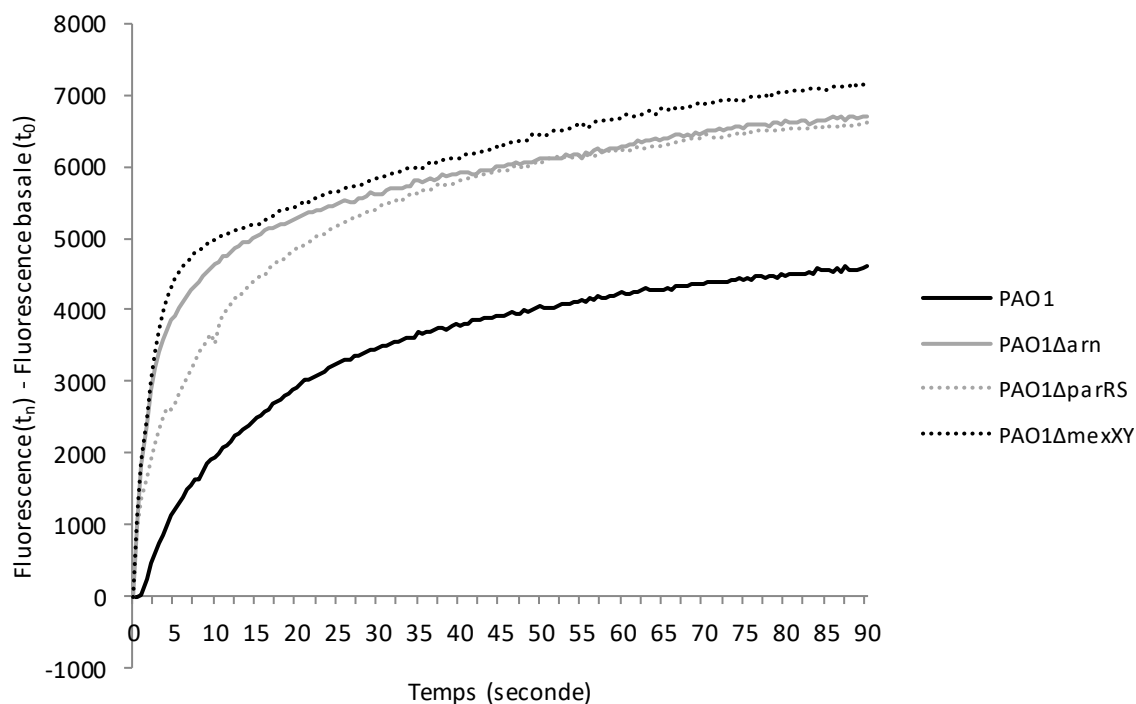
#### **1.4.2 Impact de la délétion des opérons *arn* et *mexXY* sur la perméabilité membranaire**

Afin de mieux étudier le rôle fonctionnel de l'opéron *arn*, de la pompe d'efflux *mexXY* et du système à deux composants *parRS* dans la tolérance à la colistine chez *P. aeruginosa*, nous avons évalué l'impact de leur délétion sur la perméabilité de la membrane bactérienne. Ainsi, nous avons mesuré après injection de la colistine, la vitesse de pénétration de 1-N-phénylnaphtylamine (NPN) au sein de la bicouche phospholipidique. Le NPN a la particularité d'être fluorescent dans un environnement hydrophobe. Une émission de fluorescence élevée correspond à une augmentation de la vitesse de pénétration du NPN dans la bicouche phospholipidique et par conséquent à une barrière cellulaire plus perméable (Helander and Mattila-Sandholm, 2000) (Figure 20).

La délétion des opérons *arn*, *parRS* et *mexXY* conduit à une augmentation significative de 46 à 55% de la perméabilité membranaire. Ces résultats montrent que l'absence du système d'efflux MexXY(OprM) a le même impact sur la perméabilité membranaire de *P. aeruginosa* que celle de la modification du LPS par l'opéron *arn*.



**Figure 19. Effet de la colistine sur les niveaux d'expression de différents gènes.** Le nombre de transcrits a été mesuré par RTq-PCR chez la souche PAO1 (A et B) et chez ses mutants de délétions (B) non-exposés (barres blanches) ou exposés à 8 µg/mL de colistine. **A.** Niveaux d'expression des gènes *arnA*, *pmrB*, *cprS* et *PA1797*. **B.** Niveaux d'expression du gène *arnA* chez la souche PAO1 et ses mutants de délétion *PAO1ΔpmrAB*, *PAO1ΔparRS* et *PAO1ΔparRS*.

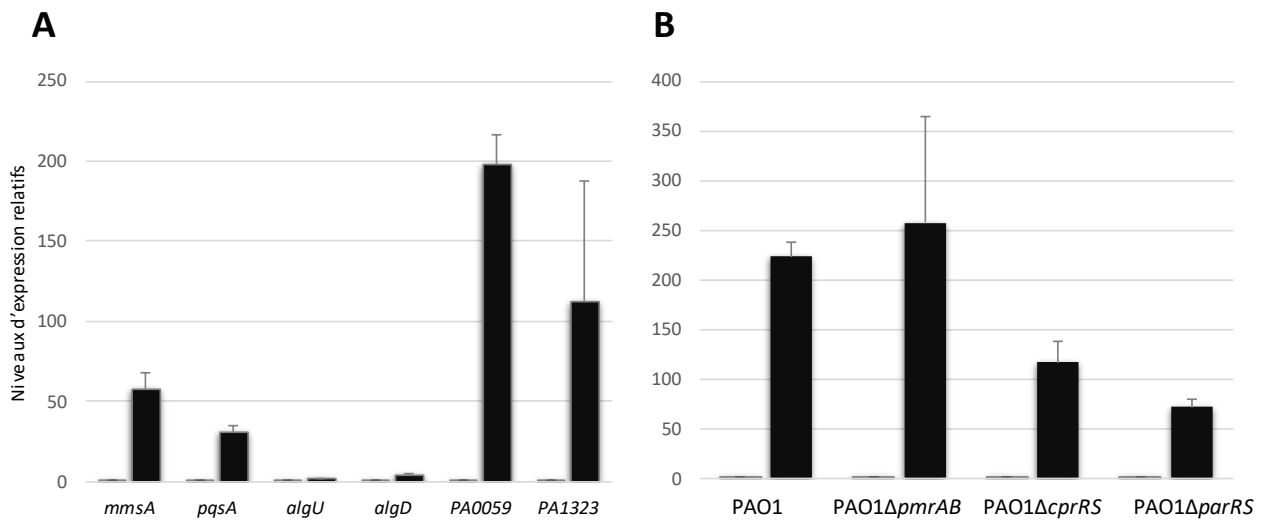


**Figure 20. Mesure de la perméabilité membranaire chez la souche PAO1 et ses mutants dérivés.** La fluorescence émise par l'assimilation du 1-N-phénylnaphtylamine a été mesurée immédiatement après l'exposition à la colistine à l'aide d'un injecteur. Les mesures ont été réalisées pendant 90 secondes toutes les 500 millisecondes. La perméabilité membranaire a été évaluée chez la souche PAO1 (trait plein, noir) et ses mutants délétés de *mexXY* (pointillés, noir), *arn* (trait plein, gris) et *parRS* (pointillés, gris).

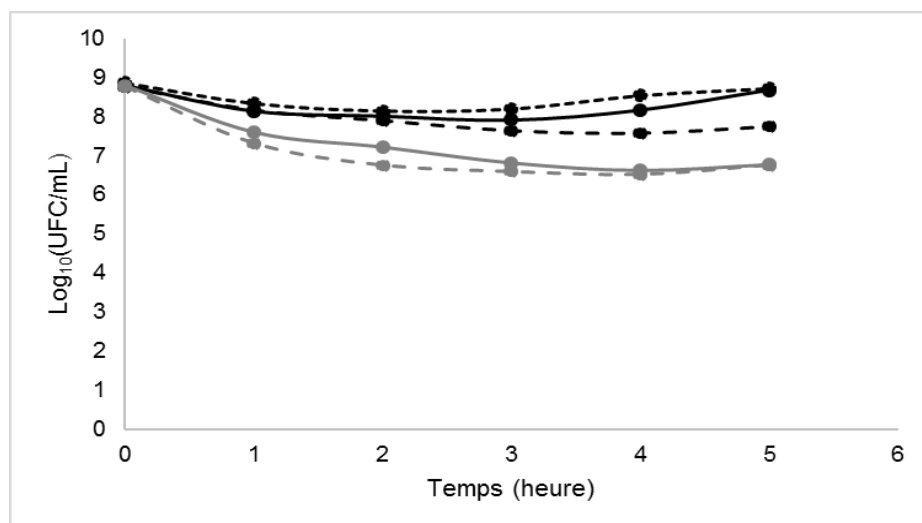
### 1.4.3 Implication d'une seconde voie de protection : la voie AlgU

Au cours de travaux effectués pendant la thèse de A. Noguès (2015), nous avons mis en évidence que le gène *algU* était surexprimé de plus de 4 fois dans le transcriptome global du mutant délété des systèmes à deux composants (ParRS, CprRS, PhoPQ et PmrAB) et de l'opéron *arn* (appelé PAO1Δ5) cultivés en présence de colistine à 8 mg/L par rapport à celui de la souche parentale PAO1. Le gène *algU* code pour un facteur sigma responsable du recrutement de l'ARN polymérase. Celui-ci est activé suite à des altérations membranaires et induit une cascade d'activation permettant de protéger la membrane (Hay et al., 2014). Il a également été constaté qu'un opéron de deux gènes *mmsAB* codant pour la méthylmalonate-semialdéhyde déshydrogénase (MmsA) et la 3-hydroxybutyrate déshydrogénase (MmsB), correspondant aux deux dernières enzymes de la voie de biosynthèse du propionyl-CoA étaient fortement induites chez le mutant PAO1Δ5. De plus, l'opéron *pqsABCDE*, codant pour la voie de biosynthèse du PQS (*Pseudomonas* quinolone signal), une molécule majeure du *quorum sensing* permettant la communication intra-espèce était également fortement induit (28 fois). Nous avons dans un premier temps étudié par RT-qPCR l'induction des gènes *mmsA*, *pqsA* et *algU* ainsi que des gènes *algD*, PA0059 et PA1323 dont l'expression est dépendante du facteur sigma AlgU chez la souche PAO1 cultivée en présence de colistine (Figure 21A).

Les données obtenues montrent que les gènes *mmsA* et *pqsA* sont surexprimés lorsque la souche PAO1 est exposée à la colistine (57,8 et 30,3 fois, respectivement). En revanche, le gène *algU* est faiblement surexprimé (2,6 fois). Toutefois, les facteurs sigma sont connus pour avoir une expression qui varie peu. En effet, les gènes dépendant de l'activité du



**Figure 21. Effet de la colistine sur les niveaux d'expression de différents gènes.** Les niveaux d'expression relatifs ont été mesurés en présence de MH (barres blanches) ou de MH + colistine à 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (barres noires). **A.** Effet de la colistine sur différents gènes chez la souche PAO1. **B.** Effet de la colistine sur les niveaux d'expression du gène PA0059 chez PAO1 et ses mutants dérivés.



**Figure 22. Effet bactéricide de la colistine sur la souche PAO1 et ses mutants dérivés.** L'effet bactéricide de 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de colistine a été mesuré sur la souche PAO1 (ronds noirs, traits pleins) ainsi que ses mutants dérivés délétés de *mmsAB* (ronds noirs, pointillés), de *pqsA* (ronds noirs, tirets), de *algW* (ronds gris, traits pleins), et de *arn* (ronds gris, tirets).

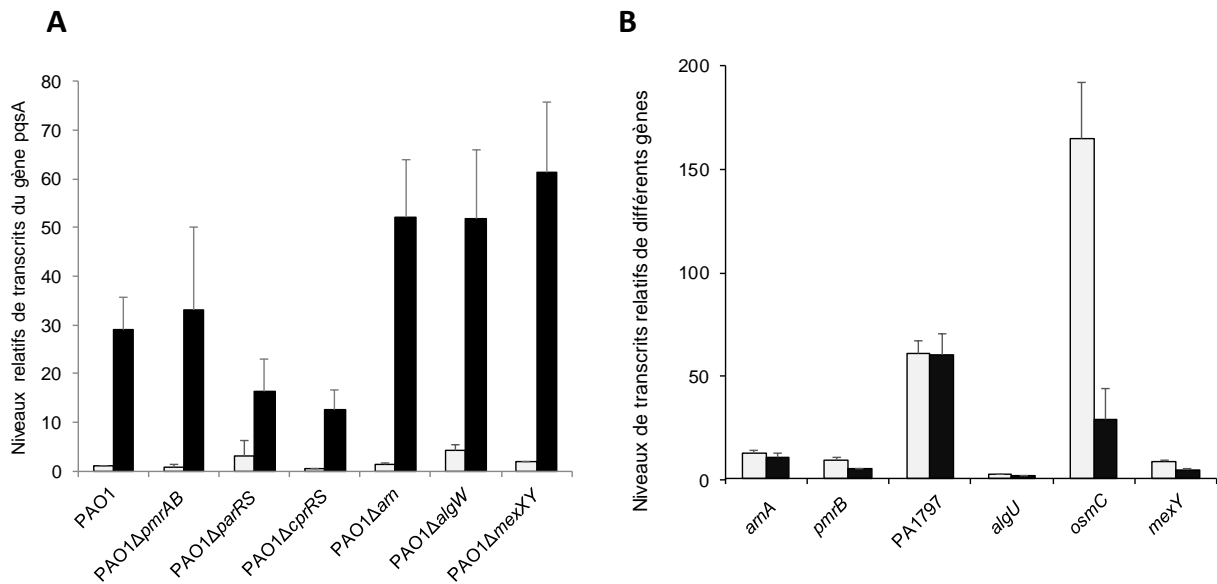
facteur AlgU, *algD*, PA0059 et PA1323 sont tous les trois surexprimés respectivement de 4,6, 198 et 111 fois. Cette surexpression était abolie chez un mutant PAO1 $\Delta$ *algW* dans lequel AlgU n'était plus fonctionnel (données non présentées). Ces données confirment l'induction de ces trois facteurs par la colistine.

Afin d'étudier un lien éventuel entre les systèmes à deux composants impliqués dans la régulation de l'opéron *arn* et l'induction de la voie AlgU, nous avons mesuré le niveau d'expression du gène PA0059 dépendant de l'activité d'AlgU chez des mutants dérivés de PAO1 délétés des opérons *pmrAB*, *cprRS* ou *parRS* exposés à la colistine (**Figure 21B**). Ainsi, la délétion de l'opéron *pmrAB* ne modifie pas l'activité de AlgU en présence de colistine, contrairement à la délétion des S2C *ParRS* et *CprRS*. Toutes ces données semblent indiquer qu'une exposition de la souche PAO1 à la colistine est capable d'activer plusieurs voies simultanément, notamment la voie de synthèse d'Ara4N via l'opéron *arn*, la voie de synthèse du PQS et la voie de réponse aux stress membranaires AlgU. Par ailleurs les voies *Arn* et AlgU semblent connectées, puisque l'activation de AlgU semble dépendante en partie des S2C *cprRS* et *parRS*. Afin d'évaluer l'impact de ces différentes voies sur la survie de la souche PAO1 en présence de colistine, nous avons délété le gène *pqsA*, l'opéron *mmsAB* et le gène *algW*, codant pour la protéine initiatrice de la cascade d'activation de la voie AlgU, et mesuré l'impact de cette délétion sur l'effet bactéricide de la colistine (**Figure 22**). Comme le montre la figure, la délétion des gènes *pqsA* et *mmsA* n'a pas d'effet significatif sur le nombre de survivants, contrairement à la délétion du gène *algW* qui résulte à une baisse significative du nombre de bactéries survivantes (-1 Log10 après 2h d'exposition), et dont l'effet est du même ordre que lors de la délétion de l'opéron *arn*.

#### 1.4.4 Rôle du PQS dans la réponse à la colistine

Comme nous l'avons mentionné, l'exposition de la souche PAO1 à la colistine induit la surexpression du gène *pqsA* (30 fois), bien que sa délétion n'ait pas d'impact sur la tolérance à la colistine chez cette souche. Afin de déterminer si l'augmentation de l'expression des gènes de biosynthèse du PQS est régulée par les systèmes impliqués dans la protection à la colistine, nous avons mesuré par RTq-PCR l'expression du gène *pqsA* dans différentes souches délétées des facteurs impliqués dans la tolérance à la colistine, c'est-à-dire l'opéron *arn*, les opérons *parRS* et *cprRS*, ainsi que le gène *algW* qui contrôle l'activation de la voie AlgU et l'opéron *mexXY* qui code pour la pompe d'efflux RND MexXY/OprM (**Figure 23A**).

Ainsi, la surexpression du gène *pqsA* suite à l'exposition de la souche PAO1 à la colistine semble réduite suite à la délétion des opérons *parRS* et *cprRS* (passant de 30 fois à 16,4 et 12,7, respectivement), suggérant que cette surexpression est partiellement due à l'activation de ces S2C. La double délétion de *parRS* et de *cprRS* n'a pas d'effet supplémentaire (données non présentées) ce qui suggère qu'un autre senseur est capable de détecter la colistine et déclenche la surexpression de l'opéron *pqsABCDE*. Au contraire, la délétion d'un système de l'une ou l'autre des voies impliquées dans la tolérance à la colistine, c'est-à-dire *algW*, *arn* ou *mexY*, conduit à une surexpression plus forte de l'opéron *pqsABCDE* (de 1,8, 1,7 et 2,1 fois plus fortes, respectivement), indiquant un possible rétro-contrôle par ces différents éléments, qui sont eux-mêmes activés par *parRS* et/ou *cprRS*.



**Figure 23. Implication du PQS dans la réponse à la colistine chez la souche PAO1.**

**A.** Mesure des niveaux d'expression du gène *pqsA* chez la souche PAO1 et ses mutants de délétion. Les niveaux de transcrits du gène *pqsA* des souches non traitées (barres blanches) ou exposées à 8 µg/mL de colistine (barres noires) ont été mesurés par RTq-PCR. **B.** Mesure des niveaux d'expression des gènes *arnA*, *pmrB*, PA1797, *algU*, *osmC* et *mexY* chez la souche PAO1 (barres blanches) ou la souche PAO1Δ*pqsA* (barres noires), toutes deux exposées à 8 mg/L de colistine.

Nous avons dans un second temps voulu déterminer si le PQS pouvait avoir un rôle régulateur sur les différents éléments impliqués dans la tolérance à la colistine. Pour cela, nous avons déterminé les niveaux d'expression de différents gènes, *arnA*, *pmrB*, PA1797, *algU*, *osmC* et *mexY*, chez la souche PAO1 ou la souche PAO1 $\Delta$ *pqsA*, toutes deux exposées à la colistine (**Figure 23B**). Il apparaît que la délétion de *pqsA* chez PAO1 réduit la surexpression de *pmrB* de l'ordre de 1,8 fois lors d'une exposition à la colistine, ce qui semble indiquer que le PQS pourrait participer, de façon directe ou indirecte, à l'activation du TCS PmrAB. De la même manière, la délétion de *pqsA* impacte la surexpression de *mexY* (il est 1,7 fois moins surexprimé chez PAO1 $\Delta$ *pqsA*), ainsi que l'activation de la voie AlgU (OsmC étant 5,4 fois moins surexprimé chez la souche PAO1 $\Delta$ *pqsA*). De façon intéressante, et bien que la délétion du gène *pqsA* n'impacte pas de façon directe la sensibilité à la colistine chez la souche PAO1, il semble être impliqué dans la régulation de différents éléments impliqués dans la tolérance à cette polymyxine et participer à leur activation. Ce travail nous a permis de mettre en évidence une voie indépendante de la voie *arn* impliquée dans la tolérance de *P. aeruginosa* à la colistine. Par ailleurs ces résultats suggèrent une relation entre les voies *arn* et AlgU qui reste à élucider.

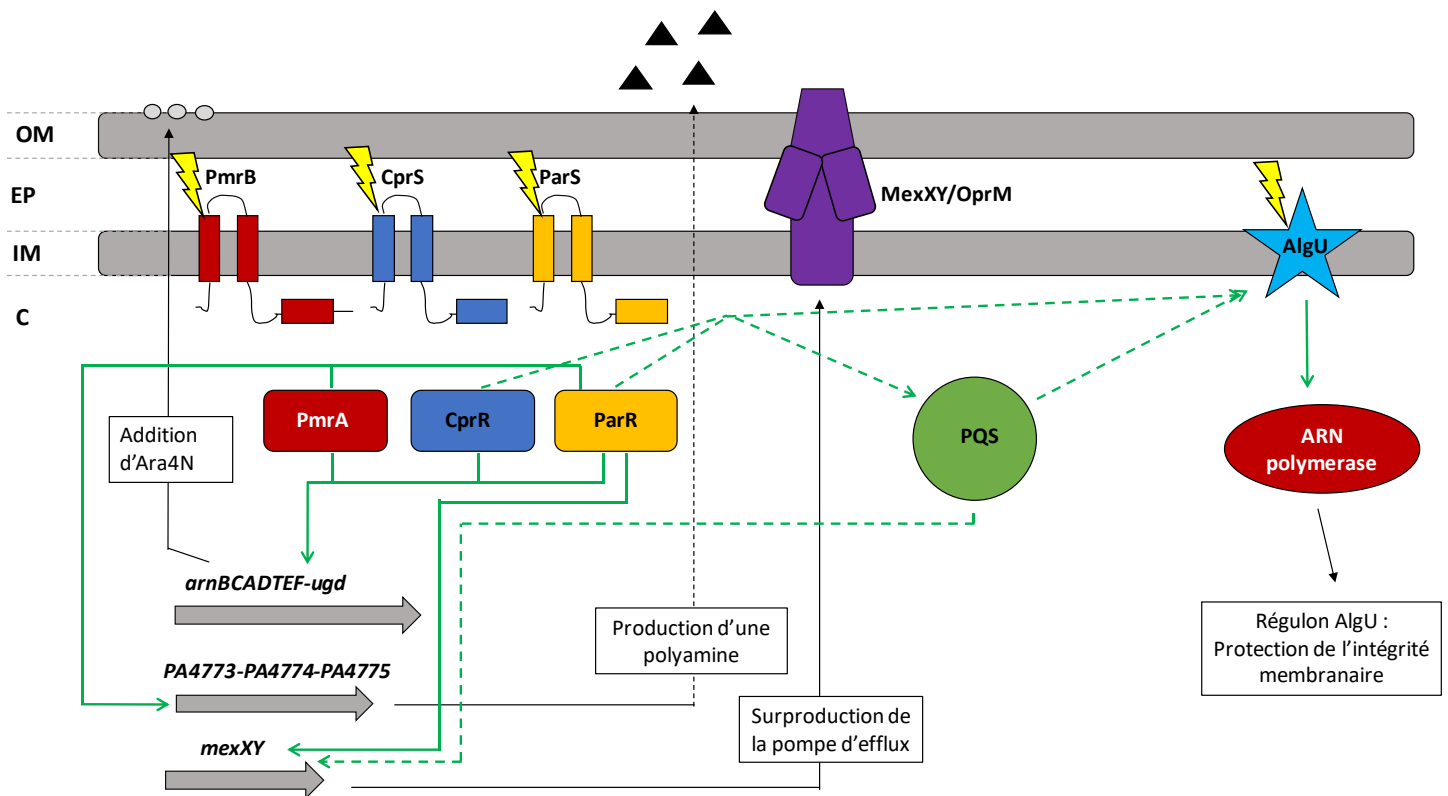
### 1.5 Conclusions

Les résultats obtenus lors de ce projet ont permis de mieux comprendre la complexité de la réponse de *P. aeruginosa* à la colistine. Ce réseau de régulation est représenté sur la **Figure 24**. Ainsi, la présence de polymyxines dans le milieu induit l'activation d'au moins trois S2C, ParRS, PmrAB et CprRS, qui sont tous les trois capables d'activer l'opéron *arnBCADTEF-ugd*. Cet opéron va permettre la production et la fixation d'Ara4N sur le lipide A et induire la



résistance aux polymyxines. En parallèle, les S2C ParRS et PmrAB seront capables d'activer un autre locus de gènes, PA4773-PA4774-PA4775, qui est impliqué dans la production de polyamines, dont la norspermidine, qui est responsable d'une baisse de la sensibilité aux aminosides. Nous avons pu démontrer que ce locus est également impliqué dans la tolérance à la colistine, ce qui suggère qu'il pourrait produire une ou plusieurs autres polyamines qui protégeraient la membrane bactérienne. Le système ParRS, lui, est également capable d'activer l'opéron *mexXY* codant la pompe d'efflux RND MexXY, qui participe à la tolérance à la colistine et à la résistance acquise. Le rôle de cette pompe dans la protection contre la colistine est encore mal compris et des travaux supplémentaires seront nécessaires pour le caractériser.

En plus de ces trois systèmes, nous avons pu mettre en évidence que la voie d'activation du facteur sigma AlgU était induite par la présence de colistine dans le milieu. Cette voie conduit à l'activation du régulon de AlgU et probablement à la protection de l'intégrité membranaire, ce qui permet de faciliter la protection contre la colistine. Nous avons pu mettre en évidence que les S2C ParRS et CprRS étaient en partie impliqués dans l'activation d'AlgU en présence de colistine. Enfin, nos travaux indiquent que l'activation de l'expression de l'opéron *pqsABCDE* chez la souche PAO1 induite par la colistine semble être partiellement dépendante des S2C ParRS et CprRS. La présence du PQS semble en partie nécessaire à l'induction de la voie AlgU par la colistine chez PAO1, ainsi qu'à l'activation de la pompe d'efflux MexXY/OprM (Figure 24).



**Figure 24. Voies impliquées dans la tolérance à la colistine chez *P. aeruginosa*.** La régulation positive d'un gène par un régulateur est représentée par une flèche verte. Les flèches en pointillés représentent une hypothèse émise compte tenu des résultats obtenus. Une flèche noire représente un lien fonctionnel entre deux éléments. Un éclair jaune représente l'induction du système par la présence de colistine dans le milieu. OM : membrane externe ; EP : espace périplasmique ; IM : membrane interne ; C : cytoplasme ; Ara4N : 4-deoxy-4-amino-arabinose ; PQS : *Pseudomonas Quinolone Signal*.

L'ensemble de ces données montre que la tolérance à la colistine est associée à un réseau complexe d'interactions impliquant la modification du lipide (voie *arn*), l'activation de la pompe d'efflux MexXY(OprM) et l'activation du régulon AlgU, permettant de renforcer la membrane bactérienne.

## **2 Caractérisation d'un nouveau système d'efflux de la famille RND impliqué dans l'efflux des aminosides chez *Pseudomonas putida***

### **2.1 Contexte**

Il existe entre 13 et 16 pompes d'efflux de la famille RND chez les souches de *P. putida*. La plupart d'entre elles sont encore non caractérisées, et celles qui ont été décrites l'ont été principalement pour leur importance dans la tolérance aux solvants organiques, notamment les BTEX (Benzène, Toluène, Ethylbenzène et Xylènes), qui sont les solvants les plus fréquemment identifiés dans des sols pollués (Ramos et al., 2015). Cependant, la description de leur implication dans l'efflux des antibiotiques s'est limitée à l'étude de la pompe TtgABC, et de sa capacité à effluer des molécules qui sont peu pertinentes en thérapeutique, comme l'ampicilline, l'acide nalidixique et le chloramphénicol (Ramos et al., 1998). L'isolement de souches de *P. putida* est plutôt rare chez les patients hospitalisés. Toutefois, il peut être responsable d'infections associées aux soins chez les patients sévèrement immunodéprimés. Depuis une dizaine d'années, le nombre de souches MDR augmente progressivement. Toutefois, le rôle des pompes d'efflux de la famille RND chez les souches MDR n'a pas été exploré.

## 2.2 Objectifs de l'étude

L'objectif de ce travail était de mieux comprendre le rôle des pompes d'efflux de la famille RND dans la résistance aux antibiotiques chez *P. putida*. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Sophie Chassagne (interne de Biologie Médicale en Master 2 recherche). Nous avons sélectionné *in vitro* à partir de la souche de référence KT2440 des mutants résistants à la ticarcilline (CMI > 250 mg/L). Deux phénotypes de résistance ont été observés chez les mutants résistants. Le premier était associé à la surproduction du système TtgABC suite à une altération du régulateur transcriptionnel TtgR. Il conduisait à une augmentation de la résistance aux  $\beta$ -lactamines et aux fluoroquinolones. Le second associait une augmentation de la résistance aux  $\beta$ -lactamines et aux fluoroquinolones ainsi qu'aux aminosides. Grâce à des expériences de RT-qPCR et de délétions de gènes, nous avons montré que ce phénotype MDR était associé à la surproduction du système TtgABC et également d'un nouveau système d'efflux actif appelé ParXY. L'analyse de la région génomique en amont de l'opéron *parXY* a révélé un système à deux composants, le gène PP\_3453 codant le senseur et le gène PP\_3454 codant le régulateur de réponse, transcrits dans le sens opposé à l'opéron d'efflux. Nous avons mis en évidence par des expériences de RTq-PCR et par la délétion des deux gènes codant le S2C que ce système était responsable de la co-régulation d'au moins trois pompes d'efflux, dont les deux pompes TtgABC et ParXY. Le séquençage du génome complet du mutant et sa comparaison avec celui de la souche de référence KT2440 a permis de mettre en évidence que le gène *sucD* codant pour la sous-unité  $\alpha$  de la succinyl-CoA synthétase du cycle de Krebs était inactivé chez ce mutant. Nous avons cloné la mutation dans un contexte sauvage et cette mutation a rétabli le phénotype de multi-résistance, démontrant qu'elle était à l'origine de l'activation constitutive du S2C.

L'objectif de ce travail était de mieux comprendre l'implication des pompes d'efflux RND dans la multi-résistance aux antibiotiques chez *P. putida*.

## **2.3 Résultats publiés**

### **2.3.1 Article soumis**

Hélène Puja, Gwendoline Comment, Sophie Chassagne, Patrick Plésiat, Katy Jeannot.

« Coordinate overexpression of two RND efflux systems, ParXY and TtgABC, is responsible for multidrug resistance in *Pseudomonas putida* »

Soumis à Environmental Microbiology et Environmental Microbiology Reports le 18 juin 2020.

1 **A two-component regulatory system connects two RND efflux pumps**

2 **ParXY/TtgC and TtgABC in *Pseudomonas putida***

3  
4 Hélène Puja<sup>a</sup>, Gwendoline Comment<sup>a</sup>, Sophie Chassagne<sup>a</sup>, Patrick Plésiat<sup>a,b</sup>, Katy Jeannot<sup>a,b</sup> #

5  
6 <sup>a</sup>UMR 6249 Chrono-environnement, UFR Santé, Université de Bourgogne-Franche Comté, Besançon,  
7 France

8 <sup>b</sup>Centre National de Référence de la résistance aux antibiotiques, Centre Hospitalier Universitaire de  
9 Besançon, France

10  
11  
12  
13  
14 **Running Title:** A novel RND pump in *Pseudomonas putida*

15 # Address correspondence to Katy Jeannot, [katy.jeannot@univ-fcomte.fr](mailto:katy.jeannot@univ-fcomte.fr)

16 **Present address :** Centre National de Référence de la résistance aux antibiotiques, laboratoire de  
17 bact  riologie, CHU Jean Minjoz, 3 boulevard Fleming, 25030 Besançon, France

18 Phone number : +33 3 70 63 21 69

19 Fax number: +33 3 70 63 21

20  
21 **Keywords:** *Pseudomonas putida*, antibiotic resistance, efflux pump, succinyl-CoA synthetase

22

23 **Originality-Significance Statement.**

24 In this study, we identified and characterized a new RND efflux pump (ParXY/TtgC) involved in  
25 intrinsic and acquired resistance to therapeutically significant antibiotics in *P. putida*. We provide  
26 evidence for the existence of a co-regulation of three RND efflux pumps (TtgABC, ParXY/TtgC, and  
27 PP2817/18) by a two-component system (ParRS). We also increase our knowledge on the metabolic  
28 disorders activating RND efflux pumps. Finally, we showed that multidrug resistance phenotype in  
29 *P. putida* clinical isolates may be associated to an upregulation of RND efflux pumps subsequent to an  
30 alteration of the succinyl-CoA synthetase.

31

32 **Summary (200 words max)**

33 RND efflux pumps are well-known for their contribution to aromatic hydrocarbons tolerance  
34 in *Pseudomonas putida*. However, their impact on antimicrobial resistance were frequently  
35 unexplored. Here, we evaluated the role of RND efflux pumps in antibiotic resistance of several  
36 one-step mutants selected on ticarcillin (250  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) from the reference strain KT2440. We  
37 identified a new type of mutants exhibiting increased resistance to  $\beta$ -lactams, fluoroquinolones,  
38 and aminoglycosides. This Multidrug resistance (MDR) phenotype was associated with the  
39 upregulation of the RND TtgABC pump and a novel RND pump (named ParXY) independently  
40 of *ttgR* mutation. The characterization of this latter extruding aminoglycosides,  
41 fluoroquinolones and cefepim, led us to the identification of a two-component system (called  
42 ParRS) involved in the dysregulation of at least three RND pumps, including TtgABC and  
43 ParXY/TtgC participating in antibiotic resistance. Whole-genome sequencing of a selected  
44 mutant revealed the occurrence of a premature stop codon in the SucD protein, the succinyl-  
45 CoA synthetase, which catalyzes the formation of succinate from succinyl-CoA in the  
46 tricarboxylic cycle (TCA). Finally, our data indicate that alteration of the TCA cycle may  
47 promote MDR phenotype through the activation of two RND efflux pumps in *in vitro* mutants  
48 and in clinical strains.

49

50



## 51 **Introduction**

52 *Pseudomonas putida* is an opportunistic pathogen uncommon in clinical infections. It is more  
53 frequently identified in rhizosphere and freshwater than in hospital {Roca, 2013 #2566;  
54 Raphael, 2017 #2567}. However, its capacity to colonize abiotic surface and to metabolize a  
55 wide range of compounds enables this pathogen to colonize patients {Wu, 2011 #2132;  
56 Udaondo, 2013 #2553}. *P. putida* is mainly responsible for healthcare-related infections in  
57 severe immunocompromised patients {Lombardi, 2002 #2550; Kim, 2012 #2551}. This last  
58 decade, several studies have reported MultiDrug Resistant (MDR) *P. putida* strains producing  
59 a diversity of  $\beta$ -lactamases including carbapenemases (VIM-, IMP-) in colonized- or infected-  
60 patients {Liapis, 2019 #2557; Hong, 2018 #2562; Gilarranz, 2013 #2563}. However, few works  
61 have investigated the role of active efflux pumps in acquired resistance to antibiotics in  
62 *P. putida* {Ramos, 1998 #2153; Duque, 2001 #2163; Teran, 2003 #459}. The core *P. putida*  
63 genome encodes more than 20 Resistance Nodulation cell Division (RND) efflux pumps  
64 {Winsor, 2016 #1939; Udaondo, 2013 #2553}. Some of these RND pumps have been predicted  
65 to be involved in antimicrobial resistance {Godoy, 2010 #2460}. However, only one  
66 chromosomal RND efflux pump TtgABC, which is highly similar to ArpABC identified in  
67 *P. putida* S12, has been reported to be involved in antibiotic resistance {Ramos, 1998 #2153;  
68 Kieboom, 2001 #2570}. The RND transporter TtgB interacts with the outer membrane channel  
69 TtgC, and the periplasmic adaptator TtgA to actively export carbenicillin, chloramphenicol,  
70 tetracycline, erythromycin, and nalidixic acid from the periplasmic space to the extracellular  
71 environment {Ramos, 1998 #2153; Duque, 2001 #2163; Molina-Santiago, 2014 #2564; Yao,  
72 2017 #2568}. Additionally, TtgABC is well-known for its contribution to tolerance to  
73 aromatic hydrocarbons such as trichlorobenzene, toluene, isopropylbenzene, p-xylenes, and  
74 flavonoids {Ramos, 2015 #2549}. The pump TtgABC is coded by an operon of three genes  
75 *ttgABC* expressed at a high basal level from a single promoter {Duque, 2001 #2163}. Its

76 expression is under the negative control of divergently transcribed gene *ttgR*, which regulates  
77 as well as its own expression {Duque, 2001 #2163}. This local regulator, TtgR, belongs to the  
78 TetR family, as several transcriptional repressors such as MexZ regulator from *P. aeruginosa*,  
79 or AmrR from *Burkholderia pseudomallei*, which control the efflux pumps MexXY/OprM and  
80 AmrAB/OprA respectively {Matsuo, 2004 #450; Moore, 1999 #2572}. Expression of the  
81 *ttgABC* operon and gene *ttgR* has been found to be induced by antibiotics (chloramphenicol,  
82 and tetracycline), organic solvents (styrene, 1-naphthol, and butanol), and flavonoids  
83 (phloretin, quercetin and naringenin) possessing various structures {Teran, 2003 #459; Teran,  
84 2006 #2642}, which directly interact with TtgR {Alguel, 2007 #2164}.

85 To our knowledge, TtgABC-overproducing clinical mutants have never been reported in  
86 clinical *P. putida* strains. Only one study suggested a role of TtgABC efflux pump in resistance  
87 to tetracycline and chloramphenicol in MDR clinical strain {Molina, 2014 #2512}. But the  
88 impact of efflux pump in antimicrobial resistance have not been explored. The goal of this study  
89 was to evaluate the role of RND efflux pumps in antibiotic resistance, through genetic  
90 experiments and whole-genome sequencing strategy applied to several one-step mutants  
91 selected on ticarcillin.

92  
93  
94

## 95 **Results and Discussion**

### 96 **Selection of MDR efflux pump mutants**

97 From the reference strain KT2440, we selected *in vitro* two types of spontaneous resistant  
98 mutants to ticarcillin (250 µg mL<sup>-1</sup>). First one (HPG-1, and HPG-4 mutants), obtained at a  
99 frequency rate of 3.36 x 10<sup>-8</sup>, were 4-fold less susceptible to all β-lactams (ticarcillin,  
100 piperacillin, aztreonam, ceftazidime, cefepime, and meropenem) except imipenem, and 2-fold  
101 to fluoroquinolones (ciprofloxacin, and levofloxacin) in comparison with the parental strain  
102 (Table 1). Because the antibiotic resistance profile of these mutants was similar to those of  
103 overproducing MexAB-OprM mutants previously described in *P. aeruginosa* {Masuda, 2000  
104 #24}, and that the closely aminoacid sequence identity (66.8 to 78.4%) of MexAB-OprM in  
105 *P. putida* was TtgABC system (Table S1), we measured by RT-qPCR the levels of transcript of  
106 gene *ttgA* in two mutants HPG-1 and HPG-4, and sequenced the gene *ttgR*, coding for the local  
107 transcriptional repressor (TetR family) of operon *ttgABC* {Teran, 2003 #459}. Both mutants  
108 overexpressed the gene *ttgA* (from 3.8 to 5.4), and possessed a nucleotide substitution in gene  
109 *ttgR* resulting in aminoacid substitution A19V in the mutant HPG-1, and the formation of a  
110 premature stop codon (E153\*) in the mutant HPG-4. Allelic replacement of wild type gene *ttgR*  
111 in the strain KT2440 by the mutated gene *ttgR* (C56T) from the mutant HPG-1 confirmed that  
112 the mutation A19V was responsible for the β-lactams and ciprofloxacin resistance phenotype  
113 observed in the mutant HPG-1 (Table 1). According to the crystal structure of the TtgR  
114 regulator, the mutation (A19V) was located into the helix-α1 (residues 12 to 28) of the DNA  
115 binding domain (helix-α1 to -α3) {Alguel, 2007 #2164}. Although this mutation was not  
116 reported in the TtgR structure studies {Krell, 2007 #2467; Teran, 2003 #459} or in its  
117 homologous protein MexZ in *P. aeruginosa* {Alguel, 2010 #2537}, it seems that it  
118 compromises the binding of TtgR on its operator site (18 bp) leading to the transcription of  
119 *ttgABC* and *ttgR*.

120 Second type of mutants (mutant HPG-5) (mutation rate  $1 \times 10^{-9}$ ) was more surprising since  
121 additionnally to be 4- to 8-fold less susceptible to all  $\beta$ -lactams (except imipenem) and 8-fold  
122 to fluoroquinolones (ciprofloxacin, and levofloxacin), these mutants were 8-fold less  
123 susceptible to all aminoglycosides tested (amikacin, gentamicin, and tobramycin) (Table 1).

124

### 125 **A novel RND efflux pump, ParXY participates in multidrug resistance**

126 To evaluate the role of RND efflux pumps in this multidrug resistance phenotype, we measured  
127 the transcript levels of four genes encoding the first gene of RND operons previously known  
128 (*ttgA*) or predicted (PP\_2817, PP\_3425 and PP\_3455) to be involved in antibiotic export in one  
129 of these mutants named HPG-5 {Ramos, 1998 #2153; Godoy, 2010 #2460}. Whereas the genes  
130 *ttgA* ( $3.2 \pm 0.5$ -fold) and PP\_3455 ( $11.8 \pm 1.2$ -fold) were significantly upregulated, the genes  
131 PP\_2817 ( $-5.4 \pm 1.7$ -fold) and PP\_3425 ( $-4.9 \pm 0.9$ -fold) were downregulated (Fig. 1),  
132 suggesting a potential role of these RND pumps in antibiotic resistance phenotype of mutant  
133 HPG-5. The deletion in frame of genes *ttgAB* in the mutant HPG-5 led to a decrease of 2- to 4-  
134 fold resistance to  $\beta$ -lactams and fluoroquinolones except for cefepim, but did not modify the  
135 aminoglycoside susceptibility (Table 1), indicating that the efflux system TtgABC contributes  
136 partially to this MDR phenotype of mutant HPG-5. According to bioinformatic data the genes  
137 PP\_3455 and PP\_3456 are cotranscribed and encode a putative periplasmic adaptor protein and  
138 a RND efflux pump, respectively. At protein level, PP\_3455 and PP\_3456 showed the highest  
139 percentage of identity with the proteins MexC (50.6%) and MexD (60.9%) from MexCD-OprJ  
140 efflux pump identified in *P. aeruginosa* (Table S1). This well-known system MexCD-OprJ  
141 extrudes antibiotics (zwitterionic cephalosporins, fluoroquinolones, tetracyclines and  
142 macolides) as well as biocides (triclosan, chlorhexidine) {Li, 2015 #2000}. However, the  
143 inactivation of both genes (PP\_3455 and PP\_3456) in the mutant HPG-5 completely restored  
144 the susceptibility to aminoglycosides (8- to 16- fold) (HPG-5 $\Delta$ PP\_3455/56) and partially to

145 fluoroquinolones (2- to 4-fold), but did not change the resistance levels to  $\beta$ -lactams except  
146 cefepim, suggesting its contribution to acquired resistance to aminoglycosides, ciprofloxacin  
147 and cefepime (Table 1), like the MexXY/OprM efflux pump identified in its phylogenetic close  
148 neighbor *P. aeruginosa* {Li, 2015 #2000}. Although the protein MexY share only 55.4% of  
149 identity with PP\_3456 (Table S1), the substrates recognized by PP\_3456 seems to be similar.  
150 Among all the aminoglycoside extruding RND proteins, SmeZ (60.7%) from  
151 *Stenotrophomonas maltophilia* exhibited the highest degree of homology to PP\_3456. In contrast  
152 with the specificity of this pump to accommodate aminoglycosides, AmrB in *Burkholderia*  
153 *pseudomallei*, Axy in *Achromobacter xylosoxidans* and MexY in *P. aeruginosa*, amino-acid  
154 sequence of PP\_3456 does not contain the residues D133, and Y613 (Fig. S1) {Lau, 2014  
155 #2469}. These residues were supposed by Lau and its collaborators to be involved in  
156 aminoglycosides capture in the proximal binding pocket located in the inner membrane  
157 proximal porter domain of the periplasmic region of RND monomer {Lau, 2014 #2469;  
158 Murakami, 2002 #2470}. The identification of a novel RND efflux pump highlights other  
159 residues, such as E311 and E592 which are highly conserved in efflux pump extruding  
160 aminoglycosides (Fig. S1). According to the AcrB protein structure, these residues were located  
161 in the PN2 and PC2 sub-domains respectively of pore domain involved in drug capture and  
162 extrusion {Murakami, 2002 #377}. But, only a site-directed mutagenesis of these predicted  
163 substrate binding pocket in PP\_3454 could elucidate in detail the aminoglycoside recognition  
164 sites by PP\_3454.

165 To further the characterization of this new RND pump involved in antibiotic resistance, we  
166 determined its contribution in intrinsic and acquired resistance to several drugs in comparison  
167 with the TtgABC system. In addition to aminoglycosides, fluoroquinolones, and cefepim, this  
168 pump was able to export erythromycin, and tetracycline (Table 2). But, its contribution to  
169 intrinsic resistance was limited to aminoglycosides (4-fold), and erythromycin (4-fold) as

170 indicated in **Tables 1 and 2** (compare the strain KT2440 with the mutant KT2440 $\Delta$ PP\_3455/56).  
171 In contract, the pump TtgABC contributed dramatically (2- to 64-fold) to intrinsic resistance to  
172 all  $\beta$ -lactams (except for imipenem), and moderately (2-fold) to fluoroquinolones,  
173 chloramphenicol, tetracycline, novobiocin, rhodamin-6-G, methyl viologen, and acriflavin  
174 (**Tables 1 and 2**). These results highlight a major role of two RND efflux pumps TtgABC and  
175 PP\_3455-56 in intrinsic and acquired resistance to antibiotics and dyes in *P. putida*. Since the  
176 latter RND efflux system participates in intrinsic and acquired resistance to aminoglycosides in  
177 *P. putida* we proposed to call it ParXY for *Putida* *a*minoglycoside *r*esistance and ParX  
178 (PP\_3455), ParY (PP\_3456) by homology with the substrates exported by the MexXY/OprM  
179 efflux pump in *P. aeruginosa* {Li, 2015 #2000}. Interestingly, only the double deletion of  
180 operons *ttgAB* and ParXY in the mutant HPG-5 completely restored the wild type antibiotic  
181 phenotype of strain KT2440, indicating that both pumps participate in MDR phenotype of  
182 HPG-5 mutant (**Table 1**). Moreover, a synergistic effect of the deletion of both pumps was  
183 observed on the susceptibility to  $\beta$ -lactams notably ticarcillin (from 1024 to 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) and  
184 aztreonam (from 64 to 0.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), to fluoroquinolones, and to aminoglycosides suggesting  
185 that there is a relationship between the systems TtgABC, and ParXY. It is probable that the  
186 deletion of one is counterbalanced by the activity of second. This was confirmed in the strain  
187 KT2440 deleted of operon *parXY*, where the MICs of TtgABC substrates like piperacillin,  
188 aztreonam, ceftazidime and particularly meropenem (from 0.25 to 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) were increased in  
189 comparison with the strain KT2440 (**Table 1**). As the operon *parXY* does not contain gene  
190 coding for an outer membrane protein {Li, 2015 #2000}, and that previous studies reported that  
191 the inactivation of *ttgABC* operon led to a decrease of gentamicin and erythromycin MICs  
192 {Duque, 2001 #2163; Yao, 2017 #2568}, we supposed that the protein TtgC, coding by the *ttgC*  
193 gene belonging to the *ttgABC* operon, could form a functional RND efflux pump with the  
194 proteins ParXY. The deletion in frame of gene *ttgC* in strain KT2440, and in the mutant HPG-

195 5 resulted in similar levels of susceptibility to antibiotics to those obtained in the double mutants  
196 KT2440 $\Delta$ *ttgAB* $\Delta$ PP\_3455/56, and HPG-5 $\Delta$ *ttgAB* $\Delta$ PP\_3455/56 (Table 1). Thereby, the proteins  
197 TtgAB and ParXY shares the same outer membrane protein TtgC to form a functional RND  
198 pump in this condition of growth. As it was reported with several efflux pumps in other bacteria,  
199 ParXY could be functional with additional outer membrane proteins according to  
200 environmental conditions {Jo, 2003 #304; Gotoh, 1998 #103}.

201

### 202 **Involvement of a two-component system in control of RND pumps**

203 Regulators of drug efflux pumps in bacteria are frequently adjacent to genes coding the efflux  
204 pumps {Li, 2015 #2000}. We therefore measured the expression levels by RT-qPCR and  
205 deleted in frame the adjacent genes of the operon *parXY*, PP\_3453 and PP\_3454, which are  
206 predicted to code for a histidine kinase sensor (HK) and a response regulator (RR) respectively  
207 of a classic two-component system (TCS) in the mutant HPG-5 (Fig 2A). As indicated in the  
208 Figure 2B, genes PP\_3453 and PP\_3454 were significantly overexpressed (8.6- and 8.7-fold  
209 respectively) in the mutant HPG-5 in comparison with the strain KT2440. Moreover,  
210 suppression of the HK protein (PP\_3453) or the RR (PP\_3454) resulted dramatically in  
211 decreased (from 8 to 512-fold) of antibiotic resistance at least three classes of antibiotics ( $\beta$ -  
212 lactams, fluoroquinolones, and aminoglycosides) in the mutant HPG-5 (Table 1). Since the  
213 deletion of components of TCS (PP\_3453/54) has similar effect to those of inactivation of gene  
214 *ttgC* or operons *parXY* coupled to *ttgAB* on antibiotic susceptibility, we consider that this TCS  
215 could positively regulate the RND efflux operons *ttgABC* and *parXY*. According to this, the  
216 overexpression of genes *ttgA* and *ParX* in the mutant HPG-5 was abolished in the mutant HPG-  
217 5 $\Delta$ PP\_3453 and HPG-5 $\Delta$ PP\_3454 (Fig 2C). Interestingly, expression of gene PP\_2817  
218 encoding the adaptor protein of unknown RND efflux pumps which was strongly repressed (-  
219 5.4 $\pm$  1.7-fold) in the mutant HPG-5, returned to its basal level in the mutants HPG-5 $\Delta$ PP\_3453

220 and HPG-5ΔPP\_3454 (Fig 2C). Whereas the expression of gene PP\_3455 remained unchanged  
221 in both mutants. All these results indicated that this novel TCS PP\_3453/PP\_3454 is able to  
222 control the expression at least three RND efflux systems (TtgABC, ParXY/TtgC, and  
223 PP\_2817/18) including two pumps involved in antibiotic resistance. The closest homologous  
224 of PP\_3453 and PP\_3454 found in *E. coli* genome correspond to proteins RstB (29%) and RstA  
225 (43%). This TCS RstAB in *E. coli* is under the control of the PhoPQ TCS, which monitors  
226 extracellular Mg<sup>2+</sup> levels. Two genes PP\_1186 and PP\_1187 are annotated PhoP and PhoQ in  
227 the genome of the strain KT2440 {Winsor, 2016 #1939}. Nevertheless, their expression levels  
228 were unmodified in HPG-5 mutant in comparison with the strain KT2440, indicating that  
229 PP\_3453/54 is not under the control of PhoPQ in *P. putida*. In *K. pneumoniae* the homologous  
230 *KpRstA* binds to the consensus sequence TACATNTNGTTACA with tandem TACA  
231 recognition sites {Ogasawara, 2007 #2540}. But, bioinformatic analysis of the promoting  
232 regions of the efflux pumps operons *ttgABC*, *parXY* and PP\_2817 did not reveal this motif or  
233 any others.

234 Interestingly, several RND efflux pumps able to extrude aminoglycosides are under the positive  
235 control of classical TCS. The genes encoding these global regulators were adjacent to efflux  
236 operons as AdeRS regulating AdeABC in *Acinetobacter baumannii* {Marchand, 2004 #2472},  
237 or located in other chromosomal regions such as ParRS and BaerRS controlling the efflux  
238 systems MexXY/OprM in *P. aeruginosa*, AcrD in *E. coli*, and AdeABC in *A.*  
239 *baumannii* respectively {Muller, 2011 #748; Raffa, 2002 #2538; Lin, 2014 #2539}. However,  
240 the periplasmic domain of the histidine kinase PP\_3453 shares any similarity with those of  
241 AdeS, and ParS. This highlights that similar efflux pumps may detect and reponse to different  
242 signals depending on species. According to its role in antibiotic resistance, and by homology of  
243 function with ParRS identified in *P. aeruginosa*, we propose to called this new TCS, ParRS for  
244 *putida* antimicrobial resistance, ParR (PP\_3454), ParS (PP\_3453).



245 **Inactivation of the succinyl-CoA synthetase leads to the overproduction of TtgABC and**  
246 **ParXY/TtgC**

247 To identify the genetic event responsible for this MDR phenotype in the mutant HPG-5, whole  
248 genome sequencing of the strain KT2440 and its mutant HPG-5 were performed. Comparison  
249 of genomes revealed the insertion of an alanine in position 278 of gene *sucD*, resulting in the  
250 formation of a premature stop codon in position 123 (Fig 3A). The *sucD* gene belongs to an  
251 operon of two genes, *sucC*, and *sucD* encoding the sub-units  $\beta$  and  $\alpha$  of the succinyl-CoA  
252 synthetase respectively, an enzyme involved in the tricarboxylic acid (TCA) cycle, which  
253 catalyzes the formation of succinate from succinyl-CoA. To confirm the impact of the mutation  
254 (InsA278) on MDR phenotype, this one was inserted in the strain KT2440  
255 (KT2440::*sucD*<sub>InsA278</sub>). As expected, the HPG-5 phenotype was completely restored in the  
256 mutant KT2440::*sucD*<sub>InsA278</sub> (Table 1). Because we showed that the HPG-5 phenotype was due  
257 to the overproduction of TtgABC and ParXY systems under the positive control of the TCS  
258 ParRS, the expression levels of genes *ttgA*, and *parX* were measured in the mutant  
259 KT2440::*sucD*<sub>InsA278</sub>. All were significantly overexpressed (from 3.4- to 11.7-fold) in the  
260 mutant KT2440::*sucD*<sub>InsA278</sub> in comparison with the strain KT2440 (Fig 3B). All these results  
261 indicated that the inactivation of the succinyl-CoA synthetase is responsible for the MDR  
262 phenotype through the activation of the TCS ParRS, which in turn upregulated the operons  
263 *ttgABC* and *parXY*. Interestingly, from a transposon library of *P. aeruginosa* PA14, screened  
264 for twofold increase in tobramycin resistance, Schurek *et al.* have identified *sucC* and *sucD*  
265 mutants {Schurek, 2008 #2083}. However, the mechanism associated with resistance to  
266 tobramycin was not explored. Because the genes *sucC* and *sucD* are highly conserved (87.2%  
267 and 91.4% similarity respectively) between the species *P. putida* and *P. aeruginosa*, we deleted  
268 the gene *sucD* in both genetic backgrounds of *P. aeruginosa* strains PA14 and PAO1.  
269 Inactivation of *sucD* in both *P. aeruginosa* strains resulted in slight but reproducible decrease

270 from two-fold of the susceptibility to tobramycin (from 0.25 to 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), without  
271 modification of MICs of gentamicin and amikacin. In contrast to the *P. putida* KT2440 strain,  
272 the aminoglycoside efflux pump MexXY(OprM) was not upregulated in *P. aeruginosa* strains,  
273 indicating that the adaptation of *P. putida* subsequent to the absence of the succinyl-CoA  
274 synthetase differs between these species. According to the lack of synthesis of succinate by the  
275 TCA cycle, the glyoxylate pathway was strongly activated in the mutant HPG-5 {Dolan, 2018  
276 #2541}. The genes encoding the isocitrate lyase (*aceA*,  $9.6 \pm 1.38$ -fold) and the malate synthase  
277 (*glcB*,  $6.1 \pm 1.2$ -fold) were overexpressed to generate succinate and malate, which are  
278 subsequently oxidized to yield fumarate and oxaloacetate respectively. Metabolite profiling on  
279 glyoxylate treated cells using liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS) indicated a  
280 significant increase of malate, fumarate, citrate and,  $\alpha$ -ketoglutarate {Meylan, 2017 #2543}.  
281 The accumulation of  $\alpha$ -ketoglutarate results in the inhibition of  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase.  
282 Similarly, to *P. aeruginosa* cells treated by glyoxylate, the isocitrate dehydrogenase gene (*icd*)  
283 was strongly overexpressed ( $46.3 \pm 14.1$ -fold) in the mutant HPG-5, indicating a probable  
284 accumulation of  $\alpha$ -ketoglutarate {Meylan, 2017 #2543}. Additionally, to its well-known role  
285 in carbon and nitrogen metabolisms,  $\alpha$ -ketoglutarate is an important signal molecule through  
286 activation of  $\alpha$ -ketoglutarate-sensing regulatory proteins and by modulating the cyclic AMP in  
287 *Escherichia coli* {Huergo, 2015 #2544}. A variety of proteins are able to sense  $\alpha$ -ketoglutarate,  
288 as PII protein family, transcriptional regulator, and a two-component system {Huergo, 2015  
289 #2544}. The histidine kinase protein KguS belonging to the two-component system  
290 KguS/KguR was identified in uropathogenic *E. coli* (UPEC) strains responsive to  $\alpha$ -  
291 ketoglutarate, a five-carbon dicarboxylate {Cai, 2013 #2545}. KguS/KguR is involved in  
292 utilization of  $\alpha$ -ketoglutarate, which regulates target genes encoding  $\alpha$ -ketoglutarate  
293 dehydrogenase and a succinyl CoA synthetase, as well as the expression of type 1 fimbriae  
294 {Cai, 2013 #2545; Bessaiah, 2019 #2547}. However, the identity of sequence of the

295 periplasmic domains of ParS and KguS was less than 10%. The signal of ParS remains to be  
296 elucidated. As several proteins are able to respond to  $\alpha$ -ketoglutarate and lead to a global  
297 response through the activation of RpoN and RpoS regulon by a phosphorylation cascade in *E*  
298 *coli*, it is probable that accumulation of  $\alpha$ -ketoglutarate in *P. putida* induces a global response  
299 including the activation of RND efflux pumps {Huergo, 2015 #2544}. Further investigations  
300 will be necessary to connect the activation of ParRS with the accumulation of  $\alpha$ -ketoglutarate.  
301 To evaluate the clinical relevance of *sucD* mutant in *P. putida* clinical strains, we selected from  
302 the NRC collection of *P. putida* strains isolated from different healthcare facilities, the strains  
303 highly resistant to ticarcillin (MIC  $\geq 256 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Two of 66 strains resistant to ticarcillin  
304 overexpressed the genes *ttgA* (3.2, and 5.2-fold) and *parX* (12.3, and 8.6-fold) (Fig 3B) in  
305 comparison with the strain KT2440. Isolated from urine and a rectal swab, these strains were  
306 highly resistant to all antibiotics except colistin due to the production of metallo- $\beta$ -lactamases  
307 VIM-2 and a narrow spectrum oxacillinase OXA-17 in the strain 16.3979, and a VIM-4, an  
308 narrow oxacillinase OXA-2 and a penicillinase PSE-1 in the strain 17.4591. Amplification and  
309 sequencing of gene *sucD* revealed a deletion of 14 nucleotides leading to a truncated protein  
310 (premature stop codon in position 176) in the strain 16.3979 (Fig 3A). Like the mutant HPG-5  
311 and the *sucD* mutated strain KT2440, both clinical strains overexpressed the histidine kinase  
312 (PP3453, 10.5- and 6.2-fold) and the response regulator (PP3454, 6.6-, and 17.6-fold) genes  
313 (Fig 2B). The nucleotide sequence of genes *sucC*, *parS*, and *parR* was intact in the clinical  
314 strain 17.4591 suggesting that alteration of other genetic determinants may be involved in this  
315 MDR phenotype. These data highlight that *sucD* mutations participate in antibiotic resistance  
316 in *P. putida* clinical strains.

317

## 318 **Conclusion**

319 In contrast to *P. aeruginosa*, the RND efflux pumps in *P. putida* have been mainly studied for  
320 their tolerance to toxic solvents (aromatic hydrocarbons, short-chain alcohols) particularly to  
321 toluene {Ramos, 2015 #2549}. To our knowledge, this study is the first showing the role  
322 played by a two component system (ParRS) in bacterial resistance to not less than three different  
323 classes of antibiotics (aminoglycosides, fluoroquinolones, and  $\beta$ -lactams) though the activation  
324 of two-RND efflux pumps TtgABC and ParXY/TtgC in *P. putida*. This new phenotype may be  
325 induced by mutations affecting the succinyl-CoA synthase or other genetic determinants  
326 inducing the expression of the histidine kinase (ParS). Some data strongly suggest that these  
327 determinants are involved in  $\alpha$ -ketoglutarate response. Indeed, the HPG-5 mutant had a similar  
328 response to those of a strain grown in presence of glyoxylate {Meylan, 2017 #2543}. The nature  
329 of the signal sensed by the histidine kinase remained to be identified.

330 In the absence of other known resistance mechanisms, overproduction of RND efflux  
331 pumps in clinical isolates is usually associated with a low level of resistance to substrate  
332 antibiotics (from two to eight-fold increase of MICs) {Li, 2015 #2000}. But the dysregulation  
333 of TtgABC and ParXY/TtgC in the mutant HPG-5 subsequent to the inactivation of the  
334 succinyl-CoA synthase resulted in high resistance levels to antibiotics according to  
335 susceptibility breakpoints from the European Committee on Antimicrobial Susceptibility  
336 Testing (EUCAST) guidelines 2020 {EUCAST, 2020 #1515}. The categorization was changed  
337 from susceptible (S) to resistant (R) for piperacillin, cefepim, aztreonam, and levofloxacin, and  
338 the MICs of ceftazidime, and ciprofloxacin were at the breakpoint, indicating that the  
339 overproduction of these efflux pumps is therapeutically relevant. However, another important  
340 clinical issue is the impact of the overproduction of these two efflux pumps on the pathogenicity  
341 of mutants. *P. putida* strains have rarely been reported in clinical setting. The origin of the two  
342 clinical strains (urine and rectal screening) harboring the HPG-5 phenotype suggests that these  
343 mutants are less virulent and responsible for colonization rather infection. The cascade of

344 activation of the two-component system ParRS and the impact of this specific mutation on  
345 virulence required further investigations.

346

## 347 **Experimental procedures**

### 348 **Strains, plasmids and culture conditions**

349 The strains and plasmids used in this study are listed in [Table S2](#). Strains were grown in  
350 Mueller-Hinton Broth (MHB) with calibrated concentrations of ions  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  (Becton  
351 Dickinson, Sparks, MD), on Mueller-Hinton Agar (MHA) (Bio-Rad, Marne's-la-Coquette,  
352 France), *Pseudomonas* Isolation Agar (PIA; Becton Dickinson) or M9 Minimal Medium  
353 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  42 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  22 mM,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  19 mM,  $\text{NaCl}$  8,5 mM) supplemented with 5%  
354 sucrose as sole carbon source. The selection of spontaneous ticarcillin resistant mutants were  
355 performed by spread of 100  $\mu\text{L}$  of a log-phase culture of reference strain KT2440 ( $A_{600\text{nm}} = 1.0$ )  
356 on MH agar supplemented with 250  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  ticarcillin (1. 9-fold the MIC of strain KT2440).  
357 After an overnight culture at 30°C, spontaneous resistant mutants were isolated on MH agar.

### 358 **Construction of the deletion mutants**

359 In-frame single and multiple knockout mutants were constructed by overlapping PCR and  
360 homologous recombination events as previously described (Kaniga et al., 1991). Genomic  
361 DNA of the KT2440 strain was extracted by the nucleospin Microbial DNA kit (Macherey  
362 Nagel, Hoerdt, France). Between 425- and 587-bp flanking the *ttgAB*, and *parXY* operons, and  
363 PP\_3454 and *ttgC* genes were amplified by PCR with specific oligonucleotides and the iProof  
364 High Fidelity DNA polymerase (Bio-Rad, Marne's-la-Coquette, France) ([Table S3](#)). The  
365 amplicons were used as a DNA template for the overlapping PCR (overlap of 14-bp) in presence  
366 of specific external primers ([Table S3](#)). The four fragments were cloned into linearized plasmid  
367 pCR-Blunt (Zero Blunt PCR Cloning Kit, Invitrogen, Carlsbad, United States), and then sub-  
368 cloned into the suicide vector pKNG101 plasmid previously digested with SpeI/ApaI or

369 BamHI/ApaI restriction enzymes. The recombinant plasmids were transformed into *E. coli*  
370 CC118 $\lambda$ *pir* strain, and subsequently into the strain KT2440 and its mutant HPG-5 by a  
371 triparental conjugation using the *E. coli* HB101 strain containing the helper plasmid pRK2013.  
372 Transconjugants were selected on PIA supplemented with 2 000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (strain KT2440) or  
373 6 000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (mutant HPG-5) of streptomycin. Plasmid excision and homologous  
374 recombination were obtained after the growth of transconjugants on M9 minimal medium  
375 supplemented with 5% of sucrose as sole carbon source. The deletions of 3 669, -3 712, -1053,  
376 and 257-bp in *ttgAB*, *parXY*, *ttgC*, and PP\_3453 genes were confirmed by genic amplification  
377 by PCR and Sanger sequencing on both strands.

### 378 **Directed mutagenesis of genes *ttgR* and *sucD* by allelic exchange**

379 The replacement of the *ttgR* or *sucD* alleles of the wild type strain KT2440 by the mutated allele  
380 (replacement of C to T in position 56) from the mutant HGP-1 and (insertion of in position 278)  
381 from HPG-5 mutant was based on the approach used for the construction of deletion mutants  
382 (see above). Briefly, a fragment of 686- and 1 102-bp including the mutations of HPG-1 and  
383 HGP-5 mutants were amplified by PCR using specific oligonucleotides (Table S3) and cloned  
384 into the plasmid pCR-Blunt (Invitrogen). The recombinant plasmids pCRblunt-*sucD*\* and  
385 pCRblunTtgR(G1), and the plasmid pKNG101 were digested by the exonucleases  
386 BamHI/ApaI. A fragment of 1 199-bp and #-bp was released, cloned into pKNG101, and then  
387 transformed in *E. coli* CC118 $\lambda$ *pir* strain. The insertion of the recombinant plasmid pKNG-  
388 *sucD*\* in the strain KT2440, the selection of transconjugants, the homologous recombination,  
389 and the confirmation of the insertion of alanine in position 278 were carried out as previously  
390 reported in the construction of deletion mutant part.

### 391 **Drug susceptibility testing**

392 Determination of the antibiotic susceptibilities of the KT2440 strain and all its mutants was  
393 performed by broth microdilution method and interpreted as recommended by the current

394 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines (The  
395 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for  
396 interpretation of MICs and zone diameters, version 9.0, 2019).

### 397 **Single Nucleotide Polymorphism (SNP) identification**

398 Identification of SNPs between the laboratory strain KT2440 and the ticarcillin spontaneous  
399 resistant mutant HPG-5 was performed by using Whole-Genome Sequencing (WGS). Genomic  
400 DNA from the strain KT2440 and its mutant HPG-5 was extracted with the Pure Link Genomic  
401 DNA Mini Kit (Invitrogen). The steps of DNA library preparation (Nextera XT DNA Library  
402 Preparation Kit) and sequencing (MiSeq aligner, Illumina, San Diego, United States) were  
403 performed by Microsynth AG with an average of 80 X (Balgach, Switzerland). Mapping of  
404 sequence reads of the HPG-5 mutant (7 514 191 reads) and the KT2440 strain (6 776 044 reads)  
405 from the laboratory to the reference sequence of KT2440 (Accession number: NC\_002947.4),  
406 and the identification of SNPs were executed by the CLC Genomic Workbench (v10.0.1)  
407 software. All mutations identified in more than 75% of sequence reads and absent to KT2440  
408 laboratory strain were controlled by Sanger Sequencing (Applied Biosystems 3130 automatic  
409 sequencer, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) after PCR amplification with specific  
410 primers (Table S3).

### 411 **Real-Time quantitative RT-PCR**

412 From a log-phase bacterial culture ( $OD_{600nm} \sim 0.8$ ), total RNA extraction was performed using  
413 RNeasy Plus MiniKit (Qiagen, Netherlands) according to the manufacturer's instructions. An  
414 additional DNase treatment (Single Strand DNase, Qiagen) was performed to complete the  
415 elimination of gDNA. 1  $\mu$ g of RNA was reverse transcribed using ImProm-II Reverse  
416 Transcription System (Promega, Madison, United States) as indicated by the manufacturer.  
417 Specific cDNA levels were measured using QuantiFast SybrGreen kit and a Rotor Gene  
418 RG6000 Real Time PCR instrument (Qiagen). The transcript levels were normalized with those

419 of the housekeeping gene encoding 16S RNA and expressed as a ratio to that for the reference  
420 strain KT2440. Gene expression values were calculated by the standard method of the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$   
421 from three independent experiments.

422

423 Acknowledgments

424

425 References

426

427



428  
429

**Table 1.** Drug-susceptibilities of strain KT2440 and its derivative mutants.

Strains	MIC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )											
	TIC	PIP	ATM	CAZ	FEP	MEM	IMP	CIP	LVX	GMN	TOB	AKN
KT2440	256	8	16	2	1	0.25	4	0.06	0.25	0.25	0.12	0.5
HPG-1	<b>1024</b>	<b>32</b>	<b>64</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	4	0.12	0.5	0.25	0.12	0.5
HPG-4	<b>1024</b>	<b>32</b>	<b>64</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	4	0.12	0.5	0.25	0.12	0.5
KT2440:: <i>ttgR</i> <sub>HGP-1</sub>	<b>1024</b>	<b>32</b>	<b>64</b>	<b>8</b>	2	<b>2</b>	4	0.12	0.5	0.25	0.12	0.5
HPG-5	<b>1024</b>	<b>32</b>	<b>64</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>4</b>	4	<b>0.5</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>0.5</b>	<b>4</b>
HPG-5 $\Delta$ <i>ttgAB</i>	<b>512</b>	16	32	2	<b>16</b>	<b>1</b>	4	0.12	0.5	<b>4</b>	<b>0.5</b>	<b>4</b>
HPG-5 $\Delta$ PP3455/56	<b>1024</b>	<b>32</b>	<b>64</b>	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	4	0.12	1	0.25	0.25	0.5
HPG-5 $\Delta$ <i>ttgAB</i> $\Delta$ PP3455/56	2	1	0.25	1	0.06	0.03	4	0.015	0.06	0.06	0.12	0.25
KT2440 $\Delta$ <i>ttgAB</i>	4	0.25	0.25	0.5	0.5	0.06	4	0.03	0.12	0.25	0.12	0.5
KT2440 $\Delta$ PP3455/56	256	16	32	4	1	<b>1</b>	4	0.06	0.25	0.06	0.06	0.12
KT2440 $\Delta$ <i>ttgAB</i> $\Delta$ PP3455/56	0.5	0.12	0.25	0.5	0.12	0.015	4	0.015	0.06	0.06	0.06	0.12
KT2440 $\Delta$ <i>ttgC</i>	0.5	0.12	0.25	0.5	0.12	0.03	4	0.015	0.06	0.06	0.06	0.12
HPG-5 $\Delta$ <i>ttgC</i>	2	0.5	0.5	0.5	0.06	0.03	4	0.03	0.06	0.12	0.06	0.25
HPG-5 $\Delta$ PP_3453	256	4	16	1	0.25	0.25	4	0.06	0.12	0.06	0.06	0.12
HPG-5 $\Delta$ PP_3454	256	4	16	1	0.25	0.25	4	0.06	0.12	0.06	0.06	0.12

KT2440::*sucD*<sub>InsA278</sub>      **1024**    **16**    **64**    **8**    **16**    **4**    **4**    **0.5**    **2**    **4**    **0.5**    **4**

---

430

431 The values in bold and in italic are at least four fold higher and lower than those of the reference strain KT2440 respectively. TIC, ticarcillin ;

432 PIP, piperacillin; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepim; MEM, meropenem ; IMP, imipenem ; CIP, ciprofloxacin; LVX,

433 levofloxacin; GMN, gentamicin ; TOB, tobramycin; AKN, amikacin.

434 **Table 2.** Drug susceptibilities of reference strain KT2440 and its mutants.

435

Drugs	MIC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )								436
	KT2440	KT2440	KT2440	KT2440	HPG-5	HPG-5	HPG-5	HPG-5	437
		$\Delta\text{PP}_{3455/56}$	$\Delta\text{ttgAB}$	$\Delta\text{ttgAB}\Delta\text{PP}_{3455/56}$		$\Delta\text{PP}_{3455/56}$	$\Delta\text{ttgAB}$	$\Delta\text{ttgAB}\Delta\text{PP}_{3455/56}$	438
Chloramphenicol	64	<b>256</b>	32	<i>16</i>	<b>256</b>	<b>256</b>	128	<i>16</i>	439
Erythromycin	256	<i>64</i>	256	<i>64</i>	>256	<i>64</i>	>256	<i>64</i>	440
Tetracycline	4	4	2	2	<b>32</b>	16	<b>16</b>	2	441
Novobiocin	1024	1024	32	32	2048	2048	512	32	442
Rhodamin-6-G	1024	1024	512	<i>256</i>	512	2048	2048	<i>256</i>	443
Methyl viologen	8	8	4	4	4	16	8	4	444
Acriflavin	16	32	8	8	<b>64</b>	<b>64</b>	32	8	444

445 The values in bold and in italic are at least four fold higher and lower than those of the reference strain KT2440 respectively

446

447 **Figure legends.**

448 **Figure 1. Multidrug resistance of mutant HPG-5 is due to co-overproduction of two**  
449 **RND efflux systems.** Relative expression levels of genes *ttgA* (white bar), PP\_3455 (black  
450 bar), PP\_2817 (light gray bar) and PP\_3425 (dark gray bar) in the mutant HPG-5. \*  $p < 0.05$  ;  
451 \*\*  $p < 0.005$  ; \*\*\*  $p < 0.005$ .

452

453 **Figure 2. Co-regulation of ParXY and TtgABC efflux pumps by a novel two-component**  
454 **system. A.** Genetic environment of genes *parX* and *parY*. **B.** Expression levels of genes  
455 PP\_3453 (HK, white bars) and PP\_3454 (RR, black bars)) in the mutants HPG-5,  
456 KT2440::*sucD*<sub>insA92</sub> and the clinical strains 16.3979, and 17.4591 relative to the strain  
457 KT2440. **C.** Expression levels of genes *parX* (white bars) and *ttgA* (black bars) in the mutants  
458 HPG-5, HPG-5 $\Delta$ PP\_3453 and HPG5 $\Delta$ PP\_3454 compared to wild type KT2440. Results are  
459 the means of three independent experiments with the indicated standard deviation and *p*  
460 values (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$ ).

461

462 **Figure 3. Inactivation of the protein SucD in *P. putida* is associated with the**  
463 **overproduction of two RND efflux pumps.**

464 **A.** Schematic representation of proteins SucD in the strain KT2440, the *in vitro* mutant HPG-  
465 5, and the clinical strain 16.3979. The CoA binding domain (residues 4 to 100), the substrate  
466 binding site (residue 159), and the active site (residue 247) are indicated. An alanine residue  
467 was inserted at position 92 and a deletion of 14 base pairs from the residue 159 were revealed  
468 in the mutant HPG-5, and the clinical strain 16.3979. Both mutations led to a frameshift and a  
469 premature stop codon **B.** Transcrit levels of genes *ttgA* (white bars) and *parX* (black bars) in  
470 the mutant HPG-5, the strain KT2440::*sucD*<sub>insA92</sub> and the clinical strains 16.3979, and  
471 17.4591. *p* values \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.005$  ; \*\*\*  $p < 0.0005$ .

472

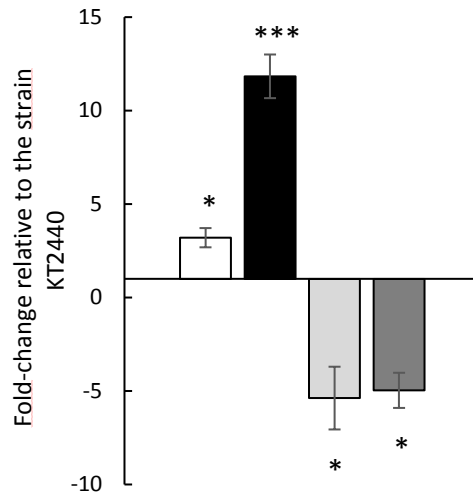
473

474

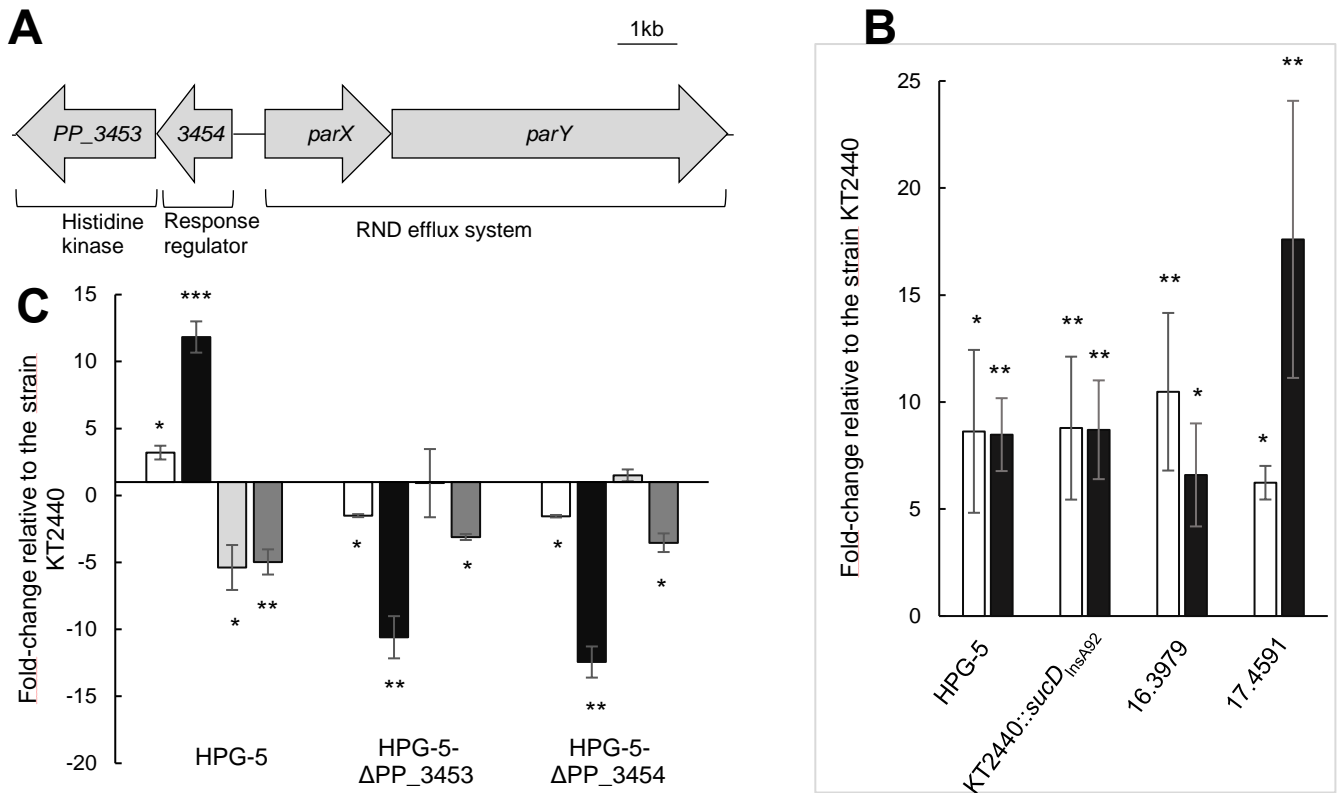
475

476

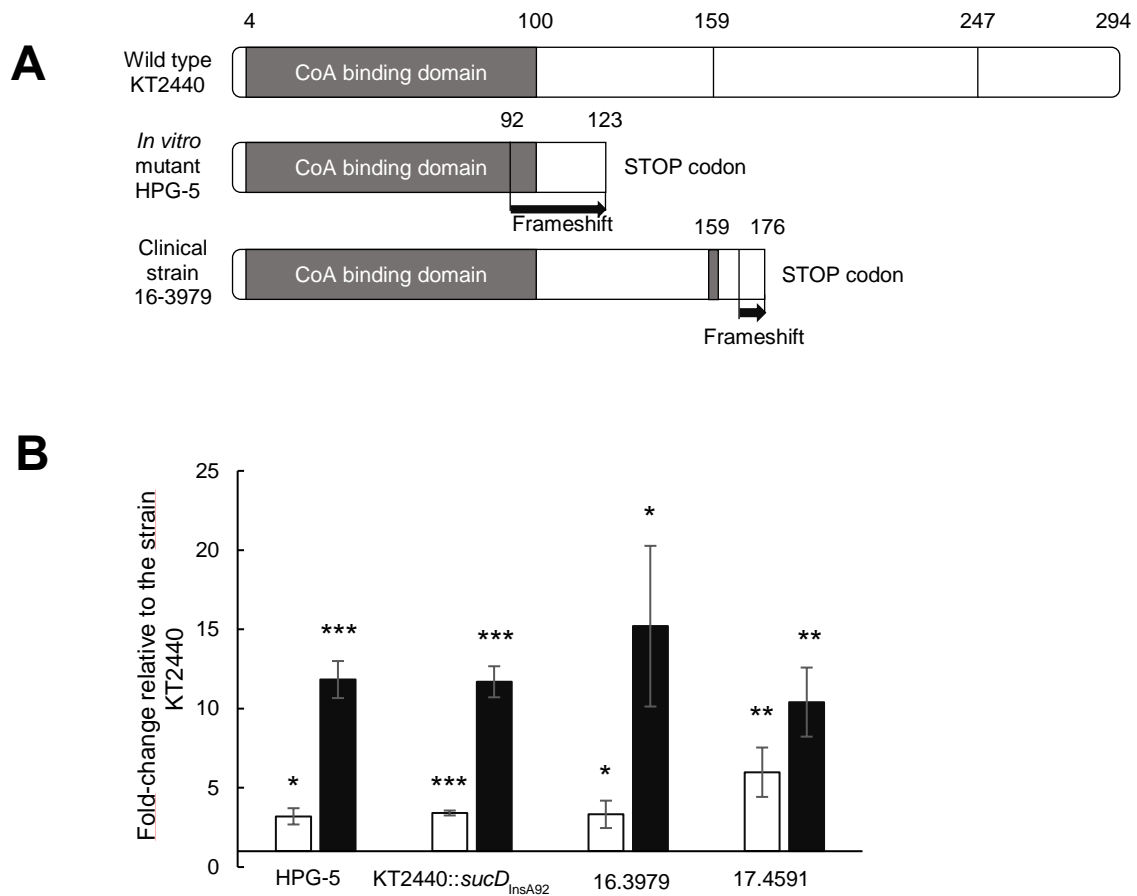
477



**Figure 1. Multidrug resistance of mutant HPG-5 is due to co-overproduction of two RND efflux systems.** Relative expression levels of genes *ttgA* (white bar), PP\_3455 (black bar), PP\_2817 (light gray bar) and PP\_3425 (dark gray bar) in the mutant HPG-5. \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.005$  ; \*\*\*  $p < 0.005$ .



**Figure 2. Co-regulation of ParXY and TtgABC efflux pumps by a novel two-component system. A.** Genetic environment of genes *parX* and *parY*. **B.** Expression levels of genes *PP\_3453* (HK, white bars) and *PP\_3454* (RR, black bars) in the mutants HPG-5, KT2440::*sucD*<sub>InsA92</sub> and the clinical strains 16.3979, and 17.4591 relative to the strain KT2440. **C.** Expression levels of genes *parX* (white bars) and *ttgA* (black bars) in the mutants HPG-5, HPG-5Δ*PP\_3453* and HPG-5Δ*PP\_3454* compared to wild type KT2440. Results are the means of three independent experiments with the indicated standard deviation and *p* values (\* *p* < 0.05; \*\* *p* < 0.005; \*\*\* *p* < 0.0005).



**Figure 3. Inactivation of the protein SucD in *P. putida* is associated with the overproduction of two RND efflux pumps. A.** Schematic representation of proteins SucD in the strain KT2440, the *in vitro* mutant HPG-5, and the clinical strain 16.3979. The CoA binding domain (residues 4 to 100), the substrate binding site (residue 159), and the active site (residue 247) are indicated. An alanine residue was inserted at position 92 and a deletion of 14 base pairs from the residue 159 were revealed in the mutant HPG-5, and the clinical strain 16.3979. Both mutations led to a frameshift and a premature stop codon **B.** Transcrit levels of genes *ttgA* (white bars) and *parX* (black bars) in the mutant HPG-5, the strain KT2440::*sucD*<sub>InsA92</sub> and the clinical strains 16.3979, and 17.4591. p values \* p < 0.05 ; \*\* p < 0.005 ; \*\*\* p < 0.0005.

### 2.3.2 Matériel supplémentaire de l'article

**Table S1.** Percentage of amino acid sequence identity between the proteins component the major RND efflux systems involved in antibiotic resistance in *P. aeruginosa* and putative RND efflux pumps contributing to antibiotic resistance in *P. putida*.

<i>Pseudomonas putida</i>											
	TtgA	TtgB	TtgC	PP 3425	PP 3426	PP 3427	PP 2817	PP 2818	PP 2819	PP 3455	PP 3456
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MexA	<b>66.8</b>		30.5			48.0			45.1	
	MexB		<b>78.4</b>		41.4			49.8			53.9
	OprM			<b>68.6</b>		31.7			48.4		
	MexC	43.9			33.7		<b>72.0</b>			50.6	
	MexD		50.6			41.0		<b>82.2</b>			<b>60.9</b>
	OprJ			42.7			31.5		<b>74.5</b>		
	MexE	31.1			<b>70.9</b>			33.7			34.9
	MexF		42.0			<b>88.8</b>			41.8		43.8
	OprN			31.5			<b>78.5</b>			31.2	
	MexX	38.8			35.7			42.4			48.2
MexY		49.3			42.1			52.8		55.4	

Percentage of amino acid identity higher than 60% is indicated in bold.



Strains, plasmids		Reference
Strains		
<i>Pseudomonas putida</i>		
KT2440	Wild-type <i>P. putida</i> reference strain	{Nelson, 2002 #213}
PAO1	Wild-type <i>P. aeruginosa</i> reference strain	{Stover, 2000 #87}
PA14	Wild-type <i>P. aeruginosa</i> reference strain	{Lee, 2006 #598}
HPG-1	KT2440 spontaneous <i>ttgR</i> mutant (A19V)	This study
HPG-4	KT2440 spontaneous <i>ttgR</i> mutant (E153*)	This study
HPG-5	KT2440 spontaneous <i>sucD</i> mutant (InsA <sub>278</sub> )	This study
16.3979	Clinical <i>sucD</i> mutant (Del <sub>503-516</sub> ) overproducing TtgABC and PP_3455/56	This study
17.4591	Clinical strain overproducing TtgABC and PP_3455/56	This study
KT2440 :: <i>ttgR</i> <sub>A19V</sub>	KT2440 with the <i>ttgR</i> allele of HPG-1	This study
KT2440:: <i>sucD</i> <sub>InsA278</sub>	KT2440 with the <i>sucD</i> allele of HPG-5	This study
KT2440Δ <i>ttgAB</i>	KT2440 with in frame deletion of genes <i>ttgAB</i>	This study
KT2440ΔPP_3455/56	KT2440 with in frame deletion of operon PP_3455-56	This study
KT2440Δ <i>ttgAB</i> - ΔPP_3455/56	KT2440 with in frame deletion of operons <i>ttgAB</i> and PP_3455-56	This study
KT2440Δ <i>ttgC</i>	KT2440 with in frame deletion of gene <i>ttgC</i>	This study
HPG-5Δ <i>ttgAB</i>	HPG-5 mutant with in frame deletion of genes <i>ttgAB</i>	This study
HPG-5ΔPP_3455/56	HPG-5 with in frame deletion of operon PP_3455-56	This study
HPG-5Δ <i>ttgAB</i> - ΔPP_3455/56	HPG-5 with in frame deletion of operons <i>ttgAB</i> and PP_3455/56	This study
HPG-5Δ <i>ttgC</i>	HPG-5 with in frame deletion of gene <i>ttgC</i>	This study
HPG5ΔPP_3453	HPG-5 with in frame deletion of gene PP_3453	This study
HPG-5ΔPP_3454	HPG-5 with in frame deletion of gene PP_3454	This study

*Escherichia coli*

DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK <sup>-</sup> mK <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> $\lambda$ <sup>-</sup>	Thermo Scientific	Fischer
CC118 $\lambda$ pir	$\Delta$ ( <i>ara-leu</i> ) <i>ara D</i> $\Delta$ <i>lacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE</i> (Am) <i>recA1</i> lysogenized with $\lambda$ pir phage	{Herrero, #632}	1990
HB101	<i>supE44 hsdS20</i> (rB <sup>-</sup> mB <sup>-</sup> ) <i>recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1 leuB6 thi-1</i>	{Lacks, #676}	1977
<hr/>			
Plasmids			
<hr/>			
pKNG101	Suicide vector in <i>P. putida</i> used for homologous recombination. <i>sacBR mobRK2 oriR6K</i> ; Str <sup>r</sup>	{Kaniga, #644}	1991
pRK2013	Helper plasmid for mobilization of non-self transmissible plasmids. ColE1 Tra <sup>+</sup> Mob <sup>+</sup> Kan <sup>r</sup>	{Ditta, #652}	1980
pCR-Blunt	Blunt-end cloning vector <i>ccdB lacZ<math>\alpha</math></i> ; Zeo <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup>	Thermo Scientific	Fischer
pKNG101:: <i>ttgR</i> <sub>A19V</sub>	Gene <i>ttgR</i> from HPG-1 mutant, cloned into pKNG101	This study	
pKNG101:: <i>sucD</i> <sub>InsA278</sub>	Gene <i>sucD</i> from HPG-5 mutant, cloned into pKNG101	This study	
pKNG101 $\Delta$ <i>ttgAB</i>	SpeI/ApaI 965-bp fragment composed of sequences flanking 5' and 3' ends of <i>ttgAB</i> , cloned in pKNG101	This study	
pKNG101 $\Delta$ PP3455/56	BamHI/ApaI 1,021 bp-fragment composed of sequences flanking 5' and 3' ends of PP_3455-56, cloned in pKNG101	This study	
pKNG101 $\Delta$ <i>ttgC</i>	BamHI/ApaI 1,046 bp-fragment composed of sequences flanking 5' and 3' ends of <i>ttgC</i> , cloned in pKNG101	This study	
pKNG101 $\Delta$ PP_3453	BamHI/ApaI 1,491 bp-fragment composed of sequences flanking 5' and 3' ends of PP_3453, cloned in pKNG101	This study	
pKNG101 $\Delta$ PP_3454	BamHI/ApaI 841 bp-fragment composed of sequences flanking 5' and 3' ends of PP_3454, cloned in pKNG101	This study	
pKNG101 $\Delta$ <i>sucD</i>	BamHI/ApaI 1 275 bp-fragment composed of sequences flanking 5' and 3' ends of <i>sucD</i> , cloned in pKNG101	This study	

**Table S2. Strains and plasmids used in this study.** <sup>a</sup>Str<sup>r</sup>, Marker of streptomycin resistance; Kan<sup>r</sup>, kanamycin resistance; Zeo<sup>r</sup>, zeocin resistance.

Primer name	Sequence (5'-3')	Source
<b>Oligonucleotides for gene inactivation</b>		
PCR_ittgAB_A1	AGTACAACCTCATCTGGCCC	This study
PCR_ittgAB_A2	TACACGTCGACCTCACTGCCTTCCTTGAA	This study
PCR_ittgAB_A3	CAGTGAGGTCGACGTGTACTTCCTGGTT	This study
PCR_ittgAB_A4	GGTAGTCAGGGATCAGCGAG	This study
PCRi-PP3455-56_A1	GGCGTCTGGGTTGAAGTAAG	This study
PCRi_PP3455-56_A2	TGGCGTTCTACATCACCTTGCTTGACGT	This study
PCRi_PP3455-56_A3	GTGATGTAGAACGCCATCCTGATCATCG	This study
PCRi_PP3455-56_A4	AACATGTGCAATCAACGGCT	This study
PCRi_ttgC_A1	GTGCTGTTCGTGTTCTGTG	This study
PCRi_ttgC_A2	CATGGTTTTGTAGTCAGGGATCAGCGAGC	This study
PCRi_ttgC_A3	CCTGACTACAAAACCATCCAGACGGCCTT	This study
PCRi_ttgC_A4	AATAACTCTTCTGGGGCGGC	This study
PCRi_PP3454_A1	GGGTAGTAGGCATGCGGATC	This study
PCRi_PP3454_A2	CCGCTGGACGGCAGCATCAGGTCAAGGAT	This study
PCRi_PP3454_A3	GATGCTGCCGTCCAGCGGTGAGTACAAC	This study
PCRi_PP3454_A4	CCGTCTCGTAATAGCCCCAC	This study
PCRi_PP3453_A1	TGTCCAGCGGTGAGTACAAC	This study
PCRi_PP3453_A2	ATCCTGAACCCGTCTCGTAATAGCCCCAC	This study
PCRi_PP3453_A3	ACGAGACGGGTTTCAGGATTCGTTTGCCCG	This study
PCRi_PP3453_A4	CCTGACCGACATTCCCAACC	This study
<b>Oligonucleotides for allelic replacement</b>		
PCRr_ttgR_A1	GGGCCAGATGAGGTTGTACT	This study
PCRr_ttgR_A2	GCCATGCCCTTAATACCCC	This study
PCRr_sucD_A1	GCTACCAAAGAGCGCGTTAC	This study
PCRr_sucD_A2	CCACACTGCTGAAATCGGGA	This study
<b>Oligonucleotides for RTq-PCR on efflux pumps and regulators</b>		
RNAr16S_RT1	ACGCTAATACCGCATAACG	This study
RNAr16S_RT2	CATCCTCTCAGACCAGTTAC	This study
PP3454_RT1	CTGCCAATCCTCATGCTGAC	This study
PP3454_RT2	AGGATCAGGTCGTTGTCCAG	This study
ttgA_RT1	GCCAAACGATTGCAGGC	This study
ttgA_RT2	GCTGGATGGTGGCCATG	This study
PP3455_RT1	GCCGATGTCACCCAGTCTAC	This study
PP3455_RT2	GTGATCTGGTTGGTGCTGGG	This study
PP2817_RT1	CCACTGGTCAAGATCGAGGC	This study
PP2817_RT2	CGGGTCGAGTTGCTGGATAC	This study

PP3425_RT1	AACTTCGTCGACAACCAGGT	This study
PP3425_RT2	TCCTTGTCCATGACCAGCAC	This study
<b>Oligonucleotides for RTq-PCR on the TCA cycle</b>		
acnA-I_RT1	GCTATGCCTTTCTGCGTTGG	This study
acnA-I_RT2	TTGATCATGGTGGTGTGCGA	This study
aceA_RT1	AAGGCTTCTACAAGGTCCGC	This study
aceA_RT2	AGGAAGGCGAGCAGTTGTAC	This study
Icd_RT1	CATGGTGATCTTCCGCGAGA	This study
Icd_RT2	ATCCACCACGTATTGCAGGG	This study
sucA_RT1	CACCCGTTTCGACCTCAAGA	This study
sucA_RT2	CGTAAGCCATGGTCTCTGCA	This study
sdhB_RT1	ATCGTTACAACCCGGACACC	This study
sdhB_RT2	TTGCCGTTTCATGTTTCATGCC	This study
fumC-I_RT1	ACTTCATCCAGCACTTCCCG	This study
fumC-I_RT2	GACATGGATGGTGGTCGGAA	This study
glcB_RT1	GGTGGATGACATTCTGGCCA	This study
glcB_RT2	ATCAGGCCGACGTTGTTGAT	This study
gltA_RT1	ACCGTGATGAAGCAGACCTG	This study
gltA_RT2	ATCACGGTGAACATGCTGGT	This study
<b>Oligonucleotides for gene sequencing</b>		
<i>ttgR seq1</i>	GGGCCAGATGAGGTTGTACT	
<i>ttgR seq3</i>	AAACTCCCTCACAATCCTTAAC	
<i>ttgR seq4</i>	AAACTCCCTCACAATCCTTAAC	
<i>ttgR seq5</i>	GCTGCATGCGCAAGCT	
<i>ttgR seq6</i>	AAATCCTGCATCACAAGTGCG	
<i>sucD seq3</i>	TGTCGATGAAGTTGGAGCCC	
<i>sucD seq4</i>	GTTCCGGCACTCTGACCTAC	
<i>sucD seq5</i>	ATGAGCGTCCTGATCAATAAAGATA	
<i>sucD seq6</i>	TTACTTCTTGCTTCCAGC	

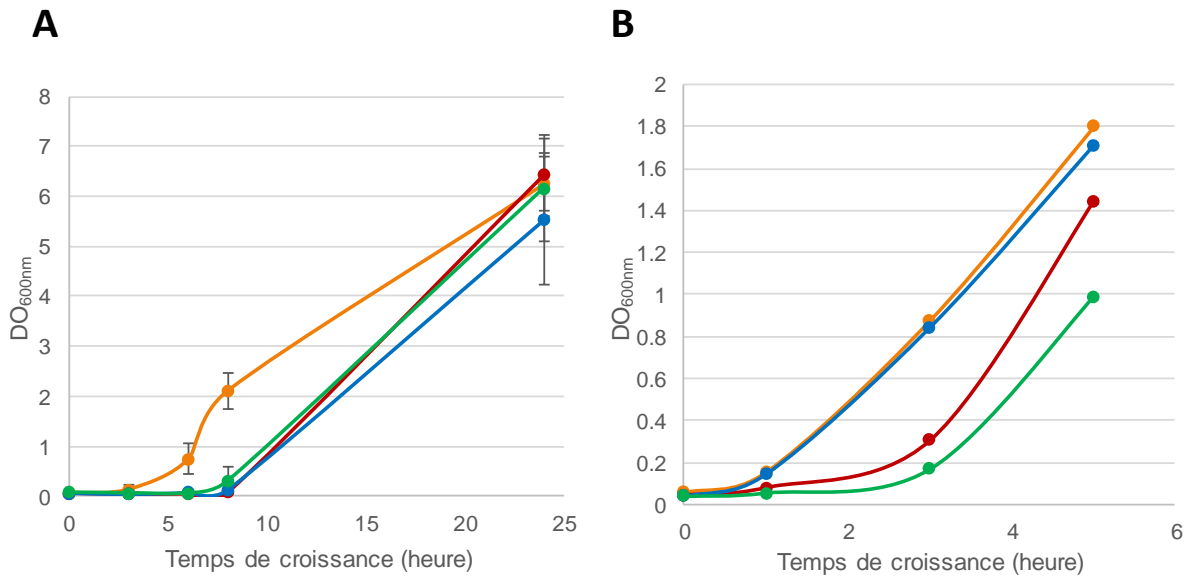
**Table S3. Primers used in this study.**

## 2.4 Résultats complémentaires

### 2.4.1 Implication de la pompe ParXY dans l'efflux des solvants organiques

Il a été largement rapporté dans la littérature que la pompe TtgABC est impliquée dans l'efflux des solvants organiques. Cependant, la prise en charge des solvants organiques par TtgABC a été évaluée à l'aide d'un mutant d'insertion (*miniTn5*) chez la souche DOT-T1E dont le gène *ttgC* était inactivé (mutant DOT-T1E-18) (Ramos et al., 1998). Afin d'évaluer la contribution des pompes TtgABC et ParXY(TtgC) au rejet de différents solvants organiques, nous avons mesuré la croissance de la souche KT2440 et de ses mutants de délétion *ttgAB* et/ou *parXY* en milieu liquide, en présence de toluène (0,1%) et d'octane (1%). Ainsi, la délétion de *ttgAB*, de *parXY* ou des deux pompes (KT2440 $\Delta$ *ttgAB* $\Delta$ *parXY*) a un effet similaire sur la croissance en présence de toluène 0,1% (**figure 25A**). Les souches délétées soit de l'opéron *ttgAB*, soit de l'opéron *parXY*, présentaient un retard de croissance significatif au bout de 8 heures de culture comparés à la souche sauvage KT2440, bien qu'au bout de 24 heures, la croissance normale était rétablie. La pompe d'efflux ParXY(TtgC) semble avoir la même importance que la pompe TtgABC pour la tolérance au toluène chez KT2440. De façon intéressante, il n'existe pas d'effet additionnel sur la sensibilité au toluène lorsque les deux pompes sont inactives simultanément.

La délétion de l'opéron *parXY* ne modifie pas la sensibilité de la souche à l'exposition d'octane à 1%, contrairement à la délétion de *ttgAB* (2,8 fois plus sensible à l'octane après 3h de culture). (**Figure 25B**). De façon intéressante, la double délétion de *ttgAB* et *parXY* conduit à une augmentation encore plus forte de la sensibilité à l'octane (5 fois plus sensible à la souche KT2440, comparé à 2,8 fois chez la souche KT2440 $\Delta$ *ttgAB*). Ces résultats



**Figure 25. Rôle des pompes TtgABC et ParXY/TtgC dans l'efflux du toluène et de l'octane.** Courbes de croissance (en heure) des souches KT2440 (orange), KT2440Δ*ttgAB* (rouge), KT2440Δ*parXY* (bleu) et du double mutant KT2440Δ*ttgAB*Δ*parXY* (vert) dans un milieu MH liquide en présence **(A)** de 0,1% de toluène (vol/vol) ou **(B)** de 1% d'octane (vol/vol).

indiquent que la pompe d'efflux ParXY(TtgC) ne participe à la tolérance à l'octane que lorsque TtgABC n'est pas présente. Cependant, ces données sont issues d'une expérience préliminaire et n'ont été mesurées qu'une fois, la reproductibilité de ces résultats n'est donc pas avérée.

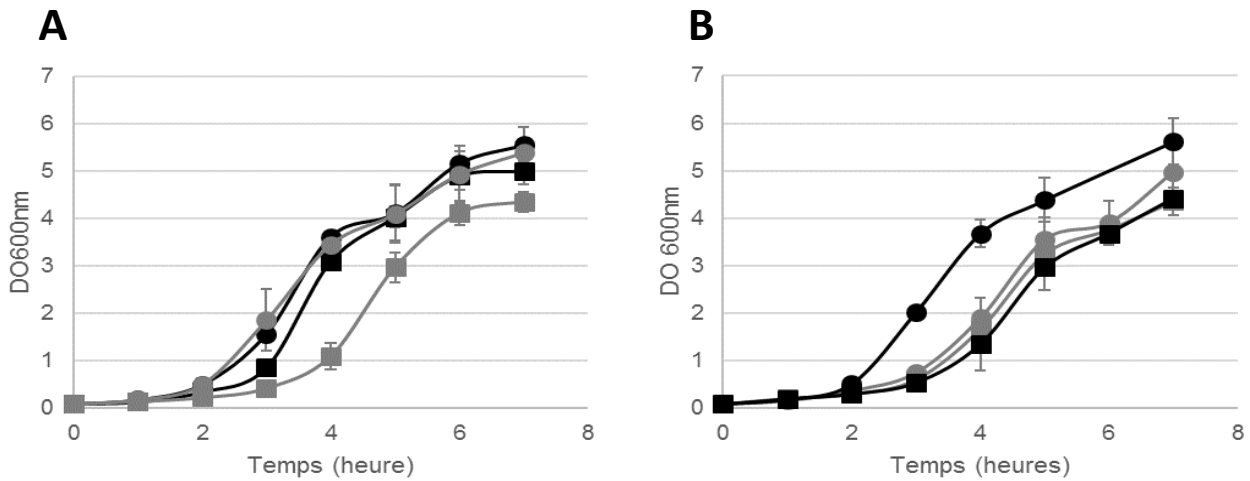
L'ensemble de ces résultats suggèrent que la pompe d'efflux ParXY(TtgC) est impliquée dans l'efflux des antibiotiques, et également dans la tolérance au toluène de manière équivalente à la pompe TtgABC. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe de Juan Luis Ramos, qui m'a accueillie au sein de la *Zaidín Experimental Station*, CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), à Grenade, pour un stage expérimental de deux semaines.

#### **2.4.2 Mesure de la croissance des différents mutants sélectionnés *in vitro*.**

Dans le cadre de la caractérisation phénotypique des mutants spontanés HPG-1, HPG-4 et HPG-5 que nous avons sélectionné *in vitro* à partir de la souche de référence KT2440, nous avons mesuré leur croissance dans un milieu riche liquide MHc (**Figure 26A**). Le calcul de la vitesse de croissance durant la phase exponentielle (entre 2h et 5h de croissance) a permis d'observer que le mutant HPG-5 possédait une vitesse de croissance 25% plus faible que celle de la souche KT2440 ( $V=2,7 \text{ DO}_{600\text{nm}}/\text{h}$  contre 3,6). La vitesse de croissance des autres mutants, HPG-1 et HPG-4, n'était pas altérée.

Afin de déterminer si la surproduction des pompes d'efflux TtgABC et ParXY(TtgC) pouvait être responsable de l'altération du fitness du mutant HPG-5 en raison d'un surcoût énergétique, nous avons mesuré la vitesse de croissance de la souche KT2440, du mutant HPG-5 et des mutants de délétion HPG-5 $\Delta$ tgtAB et HPG-5 $\Delta$ parXY (**Figure 26B**). Cependant, la délétion de l'une ou l'autre pompe n'a pas modifié la vitesse de croissance du mutant HPG-

5, qui était toujours retardée par rapport à la souche sauvage KT2440. L'ensemble de ces résultats suggère que c'est plutôt l'altération métabolique du mutant HPG-5, causée par l'inactivation du gène *sucD*, qui est la cause du retard de croissance observé.

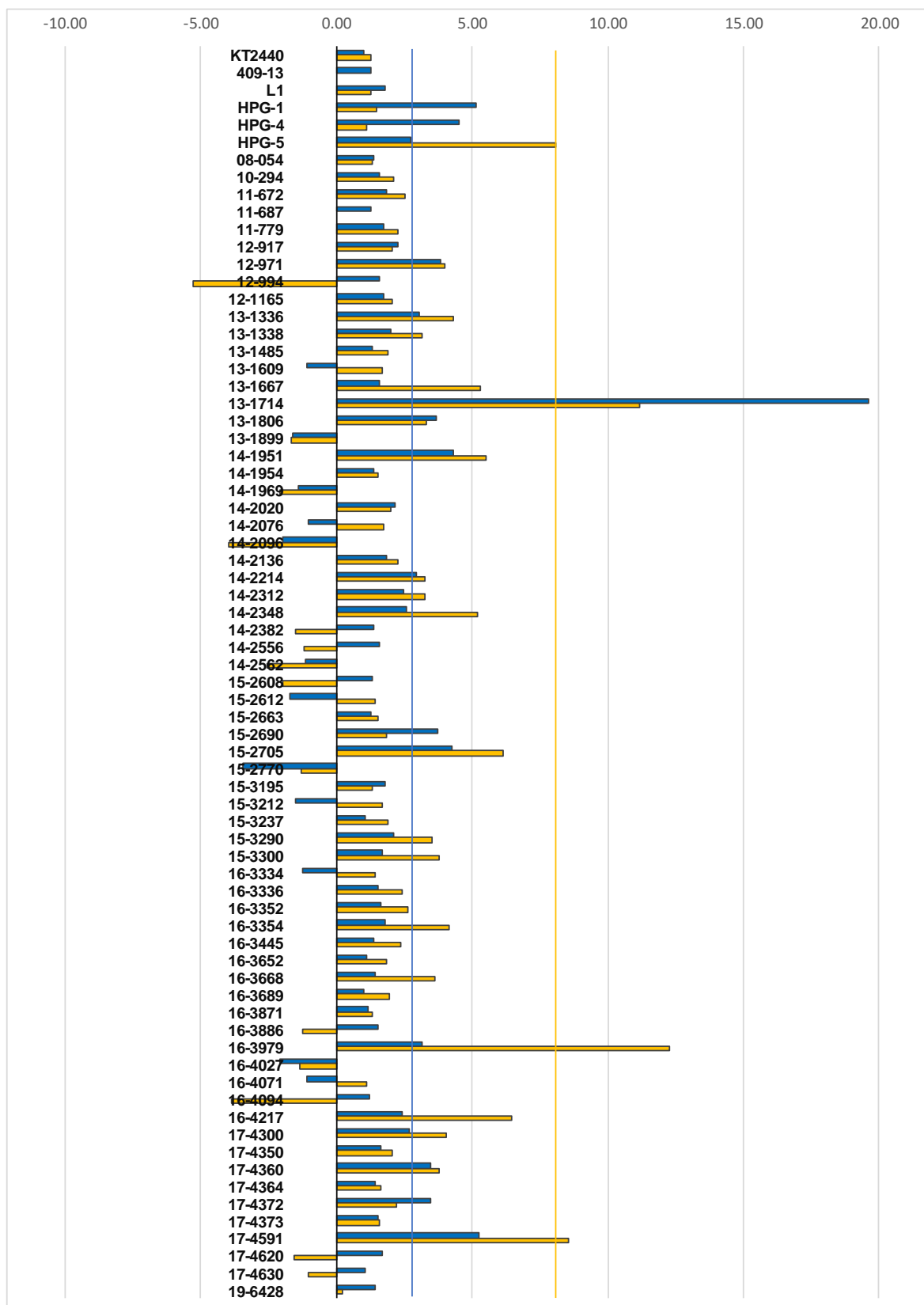


**Figure 26. Mesure de la croissance bactérienne en milieu riche de la souche KT2440 de *P. putida* et de ses mutants dérivés. A.** Absorbance d'une culture de la souche KT2440 (ronds noirs) et des mutants HPG-1 (carrés noirs), HPG-4 (ronds gris) et HPG-5 (carrés gris) en fonction du temps. **B.** Absorbance d'une culture de KT2440 (ronds noirs), HPG-5 (carrés gris) et ses mutants HPG-5ΔttgAB (ronds gris) et HPG-5ΔparXY (carrés noirs) en fonction du temps. Les données présentées constituent la moyenne et les écarts types de trois expériences indépendantes.

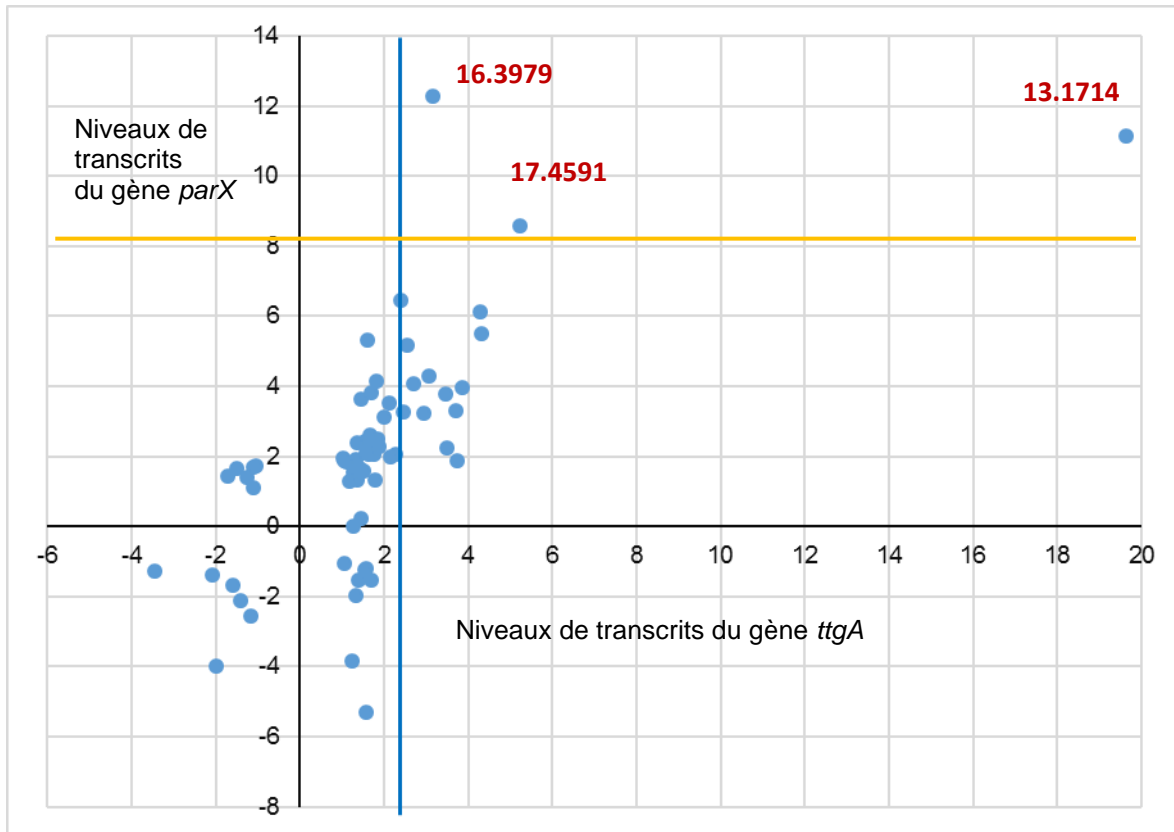


### 2.4.3 Caractérisation d'une collection de souches cliniques de *P. putida* résistantes à la ticarcilline

Le Centre National de Référence de la résistance aux antibiotiques, localisé à l'hôpital Universitaire de Besançon, a constitué une collection de 147 souches cliniques de *P. putida* isolées de 34 établissements de santé localisés en France métropolitaine et en Outre-Mer. Parmi elles, nous en avons sélectionné 66 qui étaient résistantes à la ticarcilline (CMI > 256 mg/L), le substrat préférentiel de la pompe d'efflux TtgABC. Soixante-deux étaient également moins sensibles aux aminosides (CMI de la tobramycine > 0,5 mg/L et CMI de l'amikacine > 4 mg/L), des substrats spécifiques de la pompe d'efflux ParXY/TtgC. Selon les critères de (Magiorakos et al., 2012), les souches étaient classées MDR (n=5) ou XDR (n=57). Toutes les souches étaient sensibles à la colistine. Les souches ont majoritairement été isolées des urines (n= 34), de dépistages rectal (n=17), d'hémocultures (n=6) et de prélèvements divers (n=9). Dans un premier temps, nous avons mesuré les niveaux d'expression des gènes *parX* et *ttgA* chez les 66 souches sélectionnées, ainsi que chez 2 souches sauvages (**Figure 27**). Les mutants HPG-1, HPG-4 et HPG-5 ont été utilisés comme témoins positifs. En effet, le travail réalisé chez ces mutants sélectionnés *in vitro*, nous a permis de confirmer le rôle de TtgABC chez les trois mutants et celui de ParXY/TtgC chez le mutant HPG-5. Ainsi, nous avons obtenu trois catégories de souches, celles ne surexprimant pas les gènes *ttgA* ni *parX* (n=53), celles surexprimant uniquement le gène *ttgA* (n=13) et enfin les souches surexprimant à la fois les gènes *ttgA* et *parX* (n=3). De façon intéressante, nous n'avons pas observé de souche qui surexprimait uniquement le gène *parX* (figures 27 et 28).



**Figure 27. Mesure des niveaux de transcrits des gènes *ttgA* et *parX* chez une collection de 66 souches cliniques de *P. putida*.** Les niveaux de transcrits mesurés par RTq-PCR des gènes *ttgA* et *parX* sont respectivement représentés en bleu et en orange. Le seuil de significativité est indiqué par une ligne jaune pour le gène *parX* et bleu pour le gène *ttgA*.



**Figure 28. Distribution des souches en fonction de leurs niveaux d'expression des gènes *ttgA* (en abscisse) et *parX* (en ordonnée).** Chaque point représente les niveaux d'expression du gène *parX* en fonction de celui du gène *ttgA* d'une souche clinique. Les seuils de significativité des gènes *ttgA* et *parX* sont respectivement représentés par des lignes bleue et orange. Les numéros des trois souches surexprimant les gènes *ttgA* et *parX* sont mentionnés en rouge.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux 16 souches cliniques qui surexprimaient isolément le gène *ttgA* (24,2%). Compte tenu du rôle de répresseur transcriptionnel du gène *ttgR* localisé en amont de l'opéron *ttgABC*, nous avons l'avons séquencé par la méthode de Sanger chez ces 16 souches. Afin, d'écartier le polymorphisme naturel du gène *ttgR*, nous l'avons également séquencé chez 16 souches qui ne surexprimaient pas le gène *ttgA* (Tableau 9).

Au total une vingtaine de substitutions dans la protéine TtgR ont été révélées. Cependant, la plupart de ces substitutions étaient également identifiées chez au moins une souche clinique qui ne surexprimait pas le gène *ttgA* suggérant qu'il s'agit d'un polymorphisme de séquence. La seule modification de séquence constatée chez 8 des 16 souches surexprimant le gène *ttgA* était la substitution d'une tyrosine en phénylalanine en position 170. Afin de vérifier l'impact de cette substitution, la mutagenèse dirigée de la substitution Y170F a été réalisée chez la souche sauvage KT2440. Contre toute attente, la mutation n'a pas modifié l'expression du gène *ttgA*, ni le phénotype de résistance aux antibiotiques testés de la souche mutée (données non présentées). Ainsi, la surexpression du gène *ttgA* semble indépendante d'une mutation présente dans le gène *ttgR*.

En parallèle du clonage de la mutation Y170F dans la souche KT2440 par mutagenèse dirigée, nous avons séquencé la région intergénique située entre les gènes *ttgR* et *ttgA* chez toutes les souches qui ne possédaient pas la mutation Y170F et qui ne surexprimaient que *ttgA*, soit les souches 13-1806, 14-2348, 15-2690, 16-4217 et 17-4372. Cette région contient les régions promotrices chevauchantes de l'opéron *ttgABC* et du gène *ttgR*, ainsi que l'opérateur sur lequel se lie la protéine TtgR (Figure 29). L'hypothèse était qu'une

**Tableau 9. Substitutions d'acide aminé dans la protéine TtgR identifiées chez les souches cliniques.** <sup>1</sup>niveaux de transcrits relatifs du gène *ttgA*. En vert : la souche de référence KT2440, en rouge, les souches surexprimant le gène *ttgA* et en bleu, les souches ne surexprimant pas le gène *ttgA*.

Souche	Gène <i>ttgA</i> <sup>1</sup>	Séquence protéique de TtgR																			
		22	53	69	83	132	133	139	140	142	146	149	156	159	160	161	170	183	185	189	207
KT2440	1	R	N	T	L	S	A	K	G	T	A	V	G	D	V	E	Y	D	V	G	A
12-971	3,8	K			V	G											F				
13-1336	3,0	K			V	G											F				
13-1714	19,6	K			V	G															
13-1806	3,7	K			V	A														K	
14-1951	4,3	K			V												F				
14-2214	2,9	K			V	G											F				
14-2312	2,4	K			V	G											F				
14-2348	2,5	K	S			G		Q	S	A	G				I	D			F	A	G
15-2690	3,7	K			V	A														K	
15-2705	4,2	K			V	G											F				
16-3979	3,1	K	S			G		Q	S	A	G				I	D			F	A	G
16-4217	2,4	K			V	A														K	
17-4300	2,7	K			V	G											F				
17-4360	3,4	K			V												F				
17-4372	3,4	K	S			G		Q	S	A	G				I	D			F	A	G
17-4591	5,2				V										A						
409-13	1,27	K	S			G		Q	S	A	G		A	E	I	D		E	F		G
L1	1,77	K		A			T			A		A	V						F	R	
10-294	1,56	K			V	A														R	
11-779	1,72	K			V	A														R	
12-917	2,28	K			V	A														R	
12-1165	1,76				V	A														R	
14-2382	1,38	K			V	A														R	
13-1667	1,6	K	S			G		Q	S	A	G				I	D			F	A	G
15-2663	1,28	K	S			G		Q	S	A	G				I	D			F	A	G
15-3300	1,71	K	S			G		Q	S	A	G				I	D			F	A	G
16-3871	1,18	K			V	G		Q												R	
16-4071	-1,09	K			V	A														R	
13-1899	-1,6	K			V	A														R	
14-1969	-1,4	K			V	A														R	
16-3336	1,54	K			V	A														R	
16-3886	1,54	K			V	G															
17-4373	1,52	K			V	A														R	
17-4630	1,05	K	S			G		Q	S	A	G				I	D			F	A	G



**Figure 29. Séquençage de la région intergénique *ttgA-ttgR*.**

La région intergénique a été séquencée chez la souche KT2440 (vert), chez les 5 souches surexprimant *ttgA* et n'ayant pas la substitution T170F dans le gène *ttgR* (rouge), chez 5 souches ne surexprimant pas *ttgA* (bleu) et chez deux des souches possédant la substitution T170F dans le gène *ttgR* (violet). La région promotrice chevauchante des gènes *ttgABC* et *ttgR* se situe entre les positions -88 et -128 et la région de l'opérateur de la protéine TtgR se situe entre les positions -134 et -170. D'après le travail de S. Chassage.

modification de cette région pourrait empêcher la fixation de la protéine TtgR et induire une surproduction constitutive de la pompe TtgABC. Nous avons mis en évidence un certain nombre de substitutions dans la séquence de l'opérateur de TtgR, ce qui nous a conduit à séquencer également cette région chez des souches ne présentant pas de modification de l'expression de *ttgA*, afin d'éliminer le polymorphisme naturel (13-1899, 14-1969, 16-3336, 16-3871 et 16-3886).

De façon notable, une délétion de 101 pb enlevant l'ensemble de la région de l'opérateur de TtgR était présente chez deux souches (14-2348 et 17-4372), suggérant que l'opéron *ttgABC* pourrait être dérégulé chez ces souches en raison d'une perte de l'opérateur et de l'absence de fixation de la protéine TtgR. Chez ces deux souches, nous avons également observé une insertion de 95 pb. Chez la souche 15-2690, nous avons observé une simple substitution d'un nucléotide A(-110)G dans la région promotrice, tandis que chez les autres souches, cette région était très conservée. L'impact de cette substitution devra être vérifié par mutagenèse dirigée chez la souche sauvage KT2440.

Etant donné que le clonage de la mutation Y170F n'a pas conduit à la surexpression de l'opéron *ttgABC* ni à l'induction d'une résistance aux substrats de la pompe, nous avons voulu vérifier si la région intergénique des souches possédant cette mutation pouvait être altérée. Nous avons choisi deux souches parmi les 8 qui possédaient cette mutation pour séquencer leur région intergénique (les souches 12-971 et 13-1336). Cependant, les séquences des deux souches étaient strictement identiques à celle de la souche KT2440, et nous n'avons pu mettre en évidence aucune mutation d'intérêt ni dans la région promotrice, ni dans l'opérateur de TtgR, qui pourrait expliquer la surexpression constitutive du gène *ttgA*.

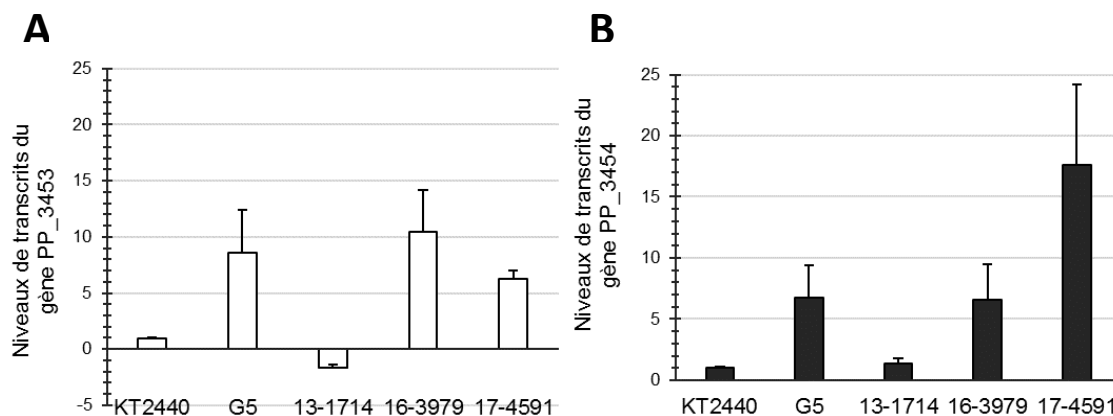
Pour résumer, nous avons déterminé que 8 souches qui surexprimaient le gène *ttgA* possédaient une mutation Y170F, qui était absente des souches sauvages ou des souches ne surexprimant pas le gène *ttgA*. Cependant, le clonage par mutagenèse dirigée de cette substitution chez la souche KT2440 n'a eu aucun effet, ce qui nous a permis de conclure que le gène *ttgR* était sauvage et non altéré chez la totalité des souches qui surexprimaient l'opéron codant pour la pompe d'efflux TtgABC. Cependant, la région opératrice du répresseur TtgR était délétée complètement chez deux souches (14-2348 et 17-4372) et la région promotrice possédait une substitution d'un nucléotide chez une troisième souche (15-2690), suggérant que la pompe TtgABC pourrait être surproduite constitutivement suite à une altération de cette région intergénique qui empêcherait la fixation du répresseur TtgR. Cependant, pour les 10 autres souches qui ne surexprimaient que le gène *ttgA*, nous ne pouvons pas conclure sur le mécanisme d'action conduisant à cette surexpression, laissant suggérer qu'il existe des mécanismes encore inconnus capables de réguler la pompe d'efflux TtgABC.

Puis, notre travail s'est focalisé sur les trois souches (13-1714, 16-3979 et 17-4591) qui surexprimaient à la fois le gène *parX* (> 8 fois) et le gène *ttgA* (> 2,4 fois). Compte tenu des données obtenues lors de notre travail sur le mutant HPG-5, nous avons séquencé le gène *sucD* chez les trois souches cliniques, chez les souches sauvages 409-13 et L1, ainsi que chez trois souches cliniques qui ne surexprimaient pas le gène *parX*. Nous avons constaté que la séquence de la protéine SucD était fortement conservée (98%) entre les souches étudiées. La souche 409-13 ainsi que les trois souches cliniques qui ne surexprimaient pas le gène *parX* présentaient uniquement la substitution d'une His en Asn en position 225. De façon intéressante, la souche 16-3979 avait une délétion de 13 nucléotides (Del<sub>503-516</sub>) dans le gène



*sucD* qui conduisait à l'apparition d'un codon stop prématuré en position 176. La protéine SucD était inactive chez la souche 16-3979, comme chez le mutant sélectionné *in vitro* HPG-5. La séquence de la protéine SucD était identique à celle de la souche KT2440 pour les souches 13-1714 et 17-4591

Nous avons montré que le système à deux composants (S2C) PP\_3453-PP\_3454 était impliqué dans l'activation des opérons *parXY* et *ttgABC* chez le mutant HPG-5. Ainsi, nous avons mesuré les niveaux d'expression des gènes PP\_3453 et PP\_3454, codant respectivement pour le senseur histidine kinase et le régulateur de réponse, dans les souches 13-1714, 16-3979 et 17-4591 (**Figure 30**). Les souches 16-3979 et 17-4591 surexpriment les deux gènes appartenant au S2C, contrairement à la souche 13-1714.



**Figure 30. Niveaux de transcrits des gènes PP\_3453 (A) et PP\_3454 (B) dans les souches cliniques surexprimant les gènes *parX* et *ttgA*.** Les niveaux de transcrits des gènes PP\_3453 (blanc) et PP\_3454 (noir) de la souche sauvage KT2440, du mutant HPG-5 et des souches cliniques ont été mesurés par RTq-PCR.

## 2.5 Conclusions

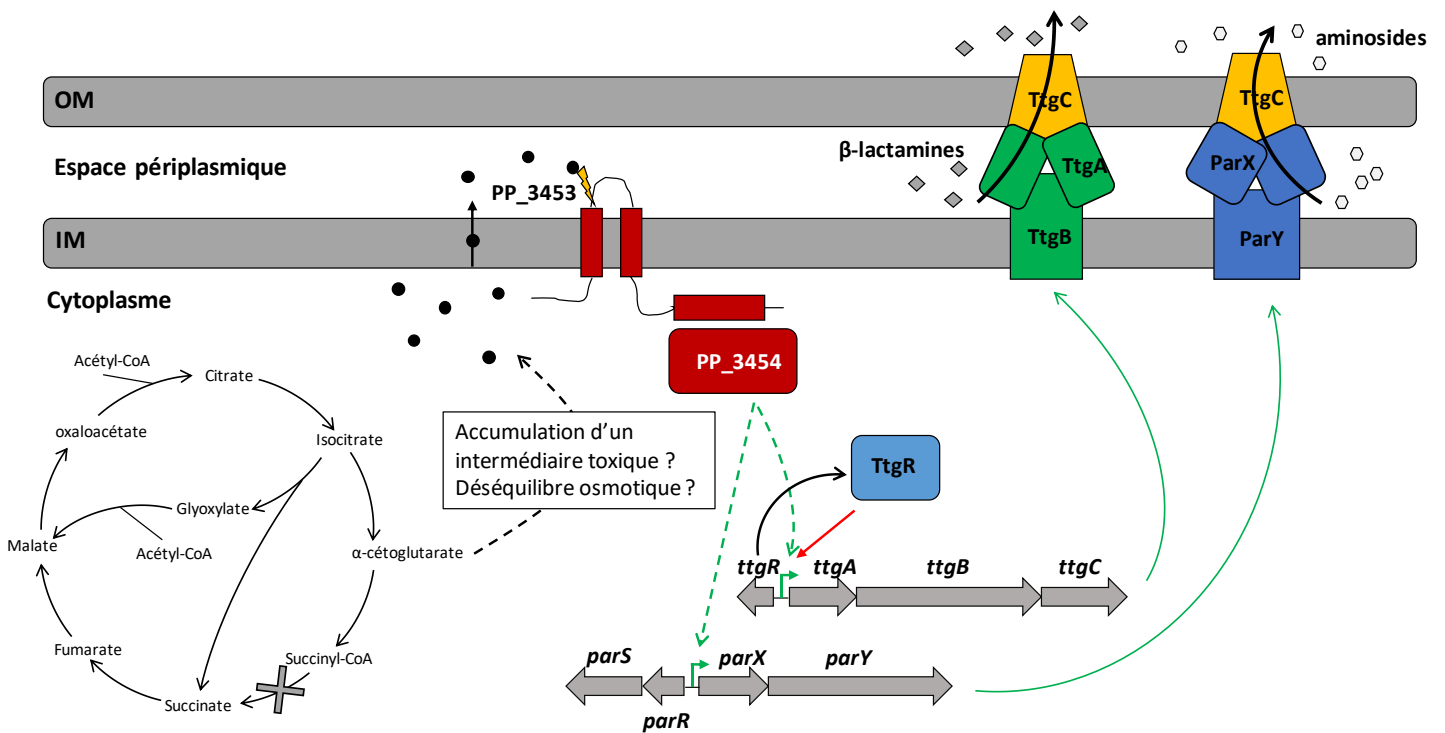
Ce travail a permis d'améliorer la connaissance sur les pompes d'efflux de la famille RND chez *P. putida* et sur le réseau complexe de régulation dont elles dépendent (**Figure 31**). La sélection *in vitro* de mutants spontanés sur un milieu sélectif contenant de la ticarcilline a permis d'identifier deux phénotypes de résistance.

Le premier phénotype, représenté par les mutants HPG-1 et HPG-4, impliquait une résistance aux  $\beta$ -lactamines induite par la surproduction de la pompe d'efflux TtgABC. Le séquençage haut débit a permis d'identifier une altération du gène *ttgR* codant pour un régulateur transcriptionnel responsable de la répression de l'opéron *ttgABC*, la protéine TtgR. La caractérisation d'une collection de 66 souches cliniques rassemblée par le CNR-RA a montré que 16 souches (24%) surexprimaient le gène *ttgA* (> 2,4 fois). Cependant, le séquençage du gène *ttgR* chez ces souches a montré que seule une mutation Y170F existait chez les souches surproductrices et était absente des souches sauvages, mais le clonage de cette mutation chez la souche sauvage KT2440 n'a pas induit de surexpression de l'opéron *ttgABC*. Au final, seules 3 souches présentaient une modification de la région intergénique entre les gènes *ttgR* et *ttgA* qui pourrait expliquer la surexpression constitutive de la pompe d'efflux *ttgABC*. L'origine de cette surexpression reste inconnue pour les autres souches, et des investigations plus poussées seront nécessaires pour mieux comprendre ce mécanisme.

Un deuxième phénotype de résistance a été obtenu lors de la sélection des mutants *in vitro* sur ticarcilline, représenté par le mutant HPG-5. Ce mutant présentait une faible sensibilité aux aminosides, aux  $\beta$ -lactamines ainsi qu'aux fluoroquinolones. La caractérisation de cette souche multi-résistante a montré qu'elle surproduisait à la fois la pompe d'efflux TtgABC et

une nouvelle pompe d'efflux de la famille RND, que nous avons appelée ParXY. Cette pompe dont la fonction est similaire à celle de MexXY(OprM) chez *P. aeruginosa*, participe à la résistance naturelle aux aminosides ainsi qu'à la résistance acquise aux aminosides, aux macrolides, aux fluoroquinolones et au céfépime. Par ailleurs, nous avons montré la participation de ParXY dans la tolérance au toluène et à l'octane. De plus, nous avons pu montrer qu'elle fonctionnait en association avec TtgC, la protéine de membrane externe codée dans l'opéron *ttgABC*. Nous avons ensuite caractérisé la régulation de cette nouvelle pompe, et découvert qu'elle était co-régulée avec la pompe TtgABC par un système à deux composants, que nous avons nommé ParRS, dont l'opéron *parRS* est situé directement en amont de l'opéron *parXY* et codé en sens inverse ( ). Le séquençage du mutant HPG-5 a permis de montrer que l'activation constitutive du S2C et des pompes d'efflux ParXY(TtgC) et TtgABC était due à une inactivation du gène *sucD*, codant pour la sous-unité  $\alpha$  de la succinyl-CoA synthétase du cycle de Krebs. Le lien fonctionnel entre la perturbation du métabolisme central du carbone et l'activation du S2C a été exploré mais des études plus poussées seront nécessaires pour le comprendre.

Nous avons recherché des souches cliniques parmi la collection établie par le CNR-RA qui pouvaient surexprimer également cette nouvelle pompe, ParXY(TtgC), et nous avons découvert que trois d'entre elles (4,5%) présentaient ce phénotype. De façon intéressante, nous n'avons trouvé aucune souche qui surexprimait *parX* seul, sans le gène *ttgA*, ce qui tend à suggérer que cette pompe est toujours co-régulée avec la pompe TtgABC. Parmi ces trois souches cliniques, deux d'entre elles surexprimaient les deux gènes du S2C, *parR* et *parS*, et l'une des deux possédait une inactivation du gène *sucD* suite à l'insertion de 12 nucléotides et à l'apparition d'un codon stop prématuré, comme chez le mutant HPG-5.



**Figure 31. Schéma de la voie d'activation des pompes TtgABC et ParXY chez le mutant sélectionné *in vitro* HPG-5 et la souche clinique 16-3979.** Une flèche en pointillés représente une régulation indirecte ou non caractérisée. Une flèche pleine représente une régulation directe. Une flèche verte correspond à une activation. OM : membrane externe ; IM : membrane interne.

Pour conclure, ce travail a permis d'élargir nos connaissances sur les pompes d'efflux de la famille RND et leur implication dans la résistance aux antibiotiques chez *P. putida*. Nous avons caractérisé une nouvelle pompe d'efflux ainsi que son régulateur, et démontré l'existence d'une co-régulation de plusieurs pompes en réponse à une substitution unique dans le chromosome de la souche KT2440, conduisant à la multi-résistance aux antibiotiques. De plus, nous avons montré qu'il existait un lien entre une perturbation du métabolisme central du carbone et la surproduction de pompes d'efflux, suggérant que ces pompes puissent jouer un rôle physiologique de réponse à un stress métabolique.

### **III. DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

---

## **Implication de la pompe d'efflux MexXY(OprM) dans la résistance à la colistine.**

Un grand nombre de systèmes d'efflux actif sont présents chez les bactéries et le genre *Pseudomonas* n'échappe pas à cette règle. Les génomes de *P. aeruginosa* PAO1 et *P. putida* KT2440 comptent respectivement 398 et 394 systèmes d'efflux actif (Stover et al., 2000) (Nelson et al., 2002). Parmi ces systèmes, seuls ceux de la famille RND contribuent de manière significative à la résistance naturelle, adaptative et acquise aux antibiotiques, y compris ceux utilisés dans les schémas thérapeutiques pour éradiquer ces deux espèces. Cette contribution de l'efflux à la résistance aux antimicrobiens a principalement été décrite chez *P. aeruginosa*. En effet, plusieurs travaux réalisés à partir de mutants sélectionnés *in vitro* en présence d'antibiotiques et chez des isolats d'origine clinique, environnementale et animale résistants aux antibiotiques ont rapporté le rôle majeur des systèmes d'efflux MexAB-OprM et MexXY(OprM) chez cette espèce (Poole et al., 1996a) (Llanes et al., 2004) (Haenni et al., 2017) (Hocquet et al., 2007) (Frimodt-Møller et al., 2018). Exprimé constitutivement, MexAB-OprM est capable de prendre en charge un grand nombre de substrats antibiotiques de structure différente ( $\beta$ -lactamines, tétracyclines, fluoroquinolones, macrolides, phénicolés, sulfamides et triméthoprim) (Poole et al., 1993) y compris des molécules récemment développées comme l'avibactam, un inhibiteur de  $\beta$ -lactamase (Castanheira et al., 2019).

Contrairement à MexAB-OprM et aux autres systèmes d'efflux présents chez *P. aeruginosa*, le système MexXY(OprM) est capable de prendre en charge les aminosides et contribue, selon les concentrations critiques définies par l'EUCAST 2020, au changement de catégorisation (Sensible à Résistant) d'une souche surproduisant MexXY/OprM à cette

famille d'antibiotiques (Aires et al., 1999) (Guénard et al., 2014). En effet, de précédents travaux de thèse (thèses de F. El Garch et de A. Bolard) réalisés au laboratoire ont mis en évidence, le rôle majeur de ce système dans la résistance aux aminosides notamment lorsqu'il est associé à d'autres mécanismes de résistance (EF-G1A, NuoG, GalU, RplY ...) (Bolard et al., 2019) (El'Garch et al., 2007)(El'Garch et al., 2007). La surproduction de MexXY(OprM) est fréquente chez les isolats d'origine humaine et animale résistants aux aminosides (Sobel et al., 2003) (Beinlich et al., 2001). Elle est le plus souvent associée à une mutation dans le gène adjacent *mexZ* ou sa région promotrice chevauchante avec l'opéron *mexXY* (Matsuo et al., 2004). Toutefois, les travaux de thèse de C. Muller ont permis de montrer le rôle du système à deux composants, ParRS dans la régulation d'au moins trois mécanismes de résistance aux antibiotiques, dont l'augmentation de l'efflux MexXY(OprM). En plus d'activer l'expression de l'opéron *mexXY*, ParRS est capable de réprimer celle du gène codant la porine OprD, responsable de la résistance aux carbapénèmes et d'activer celle du large opéron *arn* responsable de la modification du LPS, et par conséquent de la résistance aux polymyxines (Muller et al., 2011). Les mutants cliniques présentant une mutation dans le senseur histidine kinase ParS ou le régulateur de réponse ParR sont ainsi résistants à au moins quatre familles d'antibiotiques ( $\beta$ -lactamines, fluoroquinolones, aminosides et polymyxines) (Muller et al., 2011). Dans la continuité des travaux réalisés au laboratoire, la première partie de mes travaux de thèse visaient à mieux comprendre le rôle du S2C ParRS ainsi que de trois autres S2C dans la résistance à la colistine. En effet, les enzymes responsables de la synthèse et du transport des molécules de Ara4N sont codées par l'opéron de 8 gènes *arn*, dont l'expression est activée directement ou indirectement par quatre S2C à savoir ParRS, PhoPQ, CprRS et PmrAB. Seules les protéines senseurs PmrB, ParS



et CprS, par le biais d'un domaine périplasmique, sont capables de percevoir la présence de polymyxines dans le milieu de culture et de s'autophosphoryler (Fernández et al., 2010) (Fernández et al., 2012) (Muller et al., 2011) (McPhee et al., 2003). Comme les polymyxines (colistine et polymyxine B), certains peptides antimicrobiens (PAM) comme CP28, CP26, Bac2, la pleurocidine, CRAMP (*cathelin-related antimicrobial peptide*), HHC36, HH17 et IDR-1018 sont capables d'activer les trois S2C, tandis que d'autres PAMs comme CP10A, CP28, HH2, IDR-1002, IDR-1012, IDR1010 et HH18 sont capables d'activer spécifiquement ParRS ou CprRS. En effet, il semble que les protéines senseurs ParS et CprS reconnaissent des PAMs de différentes structures ou des PAMS possédant des effets différents sur la cellule. La surexpression de l'opéron *arn* et la modification consécutive du lipide A, résultant de l'activation des S2C, permet ainsi à la bactérie de se protéger contre les PAMs.

Afin d'identifier le rôle des S2C chez *P. aeruginosa* lors d'une exposition à la colistine, différents mutants de délétion ont été obtenus par recombinaison homologue, en utilisant le vecteur suicide pKNG101 (PAO1*lux-ΔparRS*, PAO1*lux-ΔpmrAB*, PAO1*lux-ΔcprRS*, PAO1*lux-ΔphoPQ*, PAO1*lux-Δarn*, PAO1*lux-ΔparRS-pmrAB*, PAO1*lux-ΔparRS-pmrAB-phoPQ-cprRS*, PAO1*lux-ΔparRS-ΔpmrAB-phoPQ-cprRS-arn*). Pour faciliter le dénombrement des bactéries vivantes *in vitro*, nous avons inséré une copie de l'opéron *luxCDABE* dans le site *attTn7* du génome de la souche PAO1 et de ses mutants. La comparaison des mesures de bioluminescence avec les dénombrements bactériens sur boîte a permis d'établir une bonne corrélation entre les deux méthodes et un seuil de détection par bioluminescence d'environ  $5.10^4$  UFC/mL. En dessous de  $5.10^4$  UFC/mL, les bactéries ont été dénombrées par étalement sur boîte. La bioluminescence a donc été utilisée pour mesurer l'effet bactéricide de la colistine à différentes concentrations et avec différents inocula bactériens, dont certains

s'approchent de la quantité de bactéries retrouvée chez un patient lors d'une infection pulmonaire ( $10^6$  UFC/mL). Contrairement à nos attentes, parmi tous les S2C impliqués dans la résistance à la colistine, seule la délétion de l'opéron *parRS* chez la souche sauvage conduisait à une augmentation significative ( $-3 \log_{10}$ ) de l'effet bactéricide de la colistine, indiquant un rôle majeur de ce S2C dans la protection de la bactérie contre cet antibiotique.

Afin de mieux comprendre ce phénomène, nous avons inactivé les gènes du régulon de ParR identifiés par C. Muller en 2011. Nous avons ainsi démontré que l'effet bactéricide plus élevé de la colistine, observé suite la délétion de l'opéron *parRS*, était en partie associé à l'activité des enzymes codées par l'opéron *arn*, ainsi qu'à la pompe d'efflux MexXY(OprM). Toutefois, la délétion de l'opéron *parRS* aboutit à un nombre de bactéries mortes nettement supérieur à celui observé suite à la délétion des opérons *mexXY* et *arn* ( $-1,7 \log_{10}$  UFC/mL seulement de différence de survie entre PAO1 et PAO1 $\Delta$ *mexXY* ou PAO1 $\Delta$ *arn*, contre  $-3 \log_{10}$  pour PAO1 $\Delta$ *parRS*), suggérant la présence d'un ou plusieurs acteur(s) régulé(s) par ParRS en réponse à une exposition à la colistine. Afin d'identifier les gènes potentiellement dépendants de ParR, nous souhaitons comparer les données transcriptomiques de la souche PA14 et de son mutant PA14 $\Delta$ *parRS*, cultivés en présence de colistine.

Nous avons choisi pour la suite de nos travaux de remplacer la souche de référence PAO1 par la souche PA14 (Lee et al., 2006). En effet, un travail antérieur a révélé que la souche PAO1, contrairement aux souches de référence PA14 et PAK et aux souches cliniques, présentait un codon stop prématuré dans la séquence du gène *cprA* conduisant à la synthèse d'un peptide non fonctionnel (Gutu et al., 2015). Etant donné que la protéine CprA participe à la résistance à la colistine et que son expression est dépendante des S2C PmrAB, ParRS et

CprRS, les expériences sur la souche PAO1 seront abandonnées. A partir des données transcriptomiques, une analyse bioinformatique (homologie, syntenie, recherche de domaines fonctionnels) des gènes dépendants de ParR sera réalisée. Parallèlement, nous envisageons d'effectuer en collaboration avec le laboratoire UMR 1098 INSERM Interactions hôte-greffon-tumeur et ingénierie cellulaire et tissulaire (Dr Eric Hervouet, Faculté des Sciences de Besançon), la recherche des régions promotrices directement dépendantes de la protéine ParR selon la technologie du CHIP-Seq (Illumina). A partir de la protéine ParR précédemment purifiée au laboratoire, des anticorps monoclonaux seront produits chez la souris ou le lapin avant la réalisation de l'étape d'immunoprécipitation. L'ADN de la souche PA14 sera utilisé comme matrice pour l'interaction ADN-ParR. Les régions promotrices qui se sont fixées à ParR seront séquencées. La confrontation des données transcriptomiques et du ChIP-Seq nous permettra d'établir une liste de gènes candidats, potentiellement impliqués dans la résistance à la colistine. Ceux-ci seront inactivés chez la souche sauvage PA14, selon la stratégie maîtrisée au laboratoire, qui comprend une étape de PCR chevauchante suivie d'une recombinaison homologe utilisant le vecteur pKNG101 (Kaniga et al., 1991). La cinétique de bactéricidie de la colistine sera alors étudiée par luminométrie grâce à la fusion transcriptionnelle *plac::luxCDABE* insérée dans le chromosome du mutant et dans la souche sauvage au niveau du site *attTn7* (Choi et al., 2006).

Compte tenu du rôle du système d'efflux MexXY(OprM) dans la résistance adaptative aux polymyxines, nous avons évalué sa contribution dans la résistance acquise chez *P. aeruginosa*. Ainsi, nous avons supprimé l'opéron *mexXY* chez deux souches cliniques et chez deux mutants sélectionnés *in vitro*, devenus résistants à la colistine suite à l'altération du S2C PmrAB. Contre toute attente, la délétion de l'opéron *mexXY* chez ces souches a

conduit à une forte diminution de la résistance à la colistine (CMI de 128 à 8 mg/L), tandis que la délétion de l'opéron chez la souche sauvage ne modifiait pas la CMI de la colistine (0,5 mg/L). Bien que la CMI de la colistine soit fortement diminuée (16 fois) par l'inactivation de MexXY, le phénotype sauvage n'était pas restauré. Seule la délétion de l'opéron *arn* aboutissait à une restauration complète du phénotype sauvage. La complémentation respective des mutants PAO1 $\Delta$ *mexXY* et PAO1 $\Delta$ *arn* par les plasmides comprenant les opérons *arn* (pAKarn) et *mexXY* (pAGH97) clonés sous la dépendance d'un promoteur fort a révélé que le système d'efflux MexXY(OprM) n'était pas suffisant pour conférer une résistance à la colistine, contrairement à l'addition d'Ara4N sur le lipide A. Toutefois, il contribue à augmenter les niveaux de résistance à la colistine chez une souche qui produit de l'Ara4N. Ainsi, la pompe serait plus efficace pour exporter des composés contribuant à la résistance à la colistine lorsque l'imperméabilité membranaire est augmentée suite à l'addition d'Ara4N. En accord avec cette hypothèse, la perméabilité membranaire mesurée par fluorimétrie à l'aide de la sonde N-phényl-1-naphthylamine (NPN) était plus importante chez le mutant PAO1 $\Delta$ *arn* que chez la souche sauvage PAO1 en présence de colistine. De façon intéressante, la délétion de l'opéron *mexXY* aboutissait à une augmentation de la perméabilité membranaire équivalente à celle mesurée chez le mutant PAO1 $\Delta$ *arn*. Ces données suggèrent que les molécules exportées par le système MexXY/OprM modifient la perméabilité de la membrane bactérienne.

Des travaux chez *Neisseria gonorrhoeae* ont mis en évidence que la pompe d'efflux RND MtrCDE était capable de prendre en charge des PAM tels que la protégrine-1, la LL-37 et la tachyplésine-1 (Shafer et al., 1998) (Handing et al., 2018). Chez *Klebsiella pneumoniae*, la souche privée du transporteur AcrB, constituant de la pompe RND AcrAB-TolC, était 2 fois

plus sensible à la polymyxine B et à trois PAM ( $\beta$ -défensines 1 et 2 et HNP-1 (défensine issue des neutrophiles)) dans un modèle d'infection pulmonaire aiguë chez la souris, par comparaison avec la souche sauvage (Padilla et al., 2010). Ainsi, le système MexXY(OprM) pourrait exporter la colistine. Afin de vérifier cette hypothèse, nous nous proposons d'évaluer l'accumulation membranaire de colistine fluorescente chez la souche PA14 et chez ses divers mutants (PA14(pAKarn), PA14(pAGH97), PA14 $\Delta$ mexXY, PA14 $\Delta$ mexXY(pAKarn), PA14 $\Delta$ arn(pAGH97)). Deux nouvelles sondes fluorescentes FADDI-285 et FADDI-286 qui ne modifient pas les propriétés antibactériennes de la polymyxine B ont été décrites (Yun et al., 2017). Le fluorophore, la dansylglycine-octanylglycine, a été substitué à la chaîne d'acide gras à l'extrémité N-terminale de la polymyxine B. Ainsi, la présence de la colistine fluorescente sera détectée par spectrofluorométrie.

S'il s'avérait que la pompe MexXY(OprM) ne soit pas capable d'effluer directement les polymyxines, elle pourrait exporter des molécules chargées positivement et dont le rôle serait de protéger la membrane externe de l'interaction avec les polymyxines. Afin de déterminer la charge électrostatique nette de la surface bactérienne, nous souhaitons mesurer le potentiel zéta chez la souche PA14, son mutant PA14 $\Delta$ mexXY et la souche complémentée PA14(pAGH97), cultivées ou non en présence de colistine. Le potentiel zéta correspond à la différence de potentiel électrique à l'interface entre le milieu liquide aqueux et la couche de fluide entourant la surface bactérienne. Les polymyxines étant des peptides polycationiques, elles interagissent avec la membrane externe (chargée négativement) par le biais d'interactions électrostatiques et modifient le potentiel zéta. Ce dernier dépend de la composition de la surface cellulaire et de la nature du milieu environnant (pH et concentration en sels notamment). De fait, les mesures de potentiel zéta seront réalisées

dans une solution tampon de phosphate de potassium (pH 7,4) pour minimiser les variations de pH (Soon et al., 2011).

Le système MexXY(OprM) pourrait également transporter à la surface membranaire des molécules chargées positivement, afin de diminuer l'interaction du LPS avec les polymyxines. Des travaux issus d'une même équipe ont indiqué que la présence de spermidine (molécule cationique) à la surface membranaire de *P. aeruginosa* contribuait à la résistance à la colistine (Kwon and Lu, 2006) (Johnson et al., 2012). La spermidine serait, selon les auteurs, synthétisée par un cluster fonctionnel de trois gènes, PA4773-4774-4775, dont l'expression est dépendante du régulateur PmrB. La suppression de chacun de ces gènes a conduit à une augmentation de l'effet bactéricide de la colistine, équivalente à celle observée chez les mutants PAO1Δ*mexXY* et PAO1Δ*arn*. Toutefois, l'addition de spermidine ou de norspermidine dans le milieu de culture du mutant PAO1ΔPA4774 n'a pas permis de modifier le profil bactéricide de la colistine, suggérant que ce locus génétique est impliqué dans la synthèse d'autres molécules de nature probablement cationique. Des travaux réalisés au laboratoire pendant la thèse d'A. Bolard sur cet opéron ont montré qu'il était impliqué dans la synthèse de norspermidine, une triamine impliquée dans la résistance aux aminosides mais pas aux polymyxines (Bolard et al., 2019). Afin d'évaluer la présence de polyamines (molécules cationiques) à la surface bactérienne, nous souhaitons mesurer en par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-ESI-MS), la présence de spermidine, de cadavérine, de putrescine, de 1-3 diaminopropane, de norspermidine, et de spermine chez la souche sauvage PA14, le mutant PA14Δ*mexXY* et son mutant complété par l'opéron *mexXY*, PA14Δ*mexXY*(pAGH97), cultivé en présence de colistine. Pour identifier les composés exportés par MexXY(OprM) chez les souches résistantes,

plusieurs stratégies sont également envisagées. Tout d'abord, la séparation des constituants de surface membranaire par ultracentrifugation en gradient de saccharose sera effectuée chez un mutant résistant à la colistine, et des fractions de culture seront testées pour leur capacité à protéger une souche sensible. La comparaison des constituants de la surface bactérienne par chromatographie sur couche mince des souches PA14(pAKarn) et PA14Δ*mexXY*(pAKarn) sera réalisée. Enfin, nous nous proposons de comparer par spectrométrie de masse les spectres des surnageants de culture des souches PA14(pAKarn) et PA14Δ*mexXY*(pAKarn). Pour faciliter l'identification des molécules exportées, les bactéries seront cultivées dans un milieu minimum dont la composition est maîtrisée. Nous pensons ainsi pouvoir identifier les composés exportés par la pompe MexXY(OprM) permettant de protéger la surface bactérienne de *P. aeruginosa* de l'action des polymyxines.

En conclusion, le système d'efflux MexXY(OprM) doit être considéré comme un des éléments clés de la résistance aux polymyxines chez *P. aeruginosa*. En effet, nous avons montré que chez les isolats cliniques, notamment les mutants dont la protéine PmrB est mutée et rendue constitutivement active, le système participe à la résistance de haut niveau à la colistine. L'inactivation du système MexXY(OprM) permet de restaurer des niveaux de résistance proches des concentrations critiques définies par l'EUCAST ou le CLSI ( $CMI \leq 4$  mg/L), suggérant que l'utilisation d'inhibiteurs d'efflux permettrait d'améliorer l'efficacité thérapeutique des polymyxines. Il faut signaler que des inhibiteurs de la pompe MexXY(OprM) ont été développés par des compagnies pharmaceutiques mais ne sont pas commercialisés à ce jour pour des raisons de toxicité, ce qui n'exclut pas que des molécules moins toxiques ne puissent être mises au point dans un avenir proche. L'utilisation de ces

inhibiteurs d'efflux permettrait de re-sensibiliser les souches résistantes aux aminosides, aux  $\beta$ -lactamines et aux polymyxines.

### **Les systèmes d'efflux actif chez *P. putida*.**

La seconde partie de ma thèse consistait à évaluer la contribution des systèmes d'efflux actif de type RND à la résistance aux antibiotiques utilisés chez l'Homme chez *P. putida*. Si les systèmes RND ont fait l'objet de nombreuses études pour leur participation à la tolérance aux hydrocarbures aromatiques comme le toluène chez les souches environnementales (Ramos et al., 2002), leur rôle dans la résistance aux antibiotiques chez les souches cliniques de *P. putida* n'a pas été déterminé. Bien que l'identification des souches cliniques de *P. putida* soit nettement moins fréquente que celle des souches de *P. aeruginosa*, leur éradication chez les patients immunodéprimés n'est pas moins importante (Bouallègue et al., 2004) (Lombardi et al., 2002) (Yoshino et al., 2011). Ce travail, nous a permis d'identifier, à partir de la souche de référence KT2440 cultivée sur un milieu additionné de ticarcilline, deux types de mutants, HPG-1 et HPG-5. Le premier, HPG-1, présentait une substitution A19V dans le régulateur transcriptionnel local TtgR, causant la surproduction du système d'efflux TtgABC. La caractérisation du mutant HPG-1 nous a permis de définir les substrats antibiotiques de ce système et de déterminer son rôle dans la résistance aux antibiotiques. Homologue des systèmes d'efflux MexAB-OprM chez *P. aeruginosa* (78,4% d'identité de séquence pour les transporteurs RND), AdeIJK chez *A. baumannii* (78,3%), AcrAB-TolC chez *E. coli* (67,8%), ce système participe à la résistance naturelle des  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipénème, et des fluoroquinolones. Contrairement à MexAB-OprM qui contribue à bas niveau (2 à 4 fois) à la résistance naturelle et acquise à ces substrats antibiotiques, la pompe



TtgABC participe activement à l'efflux des  $\beta$ -lactamines comme l'indique le tableau 1 de l'article en préparation (chapitre 2.1). Il est intéressant de noter que la souche sauvage KT2440 est naturellement résistante à la ticarcilline (MIC >16 mg/L) selon les concentrations critiques définies par l'EUCAST 2020 (EUCAST, 2020). La délétion de *ttgABC* chez la souche KT2440 permet de restaurer la sensibilité à la ticarcilline (64 fois moins). L'augmentation de l'efflux des  $\beta$ -lactamines suite à la surproduction de TtgABC a pour conséquence un changement de catégorisation (Sensible à Résistant) du mutant à la pipéracilline et à l'aztréonam. Par ailleurs, les molécules fréquemment utilisées pour le traitement des infections à *P. putida*, comme la ceftazidime ou le méropénème ont des valeurs de CMI équivalentes à celles des concentrations critiques (EUCAST, 2020). Ces données montrent que l'efflux peut chez certaines espèces avoir un rôle majeur dans la résistance aux antibiotiques. Afin d'évaluer la fréquence de ce type de mutant chez les isolats cliniques de *P. putida*, nous avons débuté la mesure des niveaux d'expression des systèmes TtgABC et ParXY/TtgC chez une collection de souches cliniques résistantes à haut niveau (CMI  $\geq$  256 mg/L) à la ticarcilline. Les premiers résultats suggèrent que le système TtgABC est fréquemment surproduit chez les isolats cliniques (24,4 %). Etant donné que la majorité de ces souches produit également des enzymes hydrolysant les  $\beta$ -lactamines (oxacillinasés, BLSE et/ou carbapénémases), l'inactivation de la pompe chez certaines d'entre elles sera nécessaire pour évaluer sa contribution à la résistance aux  $\beta$ -lactamines.

L'analyse du second mutant, HPG-5, nous a permis de mieux comprendre le rôle joué par un nouveau système d'efflux de la famille RND dans la résistance naturelle aux aminosides, et la résistance acquise au céfépime, aux macrolides, aux fluoroquinolones et aux aminosides chez *P. putida*. Bien que l'analyse *in silico* de la séquence protéique du

système ParXY(TtgC) nous indique une plus forte similarité de séquence avec le système MexCD-OprJ de *P. aeruginosa* (60,9% de similarité entre les transporteurs RND ParY et MexD), la nature de ses substrats antibiotiques le relie plus volontiers à la pompe MexXY(OprM). A notre surprise, nous avons constaté que les acides aminés D133 et Y613 proposés par Lau et ses collaborateurs pour être des sites de capture des aminosides au niveau de l'espace périplasmique des monomères de AmrB chez *Burkholderia pseudomallei*, de AxyY chez *Achromobacter xylosoxidans* et de MexY chez *P. aeruginosa* étaient absents de la séquence de ParY (Lau et al., 2014). L'alignement des séquences protéiques des transporteurs RND capables de prendre en charge les aminosides a révélé que d'autres résidus étaient communs, notamment les résidus E311 (domaine PN2), et E592 (domaine PC2) à ces pompes et absents de celles exportant d'autres familles d'antibiotiques. La mutagenèse dirigée de ces résidus chez la souche KT2440 permettra de déterminer le rôle de ces acides aminés dans la sensibilité aux aminosides et aux autres substrats de la pompe.

Comme les systèmes d'efflux MexXY chez *P. aeruginosa* (Muller et al., 2011), AdeABC chez *A. baumannii* (Marchand et al., 2004) et SmeYZ chez *Stenotrophomonas maltophilia* (Wu et al., 2016) , nous avons montré que l'opéron *parXY* est sous le contrôle positif d'un système de régulation à deux composants dit « classique ». Codé par un opéron adjacent à celui du système ParXY, ParRS est capable d'activer l'expression des opérons *parXY* et *ttgABC*, participant ainsi à l'adaptation de *P. putida* à pas moins de trois classes d'antibiotiques (aminosides, fluoroquinolones, et  $\beta$ -lactamines). Par ailleurs, nous avons montré que le régulateur de réponse ParR régule négativement l'expression d'un troisième système d'efflux RND, PP\_2817-PP\_2818-PP\_2819, annoté *mexCD-oprJ* dans le génome de la souche KT2440 (Nelson et al., 2002) , mais qui ne semble pas impliqué dans la résistance aux

antibiotiques testés dans l'étude. En effet, la délétion des gènes *ttgAB* et *parXY* avait un effet identique à celle des gènes du senseur *parS* ou du régulateur *parR* sur les niveaux de sensibilité aux antibiotiques testés chez le mutant HPG-5. Ce système possède un environnement génique similaire à celui observé chez son proche voisin *P. aeruginosa*. Ainsi, l'opéron *mexCD-oprJ* est entouré par deux régulateurs transcriptionnels annotés *nfxC* et PP\_2816 chez la souche KT2440 (Winsor et al., 2016). Chez *P. aeruginosa*, le produit du gène *nfxC* réprime l'expression du gène *escR* (homologue de PP\_2816) qui à son tour réprime l'opéron *mexCD-oprJ* dans des conditions standards de culture (Purssell et al., 2015). En présence d'un agent induisant un stress de membrane comme la chlorhexidine, le triclosan, ou encore des hydrocarbures aromatiques dans le milieu de culture, le système MexCD-OprJ est fortement activé chez la souche PAO1 (Morita et al., 2001a). Lorsqu'il est activé chez *P. aeruginosa*, MexCD-OprJ est responsable d'une augmentation de la résistance aux fluoroquinolones, aux céphalosporines zwitterioniques (céfépime, céfpirome) et d'une diminution de la sensibilité à la ticarcilline, au méropénème et aux aminosides (Srikumar et al., 1997) (Chuanchuen et al., 2001) (Jeannot et al., 2008). Ainsi, le système PP\_2817-PP\_2818-PP\_2819 semble sous le contrôle d'au moins trois répresseurs transcriptionnels, NfxC, EscR et ParR. La caractérisation de cet homologue à MexCD-OprJ pourra faire l'objet d'un prochain projet d'étude.

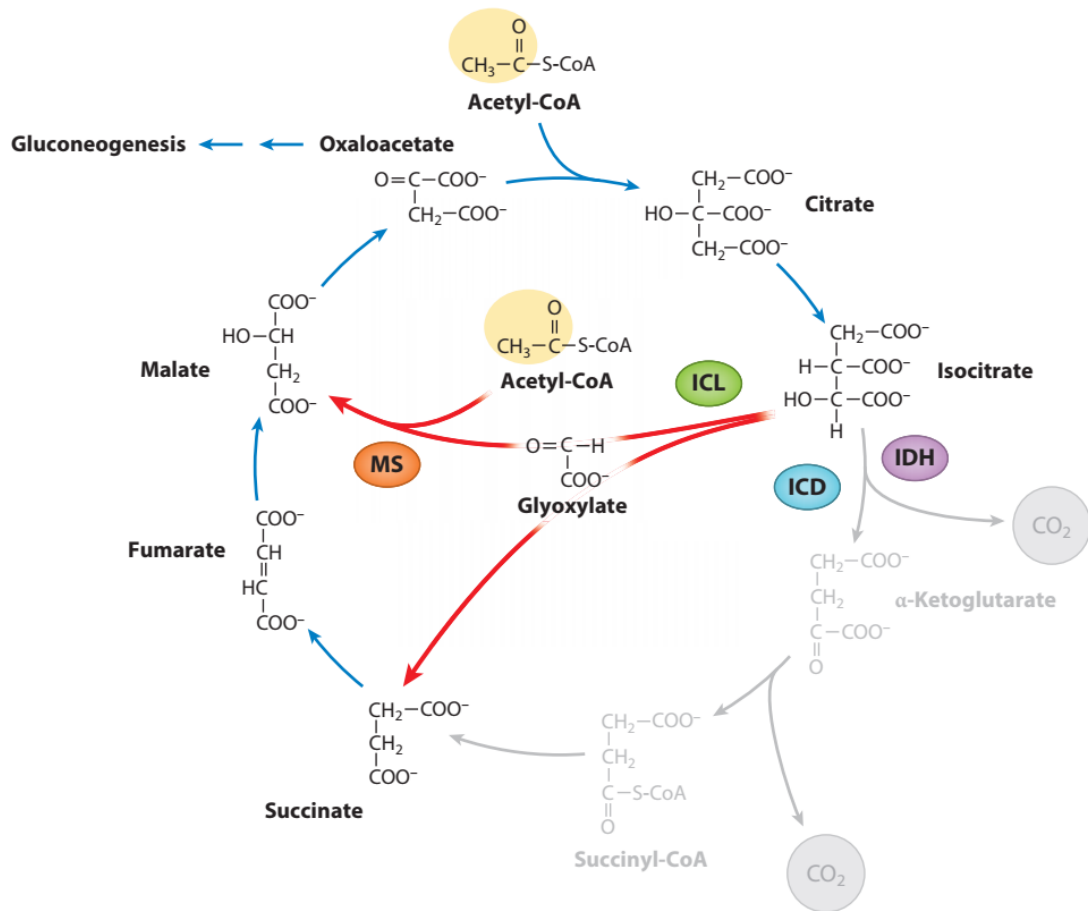
L'analyse bio-informatique des régions promotrices des opérons codant pour les trois pompes TtgABC, ParXY(TtgC) et PP\_2817-PP\_2818-PP\_2819, ne nous a pas permis de mettre en évidence un motif commun de reconnaissance de la protéine ParR. C'est pourquoi, nous souhaitons rechercher les régions promotrices directement dépendantes de la protéine ParR selon la technologie du ChIP-Seq (Illumina). La protéine ParR de la souche KT2440 sera

purifiée avant la production d'anticorps monoclonaux nécessaire à l'étape d'immunoprécipitation. L'ADN de la souche KT2440 sera utilisé comme matrice pour l'interaction ADN-ParR. Les régions promotrices qui se sont fixées à ParR seront séquencées. Parallèlement, à partir de la protéine ParR purifiée, des expériences de retard sur gel en présence des trois régions promotrices des pompes d'efflux seront réalisés afin de visualiser une éventuelle interaction directe de ParR sur ces régions génomiques.

Contre toute attente, nous avons constaté que l'autophosphorylation du senseur était induite suite à l'inactivation chez le mutant HPG-5 de la succinyl-CoA synthétase, une enzyme impliquée dans la synthèse du succinate dans le cycle de Krebs. L'absence de cette enzyme clé engendre une perturbation importante du métabolisme énergétique de la bactérie. En effet, nous avons mesuré un retard de croissance significatif du mutant HPG-5 cultivé dans un milieu de culture de Mueller Hinton à 37°C par comparaison avec la souche KT2440. Précédemment, un travail réalisé à partir d'une banque d'insertion du mini-transposon Tn5 chez la souche de *P. aeruginosa* PAO1 sélectionnée sur un milieu contenant de la tobramycine (0,5 mg/L) avait identifié un mutant résistant à bas niveau à la tobramycine (2 fois la CMI) dont le gène *sucC*, codant pour la sous-unité  $\beta$  de la succinyl-CoA synthétase était inactivé (Schurek et al., 2008). Nos résultats montrent que l'inactivation de l'enzyme chez les deux souches de référence de *P. aeruginosa* (PAO1 et PA14) conduisait à une diminution isolée de la sensibilité à la tobramycine. Celle-ci était indépendante d'une augmentation de l'efflux des systèmes MexAB-OprM et MexXY/OprM suggérant que l'inactivation de la succinyl-CoA synthétase entraîne une réponse différente chez ces deux espèces pourtant phylogénétiquement proches.

Il est intéressant de noter que la pénétration des aminosides dans la bactérie est dépendante de la force proton-motrice (PMF) qui est associée à la respiration cellulaire (chaîne de transfert des électrons), elle-même en lien avec le fonctionnement du cycle de Krebs (Bryan and Kwan, 1983) (Taber et al., 1987). Ainsi, la PMF est influencée par les conditions environnementales comme l'atmosphère de croissance ou encore une carence en nutriments. Un travail récent réalisé chez *P. aeruginosa* (PAO1) a montré que l'addition de fumarate (15 mM) dans le milieu culture améliorait l'activité de la tobramycine tandis que celle du glyoxylate (30 mM) favorisait la tolérance à cette molécule (320 mg/L) (Meylan et al., 2017). L'inhibition de la respiration cellulaire suite à l'activation de la voie du shunt du glyoxylate était responsable de la tolérance à la tobramycine. Le shunt du glyoxylate est une voie métabolique alternative au cycle de Krebs constituée de deux étapes (isocitrate lyase, *aceA* ; et malate synthase, *glcB*) (Dolan and Welch, 2018) (Figure 32). En passant outre les étapes de décarboxylation, la bactérie conserve le même nombre d'atome de carbone pour la néoglucogenèse au détriment de la formation de NADH et de FADH<sub>2</sub> nécessaire à la chaîne de transfert des électrons (Dolan and Welch, 2018). Bien que la production d'énergie soit diminuée, elle était suffisante pour maintenir la PMF chez la souche cultivée en présence de glyoxylate exposée à la tobramycine mais insuffisante pour maintenir les processus conduisant à la mort bactérienne (Meylan et al., 2017).

Les données de RT-qPCR chez le mutant HPG-5 indiquaient une forte expression des gènes *aceA* et *glcB* codant pour les enzymes impliquées dans le shunt du glyoxylate indiquant son activation chez le mutant HPG-5 (Puja *et al*, en préparation). En accord avec les profils métaboliques observés par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) chez la souche PAO1 cultivée en présence de glyoxylate (Meylan et al., 2017), nous



**Figure 32. Représentation du cycle de Krebs et du shunt du glyoxylate.** Les flèches en bleu représentent la voie conservée entre le cycle de Krebs et le shunt du glyoxylate, et en rouge la voie spécifique du shunt du glyoxylate. Les trois réactions grisées représentent les réactions court-circuitées lorsque le shunt du glyoxylate est privilégié. MS : malate synthase ; ICL : isocitrate lyase ; ICD : isocitrate déshydrogénase ; IDH : isocitrate déshydrogénase monomérique. Dolan and Welch,

avons également constaté une forte expression du gène *icd* dont le produit est responsable de la décarboxylation oxydative de l'isocitrate (isocitrate deshydrogénase) pour former de l' $\alpha$ -cétoglutarate (ou 2-oxoglutarate). Ainsi, une accumulation de cet intermédiaire essentiel du cycle de Krebs semble probable chez le mutant HPG-5. Afin de confirmer cette hypothèse, nous souhaitons mesurer la quantité d' $\alpha$ -cétoglutarate et de glyoxylate chez la souche KT2440 et son mutant HPG-5 par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse. L' $\alpha$ -cétoglutarate est un intermédiaire majeur à l'intersection des voies métaboliques du carbone et de l'azote (Huergo and Dixon, 2015). Son niveau intracellulaire est finement contrôlé chez la bactérie, notamment en fonction de la disponibilité en carbone et en azote. En plus de ce rôle central, il fait l'objet ces dernières années d'une attention particulière pour sa fonction de molécule signal. Ainsi, il a été montré qu'il participait à la régulation de l'AMPc chez *E. coli* (Huergo and Dixon, 2015) et pouvait être le signal de différentes protéines senseurs dont KguS, l'histidine kinase du système à deux composants KguS/KguR chez *E. coli*. Ce S2C est localisé sur un îlot de pathogénicité associé aux souches uropathogènes de *E. coli* (Cai et al., 2013) et régule la transcription de gènes impliqués dans l'utilisation d' $\alpha$ -cétoglutarate extracellulaire comme une source de carbone en anaérobiose (Cai et al., 2013). Compte tenu de la nature encore inconnue du signal reconnu par le senseur ParS, deux stratégies seront appliquées pour détecter les molécules capables de l'activer. La première consistera à construire et à insérer dans la souche KT2440 une fusion transcriptionnelle entre la région promotrice du gène *parS* et l'opéron *luxCDABE* dans le plasmide pUC18-mini-Tn7T-Gm-*lux* (Choi et al., 2006). La luminométrie de la souche KT2440 (pUC18-mini-Tn7T-Gm-*lux::ppars*) cultivée dans un milieu minimum M9 dont la seule source de carbone favorise le shunt du glyoxylate (acétate,

alkanes, acides gras à chaîne courtes) sera mesurée. L'activation de la luminescence sera également évaluée dans un milieu complété par le glyoxylate et l' $\alpha$ -cétoglutarate, ainsi que des agents oxydants comme le paraquat connu pour induire la voie du shunt du glyoxylate (Ahn et al., 2016). Il a également été rapporté que certains antibiotiques comme l'isoniazide, la rifampicine et la streptomycine étaient capables d'activer le shunt du glyoxylate chez *Mycobacterium tuberculosis* (Nandakumar et al., 2014). Par ailleurs, les systèmes à deux composants CprRS et ParRS sont activés lorsqu'une souche de *P. aeruginosa* est exposée aux polymyxines et à certains PAM. C'est pourquoi, nous évaluerons également l'impact d'antibiotiques, de détergents, d'antiseptiques et d'hydrocarbures aromatiques de nature et de structure différents sur la bioluminescence de la souche KT2440 (pUC18-mini-Tn7T-Gm-*lux::pparS*). La seconde stratégie visera à mieux comprendre la cascade d'activation du senseur ParS. Ainsi, nous procéderons à la comparaison des transcriptomes globaux de la souche KT2440 et de son mutant HPG-5 cultivés dans un milieu Mueller Hinton. Les gènes dont l'expression sera significativement modifiée feront l'objet d'une étude plus approfondie. L'ensemble de ces résultats nous permettra de mieux comprendre la relation entre l'inactivation de la succinyl-CoA synthétase et l'induction des systèmes d'efflux actif TtgABC et ParXY(TtgC).

En conclusion, la résistance aux antibiotiques par les systèmes d'efflux actif apparaît comme un mécanisme de défense complexe contre les perturbations métaboliques de la bactérie, et les antibiotiques affectant l'intégrité de la membrane externe (polymyxines). Ces systèmes sont sous la dépendance d'un réseau complexe de régulation dont de nombreux acteurs restent à identifier et à caractériser.



## **IV. MATERIEL ET MÉTHODES**

---

## 1. Techniques de microbiologie

### 1.1 Souches bactériennes et plasmides

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés au cours de ce travail sont répertoriés dans le tableau ci-dessous (tableaux 10 et 11).

**Tableau 10. Liste des souches utilisées.** AKN<sup>R</sup> : souche résistante à l'amikacine ; CST<sup>R</sup> souche résistante à la colistine ; TIC<sup>R</sup> : souche résistante à la ticarcilline.

Souches	Description	Source
Souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	Souche sauvage de référence	(Stover et al., 2000)
PAO1:: <i>lux</i>	PAO1:: <i>attTn7</i> ( <i>P<sub>lac-lux</sub>CDABE</i> )	Thèse A. Noguès
PAO1:: <i>lux-ΔpmrAB</i>	PAO1:: <i>lux</i> délété de 1941 pb dans l'opéron <i>pmrAB</i>	Thèse A. Noguès
PAO1:: <i>lux-ΔparRS</i>	PAO1:: <i>lux</i> délété de 1814 pb dans l'opéron <i>parRS</i>	Thèse A. Noguès
PAO1:: <i>lux-ΔphoPQ</i>	PAO1:: <i>lux</i> délété de 1983 pb dans l'opéron <i>phoPQ</i>	Thèse A. Noguès
PAO1:: <i>lux-ΔcprRS</i>	PAO1:: <i>lux</i> délété de 1498 pb dans l'opéron <i>cprRS</i>	Cette étude
PAO1:: <i>lux-Δarn</i>	PAO1:: <i>lux</i> délété de 8753 pb dans l'opéron <i>arnBCADTEF-ugd</i>	Thèse A. Noguès
PAO1:: <i>lux-ΔparRS-ΔpmrAB</i>	PAO1:: <i>lux</i> délété des opérons <i>parRS</i> et <i>pmrAB</i>	Thèse A. Noguès
PAO1:: <i>lux-Δarn-ΔTCS</i>	PAO1:: <i>lux</i> délété de <i>arn</i> , <i>parRS</i> , <i>pmrAB</i> , <i>phoPQ</i> et <i>cprRS</i>	Thèse A. Noguès
PAO1Δ <i>oprD</i>	PAO1 délété de 910 pb du gène <i>oprD</i>	(Richardot et al., 2015)
PAO1ΔPA1797	PAO1 délété de 1 794 pb du gène PA1797	Thèse C. Muller
PAO1ΔPA2358	PAO1 délété de 379 pb dans le gène PA2358	Thèse C. Muller
PAO1Δ2655	PAO1 délété de 263 pb dans le gène PA2655	Thèse C. Muller
PAO1:: <i>lux-ΔPA4773</i>	PAO1:: <i>lux</i> délété de 465 pb dans le gène PA4773	(Bolard et al., 2019)
PAO1:: <i>lux-ΔPA4774</i>	PAO1:: <i>lux</i> délété de 921 pb dans le gène PA4774	(Bolard et al., 2019)
PAO1:: <i>lux-ΔPA4775</i>	PAO1:: <i>lux</i> délété de 714 pb dans le gène PA4775	(Bolard et al., 2019)
PAO1:: <i>lux-ΔmexXY</i>	PAO1:: <i>lux</i> délété de 4 185 pb dans l'opéron <i>mexXY</i>	Cette étude

PAO1:: <i>lux-ΔmexXY-Δarn</i>	PAO1:: <i>lux</i> délété des opérons <i>arn</i> et <i>mexXY</i>	Cette étude
PAO1:: <i>lux-ΔmexXY-ΔPA4773</i>	PAO1:: <i>lux</i> délété de l'opéron <i>mexXY</i> et du gène PA4773	Cette étude
PAO1:: <i>lux-ΔmexXY-ΔPA4773-Δarn</i>	PAO1:: <i>lux</i> délété des opérons <i>arn</i> et <i>mexXY</i> et du gène PA4773	Cette étude
PAOW2	Mutant spontané ParR (M59I) dérivé de la souche de PAO1 (AKN <sup>R</sup> )	(Muller et al., 2011)
PAOW2Δ <i>mexXY</i>	PAOW2 délété de l'opéron <i>mexXY</i>	Cette étude
AB8.2	Mutant spontané PmrB (V28G) dérivé de la souche PAO1 (CST <sup>R</sup> )	(Bolard et al., 2019)
AB8.2Δ <i>mexXY</i>	Mutant AB8.2 délété de l'opéron <i>mexXY</i>	(Bolard et al., 2019)
AB8.2Δ <i>arn</i>	Mutant AB8.2 délété de l'opéron <i>arn</i>	(Bolard et al., 2019)
AB16.2	Mutant spontané PmrB(ΔL172) dérivé de la souche PAO1 (CST <sup>R</sup> )	(Bolard et al., 2019)
AB16.2Δ <i>mexXY</i>	Mutant AB16.2 délété de l'opéron <i>mexXY</i>	(Bolard et al., 2019)
AB16.2Δ <i>arn</i>	Mutant AB16.2 délété de l'opéron <i>arn</i>	(Bolard et al., 2019)
2243	Mutant clinique, PmrB(Q105P) (CST <sup>R</sup> )	(Bolard et al., 2019)
2243Δ <i>mexXY</i>	Souche 2243 délétée de l'opéron <i>mexXY</i>	Cette étude
3795	Mutant clinique, PmrB(G188D) (CST <sup>R</sup> )	(Bolard et al., 2019)
3795Δ <i>mexXY</i>	Souche 3795 délétée de l'opéron <i>mexXY</i>	Cette étude
PAO1:: <i>lux-ΔalgW</i>	PAO1:: <i>lux</i> délété de 1083 pb dans le gène <i>algW</i>	Thèse A. Noguès
PAO1:: <i>lux-ΔalgWΔarn</i>	PAO1:: <i>lux</i> délété du gène <i>algW</i> et de l'opéron <i>arn</i>	Thèse A. Noguès
PAO1:: <i>lux-ΔpqsA</i>	PAO1:: <i>lux</i> délété de 1462 pb dans le gène <i>pqsA</i>	Cette étude
PAO1:: <i>lux-ΔmmsAB</i>	PAO1:: <i>lux</i> délété de 2276 pb dans l'opéron <i>mmsAB</i>	Thèse A. Noguès
<b>Souches de <i>Pseudomonas putida</i></b>		
KT2440	Souche de référence, phénotype sauvage	(Nelson et al., 2002)
KT2440Δ <i>ttgAB</i>	KT2440 délétée de 3669 pb dans l'opéron <i>ttgAB</i>	Cette étude
KT2440ΔPP3455/56	KT2440 délétée de 3712 pb dans l'opéron PP_3455-PP_3456	Cette étude
KT2440Δ <i>ttgAB</i> ΔPP3455/56	KT2440 délétée des opérons <i>ttgAB</i> et PP_3455-PP_3456	Cette étude

KT2440ΔPP3453	KT2440 délétée de 931 pb dans le gène PP_3453	Cette étude
KT2440ΔPP3454	KT2440 délétée de 297 pb dans le gène PP_3454	Cette étude
KT2440Δ <i>ttgC</i>	KT2440 délétée de 1053 pb dans le gène <i>ttgC</i>	Cette étude
HPG-1	Mutant spontané TtgR (A19V) dérivé de la souche KT2440, TIC <sup>R</sup>	Cette étude
HPG-4	Mutant spontané TtgR (E153*) dérivé de la souche KT2440, TIC <sup>R</sup>	Cette étude
HPG-5	Mutant spontané SucD (InsA278) dérivé de la souche KT2440, TIC <sup>R</sup>	Cette étude
KT2440:: <i>ttgR</i> <sub>HGP-1</sub>	Souche de référence KT2440 contenant le gène <i>ttgR</i> du mutant HPG-1.	Cette étude
KT2440:: <i>sucD</i> <sub>InsA278</sub>	Souche de référence KT2440 contenant le gène <i>sucD</i> du mutant HPG-5.	Cette étude
HPG-1Δ <i>ttgAB</i>	HPG-1 délété de 3669 pb dans l'opéron <i>ttgAB</i>	Cette étude
HPG-4Δ <i>ttgAB</i>	HPG-4 délété de 3669 pb dans l'opéron <i>ttgAB</i>	Cette étude
HPG-5Δ <i>ttgAB</i>	HPG-5 délété de 3669 pb dans l'opéron <i>ttgAB</i>	Cette étude
HPG-5ΔPP3455/56	HPG-5 délété de 3712 pb dans l'opéron PP_3455-PP_3456	Cette étude
HPG-5Δ <i>ttgAB</i> ΔPP3455/56	HPG-5 délété des opérons <i>ttgAB</i> et PP_3455-PP_3456	Cette étude
HPG-5Δ <i>ttgC</i>	HPG-5 délété de 1053 pb dans le gène <i>ttgC</i>	Cette étude
HPG-5ΔPP3454	HPG-5 délété de 297 pb dans le gène PP_3454	Cette étude

#### Souches de *Escherichia coli*

DH5α	F <sup>-</sup> Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sup>k</sup> , m <sup>k</sup> ) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ<sup>-</sup></i>	Invitrogen®
HB101	<i>supE44, hsdS20</i> (r <sup>B</sup> , m <sup>B</sup> ), <i>recA13, ara14 proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, leuB6, thi-1</i>	(Lacks and Greenberg, 1977)
CC118λpir	Δ( <i>ara-leu</i> ) <i>araD, ΔlacX74, gale, galK, phoA20, thi-1, rpsE, rpoB, argE</i> (Am), <i>recA1, λpir</i>	(Herrero et al., 1990)

**Tableau 11. Liste des plasmides utilisés.** KMN<sup>R</sup> : souche résistante à la kanamycine ; STR<sup>R</sup> : souche résistante à la streptomycine ; AMP<sup>R</sup> : souche résistante à l'ampicilline ; CAB<sup>R</sup> : souche résistante à la carbénicilline ; GMN<sup>R</sup> : souche résistante à la gentamicine.

Plasmides	Description	Source
pRK2013	Vecteur de conjugaison dérivé de pRK2, <i>mob1</i> , <i>tra1</i> , <i>colE1</i> , (KMN <sup>R</sup> )	(Ditta et al., 1980)
pKNG101	Vecteur de clonage suicide, <i>oriR6K</i> , <i>sacB</i> , <i>mobRK2</i> , (STR <sup>R</sup> )	(Kaniga et al., 1991)
pCR-Blunt	Vecteur de clonage, <i>lacZα ccdB pUC ori</i> (KMN <sup>R</sup> )	Invitrogen®
pAK1900	Vecteur de clonage et d'expression, <i>plac</i> en amont du MCS, (AMP <sup>R</sup> , CAB <sup>R</sup> )	R. Sharp, Queen's University
pAKarn	pAK1900 portant l'opéron <i>arnBCADTEF-ugd</i> en entier cloné dans un fragment HindIII/XbaI de 9 059 pb	(Bolard et al., 2019)
pAGH97	pAK1900 portant l'opéron <i>mexXY</i> et la région intergénique <i>mexX-mexZ</i> cloné dans un fragment HindIII/XbaI de 5 000 pb	(Aires et al., 1999)
pUC18-mini-Tn7T-Gm <sup>R</sup> - <i>lux</i>	Plasmide mini-Tn7 mobilisable servant de vecteur de fusion transcriptionnelle de l'opéron <i>luxCDABE</i> (GMN <sup>R</sup> , AMP <sup>R</sup> )	(Choi and Schweizer, 2006)
pUC18-mini-Tn7T-Gm <sup>R</sup> -P <sub>lac</sub> - <i>lux</i>	Plasmide mini-Tn7 surproduisant constitutivement l'opéron <i>luxCDABE</i> grâce au promoteur P <sub>lac</sub> utilisé pour la construction des bactéries luminescentes	Thèse A. Noguès
pKNGΔ <i>parRS</i>	Fragment <i>Apal/Apal</i> de 1 029 pb composé des séquences chromosomiques entourant l'opéron <i>parRS</i> , cloné dans pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	(Muller et al., 2011)
pKNGΔ <i>pmrAB</i>	Fragment <i>BamHI/Apal</i> de 1 028 pb composé des séquences chromosomiques entourant l'opéron <i>pmrAB</i> , cloné dans pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	(Muller et al., 2011)
pKNGΔ <i>cprRS</i>	Fragment <i>BamHI/Apal</i> de 1 004 pb composé des séquences chromosomiques entourant l'opéron <i>cprRS</i> , cloné dans pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	Thèse A. Noguès
pKNGΔ <i>phoPQ</i>	Fragment <i>BamHI/Apal</i> de 1 551 pb composé des séquences chromosomiques entourant l'opéron <i>phoPQ</i> , cloné dans pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	Thèse A. Noguès
pKNGΔ <i>pqsA</i>	Fragment <i>BamHI/Apal</i> de 1 291 pb composé des séquences chromosomiques entourant le gène <i>pqsA</i> , cloné dans pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	Smaltis®
pKNGΔ <i>arn</i>	Fragment <i>BamHI/Apal</i> de 1 135 pb composé des séquences chromosomiques entourant l'opéron <i>arnBCADTEF-ugd</i> , cloné dans pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	Thèse A. Noguès
pKNGΔPA1797	Fragment <i>BamHI/Apal</i> de 1 216 pb composé des séquences chromosomiques entourant le gène PA1797, cloné dans le pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	Thèse C. Muller
pKNGΔPA2358	Fragment <i>BamHI/Apal</i> de 1 285 pb composé des séquences chromosomiques entourant le gène PA2358, cloné dans le	Thèse C. Muller

	pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	
pKNGΔPA2655	Fragment BamHI/ApaI de 1 171 pb composé des séquences chromosomiques entourant le gène PA2655, cloné dans le pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	Thèse C. Muller
pKNGΔPA4773	Fragment BamHI/ApaI de 1 045 pb composé des séquences chromosomiques entourant le gène PA4773, cloné dans le pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	(Bolard et al., 2019)
pKNGΔPA4774	Fragment BamHI/ApaI de 1 070 pb composé des séquences chromosomiques entourant le gène PA4774, cloné dans le pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	(Bolard et al., 2019)
pKNGΔPA4775	Fragment BamHI/ApaI de 1 027 pb composé des séquences chromosomiques entourant le gène PA4775, cloné dans le pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	(Bolard et al., 2019)
pKNGΔ <i>mexXY</i>	Fragment BamHI/ApaI de 1 756 pb composé des séquences chromosomiques entourant l'opéron <i>mexXY</i> , cloné dans le pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	(Guénard et al., 2014)
pKNGΔ <i>algW</i>	Fragment <i>BamHI/ApaI</i> de 981 pb composé des séquences chromosomiques entourant le gène <i>algW</i> , cloné dans pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	Thèse A. Noguès
pKNGΔ <i>mmsAB</i>	Fragment <i>ApaI/ApaI</i> de 960 pb composé des séquences chromosomiques entourant l'opéron <i>mmsAB</i> , cloné dans pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	Thèse A. Noguès
pKNGΔ <i>ttgAB</i>	Fragment <i>SpeI/ApaI</i> de 842 pb composé des séquences chromosomiques entourant l'opéron <i>ttgAB</i> , cloné dans pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	Cette étude
pKNGΔ <i>parXY</i>	Fragment BamHI/ApaI de 1119 pb composé des séquences chromosomiques entourant l'opéron <i>PP_3455-56</i> , cloné dans pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	Cette étude
pKNGΔPP_3453	Fragment BamHI/ApaI de 1213 pb composé des séquences chromosomiques entourant le gène PP_3453, cloné dans pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	Cette étude
pKNGΔPP_3454	Fragment BamHI/ApaI de 1107 pb composé des séquences chromosomiques entourant le gène PP_3454, cloné dans pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	Cette étude
pKNGΔ <i>ttgC</i>	Fragment BamHI/ApaI de 1149 pb composé des séquences chromosomiques entourant le gène <i>ttgC</i> , cloné dans pKNG101 (STR <sup>R</sup> )	Cette étude
pKNG101_ mut <i>sucD</i>	Fragment BamHI/ApaI de 1200 pb contenant le gène <i>sucD</i> de la souche HPG-5	Cette étude
pKNG101_ mutPP_2561	Fragment BamHI/XbaI de 812 pb contenant le gène <i>PP_2561</i> de la souche HPG-5	Cette étude
pKNG101_ mutTtgR(G1)	Fragment BamHI/XbaI de 721 pb contenant le gène <i>ttgR</i> de la souche HPG-1	Cette étude
pKNG101_ mutTtgR(G4)	Fragment BamHI/XbaI de 721 pb contenant le gène <i>ttgR</i> de la souche HPG-4	Cette étude

## 1.2 Milieux de culture

Le milieu de culture solide et liquide Mueller-Hinton calibré (MHc) dont la concentration en ions  $Mg^{2+}$  et  $Ca^{2+}$  est calibrée (Becton Dickinson, Cockeysville, USA), le milieu solide *Pseudomonas* Isolation Agar (PIA) (Becton Dickinson) et le milieu minimum M9 ( $Na_2HPO_4$  42 mM,  $KH_2PO_4$  22 mM,  $NH_4Cl$  18,7 mM NaCl 8,6 mM) (Kaniga et al., 1991) contenant 5% de sucrose comme unique source de carbone ont été utilisés selon les besoins des expériences. Ceux-ci ont été rendus sélectifs si nécessaires par l'addition de 100 mg/L d'ampicilline, 50 mg/L de kanamycine et 50 mg/L de streptomycine (Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA) pour les souches de *E. coli*, 150 mg/L de ticarcilline (GlaxoSmithKline®, Paris, France) et 2 000 mg/L de streptomycine pour les souches de *P. aeruginosa* et 250 mg/L de ticarcilline, 2 000 mg/L et 5 000 mg/L de streptomycine pour les souches de *P. putida*.

## 1.3 Sélection des mutants de *P. putida* résistants à la ticarcilline

Les mutants spontanés résistants à la ticarcilline ont été sélectionnés *in vitro* à partir d'une culture liquide de la souche KT2440 de *P. putida*. Cent  $\mu$ l d'une suspension calibrée à  $10^9$  UFC/mL ont été déposés sur des boîtes de MHc agar supplémentées de 250 mg/L de ticarcilline et cultivées une nuit à 30°C. Les mutants résistants à la ticarcilline ont été réisolés successivement sur MHc et MHc additionnées de ticarcilline à 250 mg/L afin de vérifier la stabilité de la résistance, puis congelés à - 80°C.

## 1.4 Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

#### 1.4.1 Antibiogrammes

Les antibiogrammes ont été réalisés par la technique de diffusion en milieu gélosé. Une dilution au  $1/100^{\text{ème}}$  d'une suspension bactérienne d'opacité équivalente à 0,2 unités sur l'échelle McFarland (McF) mesurée par un néphélomètre a été déposée par inondation sur une gélose MH. La lecture des diamètres d'inhibition autour des disques pré-imprégnés d'antibiotique (Bio-Rad) a été effectuée après 18h d'incubation à 37°C pour les souches de *P. aeruginosa* et 30°C pour les souches de *P. putida*.

#### 1.4.2 Détermination de la CMI des antibiotiques

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de différents antibiotiques ont été déterminées par la méthode de dilution sériée de raison 2 en milieu liquide. Une dilution au  $1/100^{\text{ème}}$  dans du MHC d'une suspension bactérienne calibrée à 0,5 McF (concentration finale d'environ  $5 \times 10^5$  CFU/mL) a été traitée à des concentrations croissantes d'antibiotiques, de raison deux, conformément aux recommandations du CLSI (CLSI, 2017). La concentration minimale nécessaire pour inhiber la croissance bactérienne a été déterminée visuellement après 18 h d'incubation à 37°C pour les souches de *P. aeruginosa* et 30°C pour les souches de *P. putida*.

### 1.5 Mesure de la croissance bactérienne

Trente mL de MHC ont été inoculés à partir d'une suspension bactérienne préalablement cultivée une nuit à 37°C ou 30°C, et calibrés à une absorbance  $A_{600 \text{ nm}} = 0,1$ . Les bactéries ont été cultivées pendant 7h à 37°C ou 30°C sous agitation constante à 250 rpm, et l'absorbance à 600 nm a été mesurée toutes les heures.



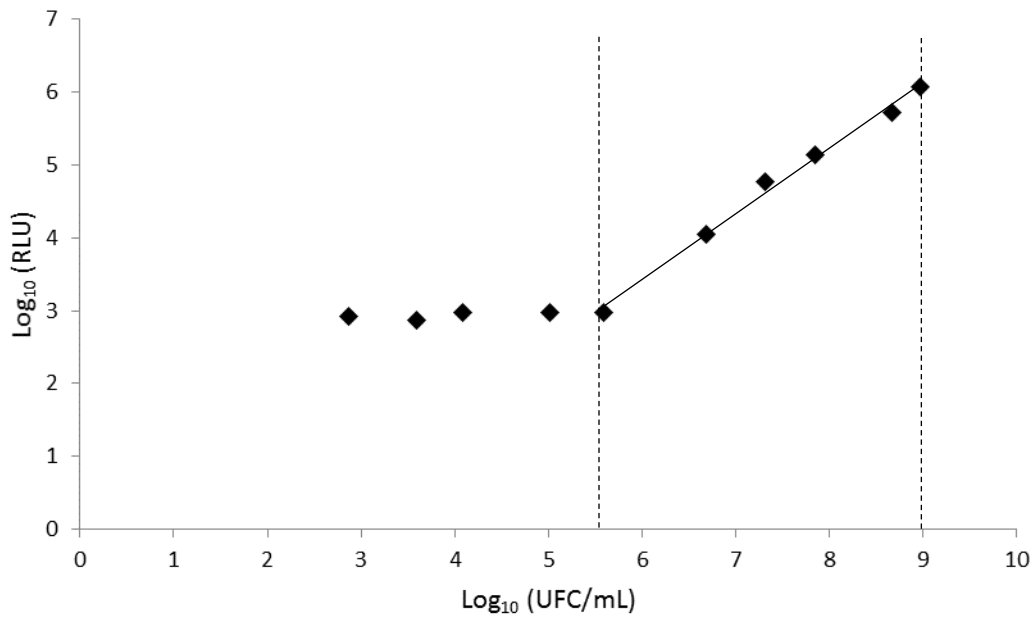
## 1.6 Mesure de l'effet bactéricide de la colistine

### 1.6.1 Corrélation entre la luminescence et la numération bactérienne

Afin d'établir une corrélation entre la luminescence mesurée en RLU (Relative Light Units) et la numération bactérienne en UFC/mL, une gamme étalon a été construite en mesurant la luminescence de dilutions successives d'une suspension bactérienne calibrée à  $10^9$  UFC/mL et la numération bactérienne obtenue sur une boîte de MHC après une nuit à 37°C. Une corrélation linéaire d'équation  $y = 0,8993x - 1,966$ , avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0,992$  a été obtenue entre  $5 \times 10^5$  UFC/mL et  $10^9$  UFC/mL (Figure 33).

### 1.6.2 Mesure de l'effet bactéricide

Une suspension bactérienne a été calibrée à une densité optique  $A_{600} = 0,1$  dans du MHC à partir de colonies isolées sur une boîte de MHC agar. Les cultures ont été incubées à 37°C sous une agitation constante de 250 rpm jusqu'à atteindre un inoculum bactérien d'environ  $3 \times 10^8$  UFC/mL (calibration à 500 000 RLU). La bioluminescence initiale est mesurée ( $T_0$ ) et après 30 min d'incubation à 37°C, la colistine a été ajoutée (entre 0,25 et 8  $\mu\text{g/mL}$ ). Puis, la bioluminescence émise a été mesurée à intervalles réguliers à l'aide d'un luminomètre Wallac 1420 Victor2 Microplate Reader (Perkin Elmer, Waltham, Etats Unis). Lorsque la quantité de bactéries vivantes était inférieure à  $5 \times 10^5$  UFC/mL, sous le seuil de détection de luminescence, l'inoculum bactérien a été déterminé par dénombrement bactérien sur boîte.



**Figure 33. Corrélation entre les unités relatives de luminescence (RLU) et le dénombrement bactérien (UFC/mL).** Entre les pointillés est indiquée la région entre  $5 \times 10^5$  et  $10^9$  UFC/mL où l'inoculum bactérien est corrélé de façon linéaire avec la luminescence ( $y = 0,8993x - 1,966$  ;  $R^2 = 0,992$ ).

Un mL de la suspension bactérienne a été étalé sur une boîte de MHC agar et le nombre de colonies a été numéré (UFC/mL) après 24h à 37°C.

### 1.6.3 Mesure de la perméabilité membranaire

La perméabilité de la membrane bactérienne a été évaluée de façon indirecte en mesurant le passage à travers la membrane externe du 1-N-phénylnaphtylamine (NPN), un composé qui fluoresce lorsqu'il est présent dans un environnement hydrophobe (Loh et al., 1984). A partir d'une culture de la nuit, 50 mL de MHC ont été inoculés à une absorbance  $A_{600} = 0,1$ . La suspension a été cultivée à 37°C sous agitation constante à 250 rpm jusqu'à une absorbance égale à 0,5 (environ  $5 \times 10^8$  UFC/mL), puis centrifugée à 4°C à une vitesse de 3500 rpm pendant 10 minutes. Les culots ont été lavés puis resuspendus dans du tampon HEPES sodium 5mM pour obtenir une absorbance égale à 2. Une fraction (200µL, soit  $5 \times 10^8$  UFC/mL) de cette suspension bactérienne a été déposée dans une plaque noire permettant la lecture de la fluorescence. La fluorescence basale a été mesurée sur le lecteur de plaque TECAN toutes les 500 ms pendant 90 s après l'injection de 10 µM de NPN à l'aide d'un injecteur (Excitation à 350 nm et émission à 420 nm). Puis, après addition de colistine à une concentration finale de 8 µg/mL, la fluorescence a été lue toutes les 500 ms pendant 90 s.

## 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 Nucleospin Microbial DNA (Machery-Nagel, Düren, Allemagne), selon le protocole recommandé par le fournisseur.

### 2.1.2 Extraction d'ADN plasmidique

La purification d'ADN plasmidique pour les opérations de clonage ou de séquençage a été effectuée au moyen du kit NucleoSpin Plasmid Miniprep (Machery-Nagel, Düren, Allemagne)

## 2.2 Amplification d'ADN par PCR

Les réactions d'amplification ont été effectuées dans un thermocycleur Biometra T3 (Biolabo Scientific Instrument, Lausanne, Suisse) ou Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, Etats Unis) en respectant les conditions spécifiées par le fournisseur. Les amorces utilisées lors de cette étude sont répertoriées dans les tableaux 12 et 13. Les amorces ont été choisies à l'aide du logiciel Primer 3 input 0.4.0 et vérifiées par PrimerBlast. Le mélange réactionnel (volume final : 50  $\mu$ L) contenait 0,5 unités d'ADN polymérase *RedTaq DNA polymerase*<sup>®</sup> (Bioline<sup>®</sup>, Londres, Royaume-Uni), 200  $\mu$ M de chaque dNTP, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ L de tampon PCR 10X, 0,5  $\mu$ M de chaque amorce et environ 100 ng d'ADN. Les conditions d'amplification ont été les suivantes : une dénaturation initiale à 95°C pendant 3 minutes, suivie de 30 cycles d'amplification composés chacun d'une dénaturation de 15 s à 95°C, une hybridation dont la température est spécifique à chaque couple d'amorce de 15s, et une élongation à 72°C pendant 30 s/kb du produit à amplifier. Une élongation finale de 5 minutes à 72°C a été réalisée en complément pour les amplicons d'une taille supérieure à 2 kb.

**Tableau 12. Liste des amorces utilisées chez *P. aeruginosa***

Nom de l'amorce	Sequence (5'-3')	Source
Oligonucleotides utilisés pour les inactivations géniques		
PCR-iphoPQA1	GCAGAACGGAGAAACACCAT	Thèse A. Noguès
PCR-iphoPQA2	GTATGCGCCAGCAGTTTCATGAGGTTTC	Thèse A. Noguès
PCR-iphoPQA3	CTGCTGGCGCATACGTTTCGCTACAGT	Thèse A. Noguès
PCR-iphoPQA4	AAGCTGATCACCAGGGTCCAC	Thèse A. Noguès
PCR-icprRSA1	CACCTGGAAGCTGTTCGATG	Thèse A. Noguès
PCR-icprRSA2	TTCATGCTGCTCTGGAACAT	Thèse A. Noguès
PCR-icprRSA3	GATGATCGCAGCTGGCGACAGACCT	Thèse A. Noguès
PCR-icprRSA4	CAGCTGCGATCATCATCGGCAACCTG	Thèse A. Noguès
PCR-ipmrABA1	TGTCGAACTGACCCAGCTAC	Thèse A. Noguès
PCR-ipmrABA2	CTCCAGGTCACCCATTCCACGGTATC	Thèse A. Noguès
PCR-ipmrABA3	GGGTGACCTGGAAGTGCAGGTGTTCCCT	Thèse A. Noguès
PCR-ipmrABA4	GTGCTGAGCTCCTCGATCTT	Thèse A. Noguès
PCR-iparRSA1	GGATTCAGCTTCTGCTCGAC	(Muller et al., 2011)
PCR-iparRSA2	AGATCTTCATAGGGTTTCATCGGTGCG	(Muller et al., 2011)
PCR-iparRSA3	CCCTATGAAGATCTTCGAACCCTTTTTCG	(Muller et al., 2011)
PCR-iparRSA4	GCGTTGATCCTGTGCTGTGTC	(Muller et al., 2011)
PCR-i2655A1	GATTGCGCCGAGGAGTTG	Thèse C. Muller
PCR-i2655A2	CCAGATCCATCGTCCAAGACCTCCTT	Thèse C. Muller
PCR-i2655A3	GACGATGGATCTGGGGGACCTACGG	Thèse C. Muller
PCR-i2655A4	GAGCAGACCAACCTGCTG	Thèse C. Muller
PCR-i2358A1	CTGGCCGAGTACTTCATCGT	Thèse C. Muller
PCR-i2358A2	GCCTGGAGTCCGCGCAACGAGATTC	Thèse C. Muller
PCR-i2358A3	GCCGGACTCCAGGCTACAAGCTGAAC	Thèse C. Muller
PCR-i2358A4	GGTGATCGCCTGGAAGAAG	Thèse C. Muller
PCR-i1797A1	CTGGCTGGATAGCGTCTG	Thèse C. Muller
PCR-i1797A2	ACTCCTTGAAAGATGCATTGCACGAAA	Thèse C. Muller
PCR-i1797A3	ATCTTTCAAGGAGTCCCATGAGAAG	Thèse C. Muller
PCR-i1797A4	CGGGTCCGTATATGCAGTCT	Thèse C. Muller
PCR-ioprDA1	CAATTTGTGCACGGAGTTTG	Thèse C. Richardot
PCR-ioprDA2	CAGGTCGTGTCTTCGATGAACCCCTTC	Thèse C. Richardot
PCR-ioprDA3	GAAGACACGACCTGAACCTAGCCTCCT	Thèse C. Richardot
PCR-ioprDA4	GGGGTGTTCGAGAGTAA	Thèse C. Richardot
PCR-imexXYA1	CCAGCAACAGGTAGGGAGAA	Thèse C. Muller
PCR-imexXYA2	GCGGTACCAGGAATAGGGCGACCAG	Thèse C. Muller

PCR-imexXYA3	ATTCCTGGTACCGCTGTTCTTCCTGGT	Thèse C. Muller
PCR-imexXYA4	CAACGCCCGGAAGTTCTC	Thèse C. Muller
PCR-iPP4773A1	GTATCCACCAGCCGTACCTG	(Bolard et al., 2019)
PCR-iPP4773A2	ATCCATCACGGTTGAATTGCCATGAAG	(Bolard et al., 2019)
PCR-iPP4773A3	CAACCGTGATGGATACGCCGATCGAA	(Bolard et al., 2019)
PCR-iPP4773A4	GTCGAGATCGACCATCACC	(Bolard et al., 2019)
PCR-iPP4774A1	CAGTGGATCGAGGAAAGCAT	(Bolard et al., 2019)
PCR-iPP4774A2	ATCCGGCTCCGGCGGATAGAAATAGAA	(Bolard et al., 2019)
PCR-iPP4774A3	CGCCGGAGCCGGATATCGAGGAGATCG	(Bolard et al., 2019)
PCR-iPP4774A4	GGGTTGCCGATGACCAG	(Bolard et al., 2019)
PCR-iPP4775A1	GGCTCTCTATACCCGCCAGT	(Bolard et al., 2019)
PCR-iPP4775A2	TCCTGCACGGACATCTTCAGGTCTC	(Bolard et al., 2019)
PCR-iPP4775A3	ATGTCCGTGCAGGACCTCTACGAACTG	(Bolard et al., 2019)
PCR-iPP4775A4	GGCTTGGTCAGGTAGTCGTC	(Bolard et al., 2019)
PCR-iarnA1	AGATCATCGAGGTGCAGTCC	Thèse A. Noguès
PCR-iarnA2	TGCGAGGGGAGAATGGCAGAAAGTCCA	Thèse A. Noguès
PCR-iarnA3	ATTCTCCCCTCGCACAGGAAGATGG	Thèse A. Noguès
PCR-iarnA4	TGTGCTTCATCTCCGAAGG	Thèse A. Noguès
PCR-ialgWA1	ATCGTTGTTTCAGCAGGGTCT	Thèse A. Noguès
PCR-ialgWA2	GATCACTGGGGTTGTGCTGGATGAT	Thèse A. Noguès
PCR-ialgWA3	CAACCCAGTGATCCCCGTCATTGAAA	Thèse A. Noguès
PCR-ialgWA4	AGCGGATCAAGAACAGCTTC	Thèse A. Noguès
PCR-ipqsAA1	TACGCAATGGGATTTCAACA	(Hong et al., 2019)
PCR-ipqsAA2	CAACATGTGGCCCCGATAGTGATAAAC	(Hong et al., 2019)
PCR-ipqsAA3	GGGGCCACATGTTGATTCAGGCTGTGG	(Hong et al., 2019)
PCR-ipqsAA4	AGGTTGAGGTGTCCCTTGAC	(Hong et al., 2019)

#### Oligonucleotides utilisés pour la RTq-PCR

uvrD-RT-1	CACGCCTCGCCCTACAGCA	(Muller et al., 2011)
uvrD-RT-2	GGATCTGGAAGTTCTGCTCAGC	(Muller et al., 2011)
arnA-RT-1	GTGGCTCGAATACCATGTGA	(Muller et al., 2011)
arnA-RT-2	TGCCGTATTTACGCAGTAG	(Puja et al., 2020)
mexY-RT-1	TTACCTCCTCCAGCGGC	(Puja et al., 2020)
mexY-RT-2	GTGAGGCGGGCGTTGTG	(Puja et al., 2020)
PA4773-RT-1	CAGTGGATCGAGGAAAGCAT	(Puja et al., 2020)
PA4773-RT-2	GTACTCCGGCCAGGTATGG	(Puja et al., 2020)
pmrB-RT1	ACGAACTCAACCTCTGCTG	(Puja et al., 2020)
pmrB-RT2	ATCTGCTCCATCAAGGTGCT	(Puja et al., 2020)

#### Oligonucleotides utilisés pour la construction du plasmide *placluxBCADE*

PlacA1	CGGACTAGTCGATTCATTAATGCAGCTGG	(Puja et al., 2020)
PlacA2	CGGGGATCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT	(Puja et al., 2020)
PTn7R	CACAGCATAACTGGACTGATTTTC	(Choi and Schweizer, 2006)
PTn7L	ATTAGCTTACGACGCTACACCC	(Choi and Schweizer, 2006)
Gm-up	TGGAGCAGCAACGATGTTAC	(Choi and Schweizer, 2006)
Gm-down	TGTTAGGTGGCGGTACTIONTGG	(Choi and Schweizer, 2006)
PglmS-up	CTGTGCGACTGCTGGAGCTGA	(Choi and Schweizer, 2006)
PglmS-down	GCACATCGGCGACGTGCTCTC	(Choi and Schweizer, 2006)

**Tableau 13. Liste des amorces utilisées chez *P. putida*.**

Nom de l'amorce	Sequence (5'-3')	Source
Oligonucleotides utilisés pour les inactivations géniques		
PCRi_ttgAB_A1	AGTACAACCTCATCTGGCCC	Cette étude
PCRi_ttgAB_A2	TACACGTCGACCTCACTGCCTTCCTTGAA	Cette étude
PCRi_ttgAB_A3	CAGTGAGGTCGACGTGTACTTCCTGGTT	Cette étude
PCRi_ttgAB_A4	GGTAGTCAGGGATCAGCGAG	Cette étude
PCRi_parXY_A1	GGCGTCTGGGTTGAAGTAAG	Cette étude
PCRi_parXY_A2	TGGCGTTCTACATCACCTGCTTGACGT	Cette étude
PCRi_parXY_A3	GTGATGTAGAACGCCATCCTGATCATCG	Cette étude
PCRi_parXY_A4	AACATGTGCAATCAACGGCT	Cette étude
PCRi_ttgC_A1	GTGCTGTTCTGTGTTCCCTGTG	Cette étude
PCRi_ttgC_A2	CATGGTTTTGTAGTCAGGGATCAGCGAGC	Cette étude
PCRi_ttgC_A3	CCTGACTACAAAACCATCCAGACGGCCTT	Cette étude
PCRi_ttgC_A4	AATAACTCTTCTGGGGCGGC	Cette étude
PCRi_PP_2561_A1	AGGTTGCAACGAAACATCCA	Cette étude
PCRi_PP_2561_A2	GCGGTGATATCCGACTTGCTGAAATTGGC	Cette étude
PCRi_PP_2561_A3	CAAGTCGGATATCACCGCCCTCAACATCA	Cette étude
PCRi_PP_2561_A4	CATGCTTGACGAACACCTGG	Cette étude
PCRi_PP_3453_A1	TGTCCAGCGGTGAGTACAAC	Cette étude
PCRi_PP_3453_A2	ATCCTGAACCCGTCTCGTAATAGCCCCAC	Cette étude
PCRi_PP_3453_A3	ACGAGACGGGTTCAAGATTGTTGCCCCG	Cette étude
PCRi_PP_3453_A4	CCTGACCGACATTCCTCAACC	Cette étude
PCRi_PP_3454_A1	GGGTAGTAGGCATGCGGATC	Cette étude
PCRi_PP_3454_A2	CCGCTGGACGGCAGCATCAGGTCAAGGAT	Cette étude
PCRi_PP_3454_A3	GATGCTGCCGTCCAGCGGTGAGTACAAC	Cette étude
PCRi_PP_3454_A4	CCGTCTCGTAATAGCCCCAC	Cette étude

Oligonucleotides utilisés pour la RTq-PCR

ADN_16S_RT1	ACGCTAATACCGCATACG	(Yao et al., 2017)
ADN_16S_RT2	CATCCTCTCAGACCAGTTAC	(Yao et al., 2017)
<i>ttgA</i> _RT1	GCCAAACGATTGCAGGC	Cette étude
<i>ttgA</i> _RT2	GCTGGATGGTGGCCATG	Cette étude
<i>parY</i> _RT1	GCCGATGTCACCCAGTCTAC	Cette étude
<i>parY</i> _RT2	GTGATCTGGTTGGTGCTGGG	Cette étude
PP_2817_RT1	CCACTGGTCAAGATCGAGGC	Cette étude
PP_2817_RT2	CGGGTCGAGTTGCTGGATAC	Cette étude
PP_3425_RT1	AACTTCGTCGACAACCAGGT	Cette étude
PP_3425_RT2	TCCTTGCCATGACCAGCAC	Cette étude
PP_3453_RT1	CGTTGCTGTTCCATCCCTGAC	Cette étude
PP_3453_RT2	CTGCTCCTCATCGCTCAAAC	Cette étude
PP_3454_RT1	CTGCCAATCCTCATGCTGAC	Cette étude
PP_3454_RT2	AGGATCAGGTGCTTGTCCAG	Cette étude
<i>ttgC</i> _RT1	CCAACGCCTACTACACCTGG	Cette étude
<i>ttgC</i> _RT2	CCAGGGTCAAGTACTCGCAG	Cette étude
PP_2561_RT1	TTCCTCACTCCCACGTTCCAC	Cette étude
PP_2561_RT2	GCCTTCGCTGGAGATGATGA	Cette étude
<i>aceA</i> _RT1	AAGGCTTCTACAAGGTCCGC	Cette étude
<i>aceA</i> _RT2	AGGAAGGCGAGCAGTTGTAC	Cette étude
<i>sdhB</i> _RT1	ATCGTTACAACCCGGACACC	Cette étude
<i>sdhB</i> _RT2	TTGCCGTTTCATGTTTCATGCC	Cette étude
<i>glcB</i> _RT1	GGTGGATGACATTCTGGCCA	Cette étude
<i>glcB</i> _RT2	ATCAGGCCGACGTTGTTGAT	Cette étude
<i>sucA</i> _RT1	CACCCGTTTCGACCTCAAGA	Cette étude
<i>sucA</i> _RT2	CGTAAGCCATGGTCTCTGCA	Cette étude
<i>gltA</i> _RT1	ACCGTGATGAAGCAGACCTG	Cette étude
<i>gltA</i> _RT2	ATCACGGTGAACATGCTGGT	Cette étude
<i>icd</i> _RT1	CATGGTGATCTTCCGCGAGA	Cette étude
<i>icd</i> _RT2	ATCCACCACGTATTGCAGGG	Cette étude
<i>idh</i> _RT1	AAGGCAAGGACACCATCTCG	Cette étude
<i>idh</i> _RT2	TCCCAACGCAGGAAGTTCTC	Cette étude
<i>fumC-I</i> _RT1	ACTTCATCCAGCACTTCCCG	Cette étude
<i>fumC-I</i> _RT2	GACATGGATGGTGGTCGGAA	Cette étude
<i>acnA-I</i> _RT1	GCTATGCCTTTCTGCGTTGG	Cette étude
<i>acnA-I</i> _RT2	TTGATCATGGTGGTGTGCGA	Cette étude
<i>acnB</i> _RT1	GGCGGCTACAACATCGAAAC	Cette étude
<i>acnB</i> _RT2	GGTCAGGGTGTACTTGTCCG	Cette étude



<i>mdh</i> _RT1	AACCTGCCAATCCTCGACAG	Cette étude
<i>mdh</i> _RT2	CCGTGATATCCCGTGCAGAA	Cette étude
Oligonucleotides utilisés pour la mutagenèse		
<i>sucD</i> _mut_for	GCTACCAAAGAGCGCGTTAC	Cette étude
<i>sucD</i> _mut_rev	CCACACTGCTGAAATCGGGA	Cette étude
<i>ttgR</i> _mut_for	GGTGGCCATGTTTGCCTTTGTCGATGGCCTGATCG	Cette étude
<i>ttgR</i> _mut_rev	CGATCAGGCCATCGACAAAGGCAAACATGGCCACC	Cette étude
Oligonucléotides utilisés pour le séquençage		
M13-For	CATTTTGCTGCCGGTC	Invitrogen®
M13-Rev	GTCCTTTGTCGATACT	Invitrogen®
<i>ttgR</i> _seq1	GGGCCAGATGAGGTTGTACT	Cette étude
<i>ttgR</i> _Seq3	AAACACTCCCTCACAATCCTTAAC	Cette étude
<i>ttgR</i> _Seq4	GTGAACTCGCACTTGTGATGC	Cette étude
<i>ttgR</i> _Seq5	GCTGCATGCGCAAGCT	Cette étude
<i>ttgR</i> _Seq6	AAATCCTGCATCACAAGTGCG	Cette étude
PP_2561_Seq1	GTTTCGACATCATGGAAGGCC	Cette étude
PP_2561_Seq2	ATTGGTTGCGCTGACATTGT	Cette étude
<i>sucD</i> _Seq3	TGTCGATGAAGTTGGAGCCC	Cette étude
<i>sucD</i> _Seq4	GTTCCGGCACTCTGACCTAC	Cette étude
<i>sucD</i> _Seq5	ATGAGCGTCCTGATCAATAAAGATA	Cette étude
<i>sucD</i> _Seq6	TACTTCTTGGCTTCCCAGC	Cette étude
PP_3453_Seq1	CGCAAGATCAAGACCGTGTG	Cette étude
PP_3453_Seq2	ACYATCAGYATHGGCCT	Cette étude
PP_3453_Seq3	TGGCCGCACTGGC	Cette étude
PP_3453_Seq4	CAGCACCAGGCCGAA	Cette étude
PP_3454_Seq1	GGRCGWGTGTGAAAAAGTGT	Cette étude
PP_3454_Seq2	TCSAGGTTTRTASGCCATG	Cette étude
PP_3454_Seq3	CTGCTGCGCCAGGAR	Cette étude
PP_3454_Seq4	KGCGCTCGGCSAGGT	Cette étude
Inter_ <i>ttgR</i> - <i>ttgA</i> _Seq1	GTCACGACGCCGACCT	Cette étude
Inter_ <i>ttgR</i> - <i>ttgA</i> _Seq2	TTGTTGTTGAAGTGCCAGTAGAT	Cette étude

### **2.3 Electrophorèse en gel d'agarose**

Les fragments d'ADN obtenus après amplification génique par PCR ou restriction enzymatique ont été séparés en fonction de leur taille par électrophorèse horizontale en gel d'agarose à 0,8%, 1% ou 2% (p/v). La migration a été réalisée dans un tampon TAE 1x (Tris Acétate 40mM, EDTA 1mM, pH 8,0) pendant une heure sous une tension de 110 V. Après immersion du gel pendant 20 min dans une solution de BET (Bromure d'Ethidium, 0,5 µg/mL), l'ADN a été visualisé à l'aide du système UV ChemiDoc XRS muni du logiciel QuantityOne® (Bio-Rad).

### **2.4 Purification des fragments d'ADN**

Les amplicons obtenus ont été extraits à partir du gel d'agarose ou directement purifiés sur des colonnes de silice à l'aide du kit Nucleospin® Gel and PCR Clean-Up (Machery-Nagel, Düren, Allemagne). L'ADN a ensuite été élué avec 30 µL d'eau Rnase Dnase Free puis dosée au spectrophotomètre (260 nm).

### **2.5 Techniques de clonage**

#### **2.5.1 Hydrolyse de l'ADN par des endonucléases de restriction**

Les restrictions enzymatiques de l'ADN plasmidique ou des amplicons obtenus par PCR ont été réalisées pendant deux heures, aux températures optimales de fonctionnement des enzymes, selon les recommandations du fournisseur (Proméga). Classiquement, 25 µL de réaction contenant 1 µg d'ADN, 1 µL d'enzyme et un tampon spécifique permettant

l'optimisation de la réaction, ont été incubés pendant deux heures à 37°C, suivies de 15 min d'inactivation de l'enzyme à 65°C.

### 2.5.2 Ligature des fragments d'ADN

Les fragments d'ADN ont été ligaturés à des plasmides linéarisés selon les instructions du fournisseur pendant 16h à 15°C par une restriction enzymatique, à l'aide de l'ADN Ligase du bactériophage T4 (Proméga) qui catalyse la formation de liaison phosphodiester entre les groupements 5'-phosphate et 3'-hydroxyle des molécules d'ADN bicaténares ayant des extrémités franches ou cohésives.

## 2.6 Transformation bactérienne

### 2.6.1 Transformation par choc thermique

Des cellules de *E. coli* CC118  $\lambda$ pir ont rendues compétentes par un traitement au chlorure de rubidium selon le protocole de Hanahan (Hanahan, 1983) ou des cellules de *E. coli* DH5 $\alpha$  déjà compétentes (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific, Etats Unis) ont été transformées par choc thermique selon le protocole suivant. Cent  $\mu$ L de bactéries compétentes ont été mises en contact avec un plasmide (10 ng) ou un produit de ligature (2  $\mu$ L) à transformer, pendant 30 min dans la glace. Le choc thermique consiste à incuber les échantillons 1 min à 42°C, suivi de 10 min dans la glace (0-4°C). les bactéries ont été ensuite cultivées 1 heure à 37°C sous une agitation de 225 rpm dans 1 mL de bouillon MHC préchauffé à 37°C, puis sélectionnées sur un milieu sélectif approprié selon le plasmide utilisé.

### 2.6.2 Transformation par électroporation

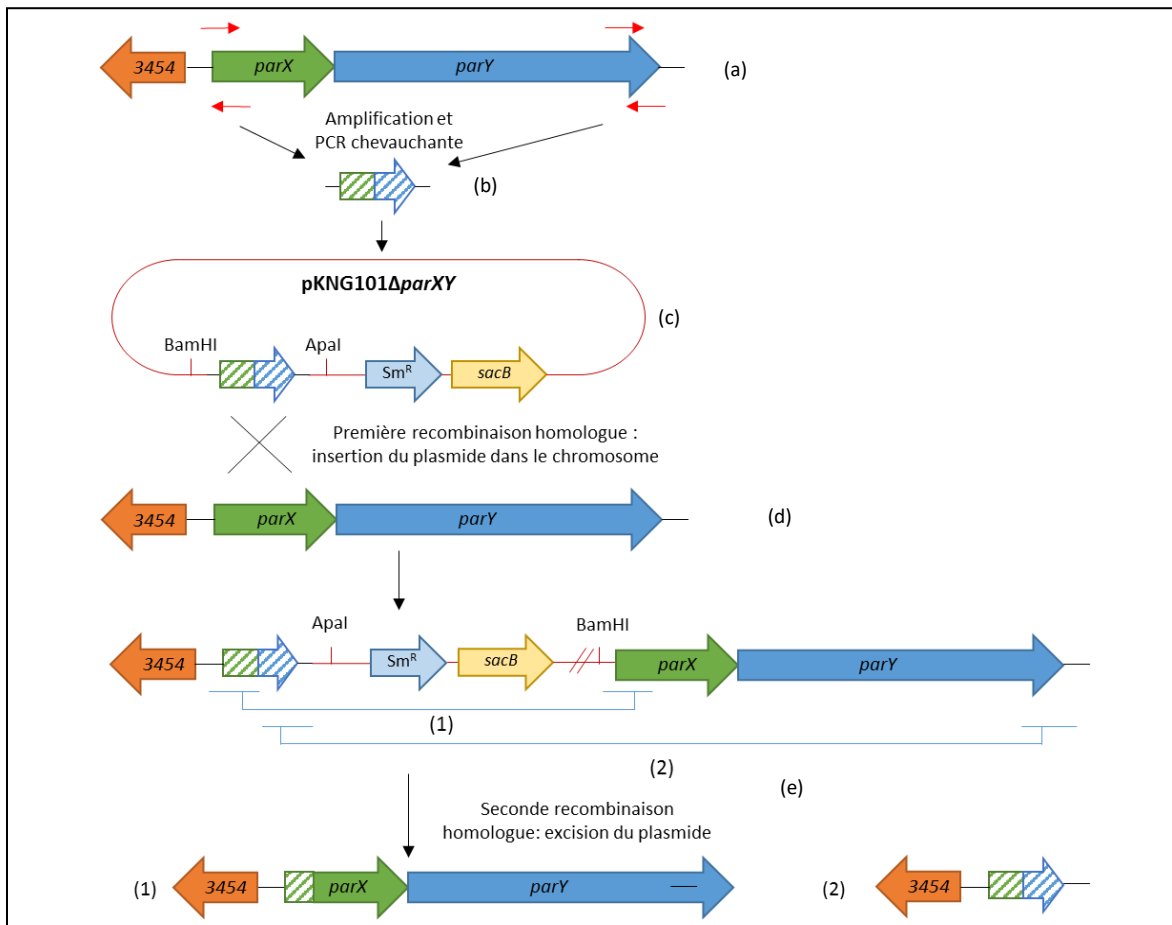
Les souches de *P. aeruginosa* ont été rendues électro-compétentes par un traitement au sucrose d'après le protocole de Choi (Choi et al., 2006). 50  $\mu$ L de cellules électro-compétentes ont été mises en contact avec 50 à 500 ng de plasmide dans une cuve d'électroporation de 2mm d'épaisseur et soumises à un champ électrique de 2,5 kV/cm, 200  $\Omega$  et 25  $\mu$ F durant 4,5-5 ms, grâce à l'électroporateur MicroPulser™ (Bio-Rad). Les cellules transformées ont été cultivées dans 1 mL de MHc pendant 1 heure à 37°C, puis étalées sur un milieu gélosé rendu sélectif par l'ajout de l'antibiotique approprié.

### 2.6.3 Conjugaison bactérienne

La transformation des souches de *P. aeruginosa* ou *P. putida* a été effectuée par conjugaison triparentale avec la souche de *P. aeruginosa* ou *P. putida* comme souche receveuse, une souche de *E. coli* CC118  $\lambda$ pir donneuse et une souche de *E. coli* HB101 portant le plasmide pRK2013 comme souche helper. 30  $\mu$ L d'une culture en phase exponentielle de croissance de la souche donneuse et de la souche helper ont été déposés sous forme d'une goutte à la surface d'une gélose MHc. Après 2 heures de contact, 30  $\mu$ L d'une culture de la nuit de la souche receveuse préalablement incubée à 42°C sans agitation (pour les souches de *P. aeruginosa*) ou non pré-incubées (pour les souches de *P. putida*) ont été ajoutées au mélange précédent. Après 4 heures de conjugaison tri-parentale, le spot obtenu a été mis en suspension dans 1 mL de bouillon MHc préchauffé et cultivé 1h30 à 37°C sous agitation constante. Les transconjugants ont été sélectionnés sur un milieu sélectif approprié.

## 2.7 Technique d'inactivation génique ou de remplacement allélique

L'inactivation des gènes a été effectuée par recombinaison homologue (Figure 34). Dans un premier temps, environ 500 pb ont été amplifiés par PCR en amont et en aval du gène ou de l'opéron à déléter. Puis, une PCR chevauchante a été effectuée en utilisant les amplicons issus des précédentes amplifications comme matrice, afin d'obtenir un fragment d'ADN contenant le gène tronqué. Le fragment d'ADN a été cloné dans un plasmide pCR-Blunt® à l'aide du kit Zero-Blunt™ PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, Etats Unis), puis sous-cloné par restriction enzymatique suivie d'une ligature dans le plasmide suicide pKNG101. Après transformation dans les cellules CC118  $\lambda$ pir, le plasmide a été introduit chez *P. aeruginosa* ou *P. putida* par conjugaison tri-parentale. Enfin, les transconjugants ont été sélectionnés sur une gélose MHC-agar contenant de la streptomycine. L'excision du plasmide pKNG101 du chromosome de la souche receveuse a été provoquée par la culture sur un milieu minimum M9 supplémenté de sucrose 5% comme seule source de carbone. Le sucrose est toxique pour les souches possédant le plasmide, car il contient le gène *sacB* qui code pour la lévane-sucrase. L'inactivation génique ou le remplacement allélique ont été confirmés par une amplification génique par PCR et le séquençage double brin selon Sanger.



**Figure 34. Représentation schématique des étapes de l'inactivation génique.** Le schéma montre l'amplification des régions bordant le gène cible (a), la PCR chevauchante (b), le clonage dans le plasmide *pKNG101* (c) et les événements de recombinaison homologue ayant lieu dans la souche receveuse (d lors de la conjugaison et l'intégration du plasmide dans le chromosome, puis (e) lors de l'excision du plasmide). Les éléments (1) et (2) représentent les deux recombinaisons possibles lors de l'excision du plasmide : soit une excision L'exemple choisi est la délétion de l'opéron *parXY* chez *P. putida*.

## 2.8 Mutagenèse dirigée du gène *ttgR* chez *P. putida*

Le gène *ttgR* de la souche KT2440 a été amplifié par PCR et cloné dans le plasmide pCR-Blunt® à l'aide du kit Zero-Blunt™ PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific) et transformé dans des cellules de *E. coli* DH5α par choc thermique. Après extraction et purification du plasmide, la mutagenèse dirigée a été effectuée à l'aide du kit GENEART® Site-directed Mutagenesis System (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) selon le protocole recommandé. Brièvement, une première amplification par PCR en utilisant des amorces spécifiques comprenant la mutation à insérer a été effectuée, couplée à la méthylation préalable du plasmide. Ensuite, la recombinaison du plasmide a été initiée *in vitro* par un mélange réactionnel contenant l'amplicon et une enzyme de type recombinase permettant d'améliorer le rendement de recombinaison. Ce mélange a été incubé 10 min à température ambiante, puis la réaction a été stoppée en ajoutant 1 µL d'EDTA 0,5 M et en plaçant les échantillons dans la glace. Le plasmide obtenu contenant la mutation désirée a été transféré par choc thermique dans des cellules compétentes de *E. coli* One Shot® MAX Efficiency® DH5α-T1<sup>R</sup> (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific) et sélectionnées sur MHC agar additionnées de 50 µg/mL de kanamycine. La présence de la mutation a été vérifiée par amplification génique et séquençage Sanger.

## 2.9 Séquençage de l'ADN

### 2.9.1 Séquençage par la méthode Sanger

Le séquençage de l'ADN a été effectué par la plate-forme « Séquençage – Analyse de fragments » de l'IFR 133 de Besançon par la méthode des didésoxynucléotides de Sanger, à l'aide du séquenceur automatique Applied Biosystems 3130 (Life Technologies, Californie, USA).

### 2.9.2 Identification des substitutions géniques (SNP) dans le mutant HPG-5

L'identification des SNP entre la souche de référence KT2440 et le mutant spontané résistant à la ticarcilline, HPG-5, a été réalisée à l'aide d'un séquençage du génome complet par WGS (whole-genome sequencing). L'ADN génomique de la souche KT2440 et de son mutant HPG-5 a été extrait grâce au kit Pure Link Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). Les étapes de

préparation de la banque d'ADN (Nextera XT DNA Library Preparation Kit) et le séquençage (MiSeq aligner, Illumina, San Diego, United States) ont été réalisés par Microsynth AG avec une moyenne de 80 X (Balgach, Switzerland). La cartographie des séquences lues chez le mutant HPG-5 (7 514 191 lectures au total) et chez la souche sauvage KT2440 (6 776 044 lectures) sur la séquence déposée de la souche KT2440 (Accession number: NC\_002947.4), ainsi que l'identification des SNP ont été réalisées grâce au logiciel CLC Genomic Workbench (v10.0.1). Toutes les mutations identifiées dans plus de 75% des lectures de séquences et absentes de la souche KT2440 ont été contrôlées par une amplification génique par PCR suivie du séquençage Sanger.

### **2.10 Extraction des ARN totaux et rétrotranscription**

Une culture de la nuit des bactéries d'intérêt a été calibrée à une absorbance égale à 0,1 dans du MHC, en présence ou non d'antibiotique, puis cultivée à 37°C sous agitation constante à 250 rpm jusqu'à atteindre une absorbance  $A_{600} = 0,8$ . Une fraction de 500  $\mu\text{L}$  de la culture bactérienne a été récupérée et centrifugée après avoir été traitées par 1 mL de RNA Protect® (Qiagen). Les ARN totaux ont été extraits à partir du culot bactérien obtenu à l'aide du kit d'extraction RNeasy plus Minikit (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur. Un traitement supplémentaire pour éliminer les traces d'ADN génomique résiduelles a été réalisé sur les échantillons lors de l'extraction grâce à l'ajout d'une DNase double brin (RNase-Free DNase Set, Qiagen). 1  $\mu\text{g}$  des ARN totaux ont été rétro-transcrits en ADNc grâce au kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega, Madison, Etats Unis) en suivant les recommandations du fournisseur.

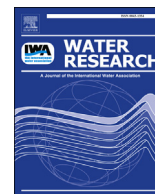
### **2.11 Quantification des ARNm par RT-qPCR**

Les ARNm rétro-transcrits (ADNc) des gènes cibles ont été quantifiés dans l'appareil RotorGene RG6000 Real Time PCR Instrument (Qiagen) à l'aide du Quanti Fast SybrGreen kit (Qiagen) en utilisant les amorces listées dans les tableaux 12 et 13. Les niveaux de transcrits ont été comparés à ceux des souches sauvages PAO1 chez *P. aeruginosa* et KT2440 chez *P. putida*, après une normalisation par un gène ménage (*uvrD* chez *P. aeruginosa* et le gène codant l'ARN 16S chez *P. putida*), comme précédemment décrit (Muller et al., 2011) (Yao et al., 2017). Les différences de niveaux de transcrits mesurés ont été évaluées à l'aide du test de Student pairé à partir de trois ou quatre réplicats biologiques obtenus indépendamment.



## V. ANNEXES

---



# Contamination of a hospital plumbing system by persister cells of a copper-tolerant high-risk clone of *Pseudomonas aeruginosa*

Audrey Jeanvoine<sup>a, b</sup>, Alexandre Meunier<sup>a</sup>, Hélène Puja<sup>b</sup>, Xavier Bertrand<sup>a, b</sup>, Benoît Valot<sup>b</sup>, Didier Hocquet<sup>a, b, c, \*</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire d'Hygi ne Hospitali re, Centre Hospitalier R gional Universitaire, Besançon, France

<sup>b</sup> UMR CNRS 6249, Chrono-environnement, Universit  de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

<sup>c</sup> Centre de Ressources Biologiques - Filibre Microbiologique de Besançon, Centre Hospitalier R gional Universitaire, Besançon, France

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 7 December 2018

Received in revised form

30 March 2019

Accepted 6 April 2019

Available online 10 April 2019

### Keywords:

*Pseudomonas aeruginosa*

Persisters

Copper

Premises plumbing

One health

## ABSTRACT

**Background:** *Pseudomonas aeruginosa* (PA) is an important opportunistic pathogen that thrives best in the distal elements of plumbing and waste-water systems. Although nosocomial outbreaks of PA have been associated with water sources, the role of the plumbing system of healthcare premises as a reservoir for this pathogen is still unclear.

**Materials and methods:** We collected water samples from 12 technical areas, distant from any medical activity, in a teaching hospital in France once a week for 11 weeks. We used a method that resuscitates persister cells because of the nutrient-poor conditions and the presence of inhibitors (e.g. chlorine and copper ions). Briefly, water was sampled in sterile bottles containing 100  $\mu$ M of the copper-ion chelating agent diethyldithiocarbamate (DDTC). A portion of the samples was immediately filtered through 0.45- $\mu$ m membranes, deposited on R2A agar plates, and incubated seven days at 22  $^{\circ}$ C (following European recommendations). The remaining water was incubated 14 days at 22  $^{\circ}$ C and then filtered and cultured on R2A, blood-, or cetrimide-containing agar plates. PA isolates were identified by MS MALDI-TOF, genotyped by PFGE and WGS, and tested for survival in a 150  $\mu$ g/L copper (II) sulphate solution.

**Results:** Although the 12 water sampling points always tested negative with the recommended method, 67% were positive at least once for PA with the adapted method (i.e. with DDTC). The 14 PA persister isolates found throughout the plumbing system were clonal and belong to the high-risk clone ST308. Their genome harbours a 37-kb genomic island (GI-7) containing 13 genes linked to copper resistance. ST308 survived better in the copper solution than comparators that did not harbour GI-7 (*P. aeruginosa* strains PAO1, PA14, and ST235). The deletion of GI-7 in ST308 abrogated its tolerance to copper. The GI-7 nucleotide sequence shares 98% and 72% identity with sequences from the environmental species *Pseudomonas putida* and the phytopathogenic species *Pseudomonas syringae*, respectively.

**Conclusion:** We report the contamination of the plumbing system of a healthcare premises by persister cells of the high-risk clone *P. aeruginosa* ST308. New recommendations for the monitoring of water contamination should consider persister cells. The genomic island GI-7, which confers tolerance to copper, probably originates from *Pseudomonas* species found in copper-contaminated soils and plants. Agricultural practices may have an unexpected consequence, allowing copper-tolerant pathogens to survive in the hospital environment and contaminate fragile patients.

  2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

*Pseudomonas aeruginosa* is an important opportunistic pathogen

in immunocompromised or critically ill patients (Cuttelod et al., 2011; Loveday et al., 2014). It is ubiquitous in soil, water, and other moist environments, including hospital water networks and water points (Bédard et al., 2016; Loveday et al., 2014). *P. aeruginosa* thrives best in the distal elements of plumbing and waste-water systems, such as taps, sinks, U-bends, and toilets (Bédard et al., 2016; Varin et al., 2017), which in turn can act as a source of

\* Corresponding author. Laboratoire d'Hygi ne Hospitali re, Centre Hospitalier R gional Universitaire, 3 boulevard Fleming, Besançon Cedex, 25030, France.

E-mail address: [dhocquet@chu-besancon.fr](mailto:dhocquet@chu-besancon.fr) (D. Hocquet).

patient contamination. Hence, 15–50% of *P. aeruginosa* healthcare-associated infections originate from regularly used contaminated water points (Blanc et al., 2004; Cholley et al., 2008; Rogues et al., 2007; Trautmann et al., 2006). *P. aeruginosa* strains transmitted from contaminated tap water to patients are usually considered to be of environmental origin. However, Kotay et al. showed that faucets and aerators are easily contaminated by strains coming from the U-bends, themselves seeded by clinical strains (Kotay et al., 2017). Hence, the hospital environment may act as a reservoir and amplifier of clinical strains of *P. aeruginosa*.

Although nosocomial outbreaks of *P. aeruginosa* have been associated with water sources (Abdouchakour et al., 2018; Garvey et al., 2017; Quick et al., 2014), the role of the plumbing system of the healthcare premises as a reservoir for this pathogen is still unclear. Water contamination in hospitals is monitored by immediate filtration and culture on agar media (Health Technical Memorandum 04-01, 2016; NF EN ISO 16266, 2008). However, water distribution and plumbing systems are hostile environments for bacterial development, with nutrient-poor conditions and inhibitors (e.g. chlorine and copper-ions). These conditions favour the development of persister cells (also called VBNC – viable but not culturable), which are not culturable on media upon which they were usually able to grow (Bédard et al., 2014; Kim et al., 2018; Li et al., 2014). Hence, culture-based methods can miss water samples containing *P. aeruginosa* DNA (Bédard et al., 2015).

The biocidal properties of copper are exploited for the distribution of water and copper-containing materials are widely used for pipes and fixtures of plumbing systems, leading to the release of copper ions into the drinking water (Dwidjosiswojo et al., 2011). In addition, copper is widely used as a biocide in agriculture and as a growth promoter in animal production. This metal thus heavily contaminates soil directly treated with copper sulphate or exposed to copper-containing manure (Nunes et al., 2016).

Here, we screened the plumbing system of a healthcare premises for *P. aeruginosa* using a method that resuscitates persister cells. We used pulsed-field gel electrophoresis, whole-genome sequencing, and gene inactivation to determine the population structure of the bacterial isolates found in the water network and identify the biological features that may have helped the strains to survive in this harsh environment.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Setting

We sampled the plumbing system of the 1200-bed University Hospital of Besançon (UHB, France), consisting of four buildings. The grey, orange, green, and blue buildings were built in 1982, 1999, 2012, and 2015, respectively. UHB has two independent water inlets. One inlet serves the blue building, whereas the other inlet serves the three other buildings (Fig. 1). All pipes of the drinking-water installation are made of copper.

### 2.2. Water sampling

We exclusively sampled faucets distant from any medical activity to avoid any contamination with *P. aeruginosa* isolates originating from patients or the environment of care units. Indeed, sampled faucets were in technical areas, such as crawl spaces, medical equipment storage areas, and technical facilities. One-litre water samples were obtained weekly for 11 weeks (from May to August 2017) from 12 sampling points. Specifically, we sampled the two main water inlets and technical areas of the grey ( $n = 4$ ), orange ( $n = 3$ ), green ( $n = 2$ ), and blue ( $n = 1$ ) buildings (Fig. 1). Water was sampled, according to the EN ISO 19458 guidelines (NF EN ISO,

19458, 2006), in sterile polypropylene bottles containing 20 mg/L sodium thiosulphate (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) after aerator removal, disinfection of the outlet with a gas burner or a swipe soaked with the disinfectant Aniosurf (ANIOS, Lille-Hellemmes, France), and a 1-min pre-flush (Wang et al., 2017; NF EN ISO, 19458, 2006). In addition, we adapted the EN ISO 19458 guidelines by immediately supplementing all samples with 100  $\mu$ M of the copper-ion chelating agent diethyldithiocarbamate (DDTC; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fellavier, France), which can resuscitate copper-impregnated bacterial cells (Dwidjosiswojo et al., 2011). Bottled sterile water (Fresenius Kabi, Sevres, France) was also sampled in triplicate as a negative control.

### 2.3. Microbiological analysis of the water

Within 2 h after sampling, we filtered 250 mL water through 0.45- $\mu$ m membranes, placed them on R2A agar (Biokar Diagnostics, Allonne, France), and incubated them for seven days at 22 °C, according to the method recommended by the European and French technical guidelines (Health Technical Memorandum 04-01, 2016; NF EN ISO 16266, 2008). The remaining 750 mL were stored for 14 days at 22 °C in the dark (Dwidjosiswojo et al., 2011; Li et al., 2014). Then, we filtered three subsamples of 250 mL, placed the membranes either on R2A agar and incubated them for seven days at 22 °C, cetrinide-containing agar (Biorad, Marne la Coquette, France) and incubated them for 48 h at 37 °C, or Columbia agar supplemented with 5% horse blood (Thermofisher Oxoid, Dardilly, France) and incubated them for 48 h at 37 °C. *P. aeruginosa* colonies were detected by standard microbiological methods (i.e. colony morphology, positive oxidase reaction, and pigment production) and further identified by MALDI-TOF mass spectrometry (Microflex LT; Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) according to the manufacturer's recommendations. We stored each isolate in brain-heart infusion broth supplemented with 30% glycerol at –80 °C until further analysis at the Centre de Ressources Biologiques-Filière Microbiologique de Besançon (Biobank number BB-0033-00090).

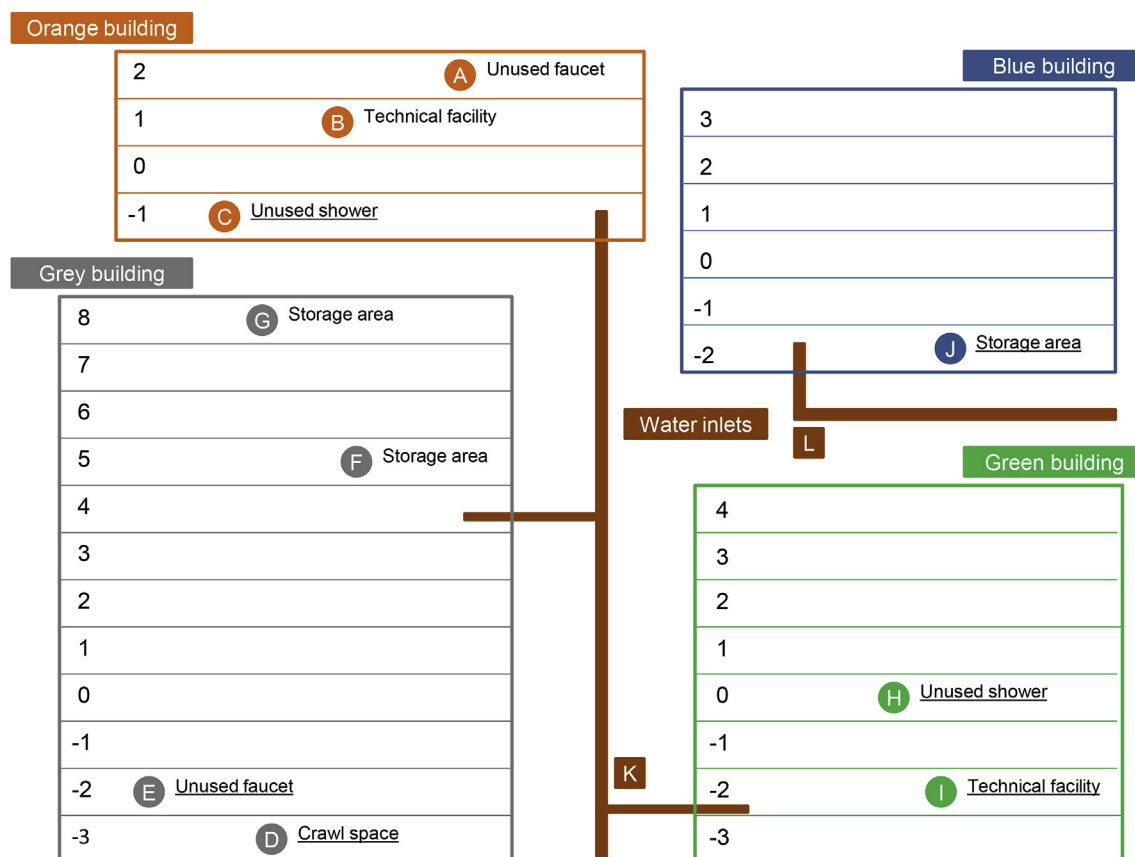
### 2.4. Determination of antibiotic susceptibility

We tested the activity of ten clinically important antibiotics (ceftazidime, cefepime, piperacillin-tazobactam, imipenem, meropenem, aztreonam, amikacin, tobramycin, ciprofloxacin, and fosfomycin) against all *P. aeruginosa* isolates by the disk diffusion method (EUCAST, 2017).

### 2.5. Genotyping analysis

The clonality of *P. aeruginosa* isolates was first investigated by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) with Dnal digestion, as previously described (Slekovec et al., 2012). The restriction profiles were analysed using GelCompar software (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Pulsotypes and clusters were defined according to international recommendations (Tenover et al., 1995).

We sequenced the genome of *P. aeruginosa* isolates using Illumina NextSeq technology (pair-end, 150 bp, and coverage > 240 X) to decipher the genetic relationship between isolates and identify specific genetic elements. Reads were subsampled to a coverage of 80X before genome assembly using Spades v3.9.0 with read correction and k-mer sizes of 22, 33, 55, and 77 (Bankevich et al., 2012). The sequence type (ST) of isolates was determined *in silico* from WGS data (Larsen et al., 2012).



**Fig. 1.** Schematic representation of the buildings of the University Hospital of Besançon (France) and the location of water samples. For each building, the numbers on the left indicate the floor. The circles and squares indicate the locations of the water sampling in the healthcare plumbing system and water inlets. The sampling points where the copper concentration was measured are underlined.

## 2.6. Phylogenetic analysis

A previously described subset of 3767 core genes was extracted from each assembled genome and other representative genomes using a home-made python script for a core genome MLST (cgMLST; <https://github.com/bvalot/wgMLST>) (Mellmann et al., 2016). These genes were concatenated for Bayesian phylogenetic analysis using MrBayes v3.2.6 with a GTR + G substitution model (Ronquist et al., 2012). We ran 1,000,000 iterations of two Markov Chain Monte Carlo simulations. The convergence of the two chains was confirmed by a calculated PSRF (Potential Scale Reduction Factor) close to 1.0. The posterior probability of each branch was >99%.

## 2.7. Determination of the Cu<sup>2+</sup> concentration in water samples

The Cu<sup>2+</sup> concentration was assessed in triplicate in the *P. aeruginosa*-positive water outlets (Fig. 1). We used an inductively coupled plasma (ICP) with a GC system 7900 (Agilent technologies, Massy, France) coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (7000 ICP-MS/MS model, Agilent technologies, Massy, France).

## 2.8. Chromosomal deletion of the GI-7 genomic island in *P. aeruginosa*

We constructed a GI-7 deletion mutant by using overlapping PCR and recombination events as previously described (Kaniga et al., 1991). Briefly, 750 bp located up and downstream of the GI-7 region was amplified by PCR using the specific primer pairs Gi7\_5'\_Fw

(AGCCAAGCACCAGGTCTATT)/Gi7\_5'\_Rev (AGGCAGATGATCTGG CCGTAAGTAGGCT) and Gi7\_3'\_Fw (GCCAGATCATCTGC CTTGGGTCATGTCA)/Gi7\_3'\_Rev (ACCAAAATTGACCTGCGC-AT) (annealing at 60 °C, extension 0.5 min). Subsequently, an overlapping PCR amplified the previous amplicons with the external pair of primers Gi7\_5'\_Fw/Gi7\_3'\_Rev (annealing at 63 °C, 1 min extension), using the BioRad iProof HF Master Mix (Biorad) according to the manufacturer's instructions. We cloned the resulting blunt-end PCR product into the plasmid pCRTM-Blunt using the Zero Blunt<sup>®</sup> PCR Cloning Kit (Invitrogen, Carlsbad, United States) and subcloned it into the suicide vector pKNG101 in the *E. coli* CC118 $\lambda$ pir strain, previously digested with BamHI/ApaI restriction enzymes. We transferred the recombinant suicide vector in the *P. aeruginosa* PA-8 isolate by triparental conjugation. Transconjugants were selected on Pseudomonas Isolation Agar supplemented with 2000 mg/L streptomycin. Homologous recombination was obtained after selection of transconjugants on M9 minimal medium (42 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 22 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 19 mM NH<sub>4</sub>Cl, and 8.5 mM NaCl) supplemented with 5% sucrose. The deletion of 27,288 bp in the *P. aeruginosa* PA-8 $\Delta$ GI-7 isolate was confirmed by PCR and sequencing.

## 2.9. Survival in copper solution

For all tested *P. aeruginosa* isolates, an overnight culture in Luria-Bertani broth (LBB, Biorad) was diluted 1/200 into fresh LBB and further incubated at 37 °C under gentle shaking until mid-log phase. The bacterial suspension was then centrifuged at 4000 $\times$ g for 20 min. The pellet was washed once and resuspended in sterile

deionized water. Bacteria were suspended in a 150 µg/L copper (II) sulphate solution (Sigma-Aldrich) to obtain a concentration of  $\sim 10^8$  bacteria/ml, which was further incubated for 24 h at 22 °C in the dark. We chose a concentration of 150 µg/L as it was the highest value retrieved at a *P. aeruginosa*-positive faucet. Initial and final bacterial concentrations were determined by plating the appropriate dilutions on LB agar (Biorad) and incubating overnight at 37 °C. The ratios of the final and initial bacterial concentrations determined the survival rates. We repeated each experiment six times independently for all isolates. We used the *P. aeruginosa* reference strains PAO1 and PA14 and a clinical isolate of ST235 (strain PA1646; Pitié Salpêtrière University Hospital, Paris, France) as controls.

### 2.10. Statistical analysis

We used RStudio software version 3.2.2 (Boston, USA) for all statistical analysis. The significance of the differences in bacterial survival in copper (II) sulphate solution between the various tested *P. aeruginosa* isolates was determined by the analysis of variance (ANOVA). A multiple comparison test, Tukey's HSD (honestly significant difference) Test, was performed when the ANOVA detected a significant statistical difference. The chosen significance threshold was 0.05 for all tests.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Contamination of the hospital plumbing system by *P. aeruginosa*

None of the 132 water samples tested was found to be positive for *P. aeruginosa* using the method recommended by the English and French technical guidelines (Health Technical Memorandum 04-01, 2016; NF EN ISO 16266, 2008; NF EN ISO, 19458, 2006). In contrast, the use of the copper-ion chelating agent associated with a sample incubation of 14 days (adapted method) resuscitated 14 persister isolates of *P. aeruginosa* from 11 samples (8.3%). Persister isolates found with the adapted method grew on R2A agar ( $n = 8$ ), Columbia agar supplemented with 5% horse blood ( $n = 4$ ), or cetrinide-containing agar ( $n = 2$ ). Overall, eight of 12 sampling points were positive at least once for *P. aeruginosa*, with the four buildings and two water inlets being positive for the pathogen (Table 1).

**Table 1**  
Isolation sites of 14 *P. aeruginosa* isolates collected from the hospital plumbing system (Besançon, France).

Location	Site sampled	Cu <sup>2+</sup> concentration (µg/L) <sup>a</sup>	Isolation of <i>P. aeruginosa</i>		<i>P. aeruginosa</i> isolates <sup>b</sup>
			With the recommended method	With the adapted method	
Orange building	Unused faucet (A)	NA	No	No	
	Technical facility (B)	NA	No	No	
	Unused shower (C)	13.4 ± 1.4	No	Yes	PA-1, PA-2, PA-7
Grey building	Unused faucet (E)	7.3 ± 0.2	No	Yes	PA-5
	Crawl space (D)	2.7 ± 0.1	No	Yes	PA-10, <b>PA-12<sup>b</sup></b>
	Storage area (F)	NA	No	No	
	Storage area (G)	NA	No	No	
Green building	Unused shower (H)	30.3 ± 25.4	No	Yes	PA-4
	Technical facility (I)	3.3 ± 2.3	No	Yes	PA-11
Blue building	Storage area (J)	143.9 ± 1.9	No	Yes	<b>PA-8<sup>b</sup></b>
Water inlets	Blue building (K)	6.0 ± 0.9	No	Yes	<b>PA-6<sup>b</sup></b> , PA-13, PA-14
	Orange, grey, green buildings (L)	0.6 ± 0.0	No	Yes	<b>PA-3<sup>b</sup></b> , PA-9

NA: not available.

<sup>a</sup> Geometric mean of three values ± SD.

<sup>b</sup> Isolates for which the genome was fully sequenced are shown in bold.

### 3.2. Recommended methods failed to detect persister cells of *P. aeruginosa*

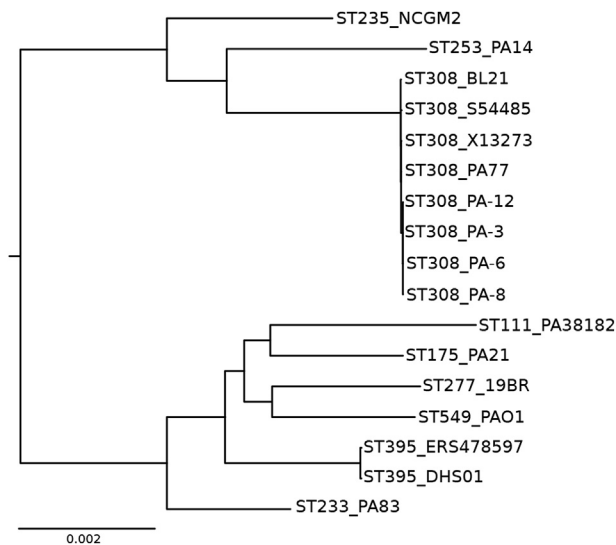
All *P. aeruginosa* isolates were only able to grow after a 14-day incubation with the copper chelator DTTC, which relieves bacteria of copper inhibition (Dwidjosiswojo et al., 2011). Persister cells are not immediately culturable on media upon which the species is usually able to grow. However, resuscitated cells recover their full virulence, as shown by cell and murine models (Dwidjosiswojo et al., 2011; Li et al., 2014). The guidelines for water testing recommend water sampling in thiosulphate-containing bottles, followed by immediate 0.45-µm filtration and culture on agar media (Health Technical Memorandum 04-01, 2016; NF EN ISO 16266, 2008). In our hands, this method did not allow the growth of persister cells of *P. aeruginosa*. Hence, all the water sampling points ( $n = 12$ ) tested negative with the recommended techniques, whereas eight (67%) were positive for *P. aeruginosa* with the adapted method. Four of the 12 sampling sites in the plumbing system, two unused showers, and two unused faucets were not operated according to the acknowledged rules (Health Technical Memorandum 04-01, 2016). Three were positive for *P. aeruginosa*, confirming that water stagnation in backwater degrades the microbiological quality of water (Health Technical Memorandum 04-01, 2016). In addition, although the treatment of water with a copper chelator allowed the detection of *P. aeruginosa* persister cells in the plumbing system of the premises, this method was not quantitative. However, as a *P. aeruginosa* count of  $\geq 1$  CFU/100 ml is already considered to be unsatisfactory (Health Technical Memorandum 04-01, 2016; NF EN ISO 16266, 2008), the quantification of the pathogen is of minor importance. Enhancing the performance of the detection of *P. aeruginosa* in the plumbing system of healthcare premises will expedite decontamination measures of the drinking water installation and would reduce the risk of contamination of regularly used water points, their colonization by the bacterial pathogen, and subsequent transmission to patients.

### 3.3. A single ST308 *P. aeruginosa* clone colonized the entire UHB plumbing system

The 14 *P. aeruginosa* isolates of the present collection displayed a typical morphology and were fully susceptible to all antibiotics tested (data not shown).

We tested the genetic relatedness of the 14 *P. aeruginosa* isolates





**Fig. 2.** Phylogenetic relationship between the *P. aeruginosa* ST308 isolates of the drinking-water network of the University Hospital of Besançon (France) and high-risk clones and reference strains PA14 and PA01. The phylogenetic tree is based on cgMLST (3767 genes). The scale bar indicates the genetic distance, in number of substitutions per site. The prefix in the name of the strains indicates the sequence type.

using PFGE and found that they all shared the same pulsotype (Supplementary Fig. S1). Four isolates were selected for genome sequencing (Table 1). PA-3 and PA-6 were isolated from the two main water inlets, and isolates PA-8 and PA-12 came from the water network of the blue and grey buildings, respectively. Their genomes were constructed by *de novo* assembly. *In silico* MLST revealed that the four sequenced isolates belong to clone ST308. The PFGE data were confirmed by cgMLST, which found <20 different alleles between the four isolates, thus confirming the clonality of the collection (Mellmann et al., 2016). We also assessed the genetic distance between our local ST308 clone and representatives of the *P. aeruginosa* species. This collection included the genomes of (i) other ST308 isolates, (ii) isolates of high-risk clones ST111, ST175, ST233, ST235, ST277, and ST395, responsible for outbreaks in healthcare settings, and the two reference strains PA01 and PA14 (Supplementary Table S1). As expected, our local ST308 clone clustered with the four other ST308 representatives (Fig. 2). The other tested genomes were distributed between two major phylogenetic groups, one including PA01 and the other PA14, as previously shown (Freschi et al., 2015). The ST308 and ST235 isolates belong to the PA14 group and the high-risk clones ST111, ST175, ST233, ST277, and ST395 belong to the PA01 group.

The survival and persistence of *P. aeruginosa* in the harsh environment of the plumbing system of the healthcare premises presumably relies on its ability to form persister cells within biofilms and colonize free-living amoebae, which offer the bacterial pathogen protection against hostile conditions and act as a vehicle of dissemination (Bédard et al., 2016, 2014; Hota et al., 2009; September et al., 2007; Wingender and Flemming, 2011). The presence of a single ST308 clone in the drinking water installation could either be due to monoclonal inoculation from the water supply system of the city or intraspecific competition (through the production of pyocins) won by this particular clone (Michel-Briand and Baysse, 2002).

#### 3.4. *P. aeruginosa* ST308 is an emerging high-risk clone

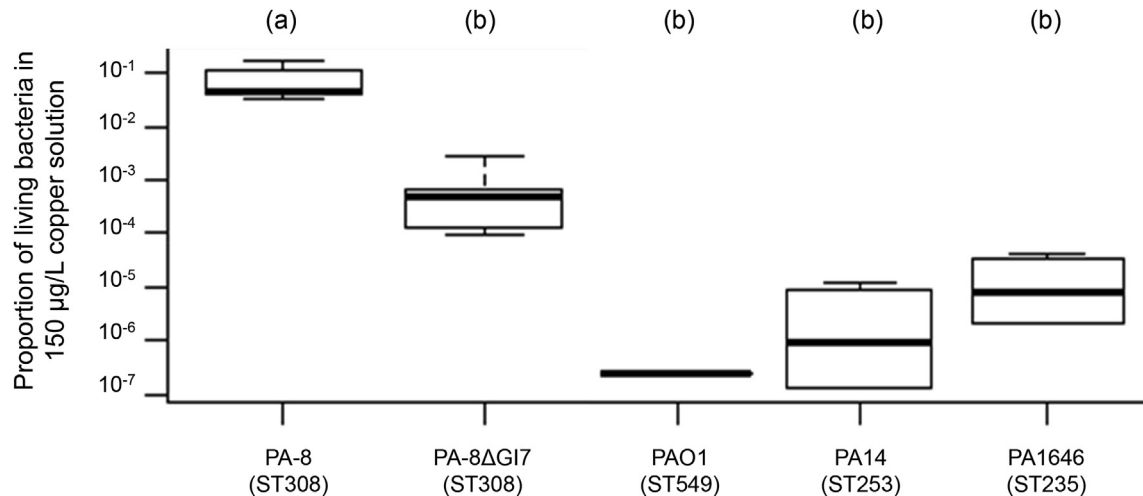
Although no outbreak of *P. aeruginosa* ST308 has occurred thus far among patients hospitalized in the UHB, carbapenem-resistant

isolates of this clone have already been retrieved in the U-bends of the haematology unit (Varin et al., 2017). However, two hospital outbreaks of *P. aeruginosa* ST308 involving the environment have been recently described in Europe. First, a multidrug-resistant ST308 clone that produces the metallo- $\beta$ -lactamase IMP-8 spread throughout the haematological-oncological unit of a German hospital over three years, where the environment was a reservoir for patient contamination (Willmann et al., 2015). Second, *P. aeruginosa* ST308 caused a five-year outbreak in patients in a French hospital and persisted for an additional four years in the hospital environment, causing sporadic infections (Abdouchakour et al., 2018). Here again, the environment was identified as the likely source and reservoir of the outbreak. In addition, clone ST308 can also produce  $\beta$ -lactamases of Ambler class A (GES-7) and class B (IMP-1, IMP-8, IMP-13, IMP-45, IMP-63, and VIM-2) (Oliver et al., 2015; Liapis et al., 2018). Overall, *P. aeruginosa* ST308 is a high-risk clone, which can locally acquire resistance determinants that possibly originated from the water-distribution system.

#### 3.5. ST308 isolates are tolerant to copper due to genomic island GI-7

The concentration of  $\text{Cu}^{2+}$  in the water at the eight sampling points that tested positive for *P. aeruginosa* ranged from  $0.6 \pm 0.006$  to  $143.9 \pm 1.9 \mu\text{g/L}$  (Table 1). These concentrations are below the maximum acceptable concentration of  $2000 \mu\text{g/L}$  defined by French and European standards and the World Health Organization. However, the presence of ST308 in this copper-containing water led us to test its survival in such hostile conditions. We compared the survival of isolate PA-8 (representative of the ST308 clone that contaminates the UHB water network) with that of the *P. aeruginosa* reference strains PA01 and PA14 and strain PA1646, a representative of the major epidemic high-risk clone ST235, in a copper-containing solution. PCR experiments confirmed that the genomes of PA01, PA14, and PA1646 (ST235) do not harbour GI-7 (data not shown). The PA-8 isolate survived better in a  $150 \mu\text{g/L}$  copper solution than the reference strains PA01, PA14, and PA1646 (ST235) (Fig. 3).

We therefore searched for genetic elements that could confer tolerance to copper and aid in the implantation of ST308 in the plumbing system. Analysis of the sequenced genomes of four UHB-contaminating ST308 isolates retrieved a 36,905-bp genomic island that contains 13 genes encoding copper resistance mechanisms (Fig. 4). Among them, the genes *czcC*, *czcB*, and *czcA* encode an outer membrane protein, an adaptor subunit, and an efflux pump, respectively. These proteins form the heavy metal RND efflux pump CzcABC that has already been described in *P. aeruginosa* and *P. putida*. This zinc- and copper-induced pump confers resistance to heavy metals (Chong et al., 2016; Leedj arv et al., 2008). The gene *copG* encodes a hypothetical export protein. CopM is a cytochrome C oxidase involved in electron transport (Behlau et al., 2011). CopA, CopB, and CopZ are a copper binding protein, an exporting ATPase, and a chaperone, respectively (Chong et al., 2016; Navarro et al., 2016). The *CopA* and *CopB* genes constitute an operon encoding a putative metal-binding protein and a copper oxidase described in clinical isolates of *P. aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* and the environmental species *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas* sp. (Behlau et al., 2011; Teitzel et al., 2006; Teixeira et al., 2008; Williams et al., 2016). CopA and CopB bind copper-ions in the periplasm and outer membrane, respectively (Teitzel et al., 2006). GI-7 also encodes two copper-binding plastocyanins and a copper ABC transporter, involved in copper homeostasis and/or transport (Chong et al., 2016; Quaranta et al., 2007). Finally, the two regulator genes *copS* and *copR* encode proteins that form a two-component signal transduction system (Behlau et al., 2011).



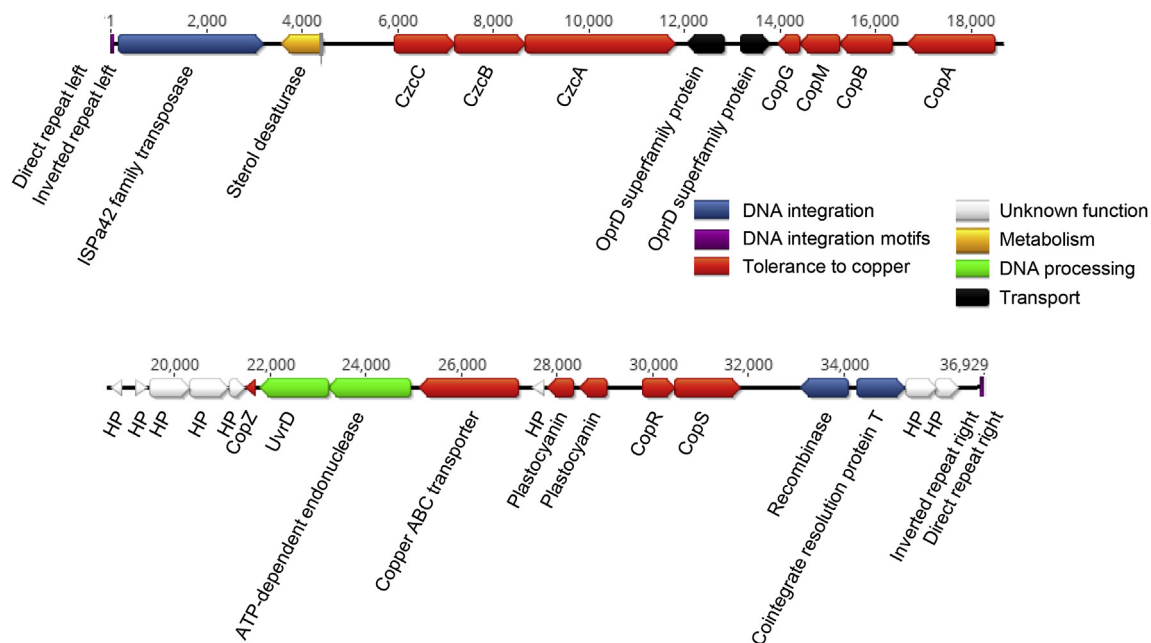
**Fig. 3. Survival of *P. aeruginosa* ST308 in a copper-containing solution.** Proportion of living bacteria after 24 h of incubation in a 150 µg/L copper (II) sulphate solution represented by a decimal logarithm scale. Values are shown as the mean ratio  $\pm$  SD from six independent experiments. ANOVA (analysis of variance) with a Tukey HSD (honestly significant difference) test. (a) and (b) represent significant statistical difference,  $p < 0.05$ .

We confirmed the role of GI-7 in the tolerance of ST308 to copper in solution by deleting the entire genomic island by chromosomal recombination and testing the survival of the deleted mutant (named PA-8ΔGI-7) under the same conditions as those previously used. As expected, the deletion of GI-7 significantly decreased the tolerance of ST308 in a 150 µg/L copper (II) sulphate solution relative to its wildtype parent (Fig. 3). Moreover, the PA-8ΔGI-7 mutant had a tolerance to copper similar to that of the other comparators (*i.e.* PAO1, PA14, PA1646 – ST235). Thus, GI-7 plays an important role in the copper tolerance of ST308, which may have helped the implantation of *P. aeruginosa* in the plumbing system and could further promote contamination of the water outlets, waste-water system, and patients. In addition, the survival of copper-tolerant bacteria in the water-distribution and plumbing

systems may be favoured by their enhanced resistance to amoebic predation. Hence, Hao et al. (2016) showed that copper resistance determinants in *P. aeruginosa* play crucial roles in bacterial resistance to predation by amoeba, which are prevalent in water distribution systems (Delafont et al., 2013).

### 3.6. GI-7 probably originated from environmental *Pseudomonas* and spread among high-risk clones of *P. aeruginosa*

GI-7 has the features of a transposable element, with a transposase-encoding gene, together with direct and indirect repeats flanking the transposon (Fig. 4). We blasted GI-7 against the NCBI database and found it in the genomes of 11 *P. aeruginosa* clinical isolates, with 99% identity (Supplementary Table S2). Two



**Fig. 4. Structure of the 37-kb genomic island, GI-7, associated with tolerance to copper in *Pseudomonas aeruginosa* ST308.** The genes and ORFs are shown as arrows, with their orientation of transcription indicated by the arrow. The colours of the arrows indicate the function of the encoded proteins (see colour legend). Base-pair numbering is from the first base of the left direct repeat. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

ST308 isolates from the USA and Mexico harboured GI-7. This genomic island was also found in the genomes of three isolates of *P. aeruginosa* ST395, amongst which DHS01 was the representative of a clone responsible for a long-term outbreak in the UHB, with identified environmental reservoirs (Bertrand et al., 2000; Petitjean et al., 2017). GI-7 was also found in the genomes of the sporadic ST198 and ST309 clones, as well as isolates of the high-risk international clones ST111 and ST253. Interestingly, an isolate of the environmental species *Pseudomonas putida* displayed a sequence that shared 98% identity with that of ST308. *P. putida* typically inhabits soil and water and is occasionally isolated from hospitalized patients (Molina et al., 2013). GI-7 was also found in the genome of the phytopathogenic *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strain SR198 (Monteil et al., 2016), with 72% identity. These two environmental species are constantly exposed to this heavy metal. Copper-derived biocides (e.g. copper sulphate) have been extensively used in wood impregnation stations and agriculture and as an animal feed additive since the mid-18th century (Hobman and Crossman, 2015; Nunes et al., 2016), making copper one of the most common soil contaminants. For example, copper contamination can reach 57.5 mg/kg dry weight of soil in Europe (Heijerick et al., 2006). Plant- and soil-associated species have thus accumulated resistance determinants to tolerate the presence of copper (Hobman and Crossman, 2015; Nunes et al., 2016). Overall, GI-7 likely emerged in environmental *Pseudomonas* species before its transfer to the high-risk clones of *P. aeruginosa* ST308, ST395, ST111, and ST253.

#### 4. Conclusion

We report the contamination of the plumbing system of a healthcare premises by persister cells of *P. aeruginosa* ST308. New recommendations for the monitoring of water contamination should account for persister cells to trigger decontamination measures of the drinking water installation and reduce the risk of contamination of regularly used water points. The genomic island GI-7, which confers copper tolerance to this emerging high-risk clone, probably originated from soil- and plant-associated *Pseudomonas* species. Agricultural practices may have unexpectedly selected copper-tolerant pathogens that can survive in drinking-water installations of hospitals, resulting in the potential contamination of fragile patients.

#### Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Author agreement

Conceived and designed the experiments: AJ, XB and DH. Performed the experiments: AJ, AM, HP and BV. Analysed the data: AJ, AM, HP, XB, BV, and DH. Wrote the paper: AJ, XB and DH.

All authors have approved the final article.

#### Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### Acknowledgment.

The authors thank Zoé Hocquet for the drawing of the graphical abstract.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.04.011>.


#### References

- Abdouchakour, F., Aujoulat, F., Licznar-Fajardo, P., Marchandin, H., Toubiana, M., Parer, S., Lotthé, A., Jumas-Bilak, E., 2018. Intracolon variations of resistance and phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clone ST308: a key to success within a hospital? *Int. J. Med. Microbiol.* 308, 279–289.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Prjibelski, A.D., Pyshkin, A.V., Sirotkin, A.V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M.A., Pevzner, P.A., 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 19, 455–477.
- Bédard, E., Charron, D., Lalancette, C., Déziel, E., Prévost, M., 2014. Recovery of *Pseudomonas aeruginosa* culturability following copper- and chlorine-induced stress. *FEMS Microbiol. Lett.* 356, 226–234.
- Bédard, E., Laferrière, C., Charron, D., Lalancette, C., Renaud, C., Desmarais, N., Déziel, E., Prévost, M., 2015. Post-outbreak investigation of *Pseudomonas aeruginosa* faucet contamination by quantitative polymerase chain reaction and environmental factors affecting positivity. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 36, 1337–1343.
- Bédard, E., Prévost, M., Déziel, E., 2016. *Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings. *MicrobiologyOpen* 5, 937–956.
- Behlau, F., Canteros, B.I., Minsavage, G.V., Jones, J.B., Graham, J.H., 2011. Molecular characterization of copper resistance genes from *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and *Xanthomonas alfalfae* subsp. *citrumelonis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4089–4096.
- Bertrand, X., Bailly, P., Blasco, G., Balvay, P., Boillot, A., Talon, D., 2000. Large outbreak in a surgical intensive care unit of colonization or infection with *Pseudomonas aeruginosa* that overexpressed an active efflux pump. *Clin. Infect. Dis.* 31, e9–e14.
- Blanc, D.S., Nahimana, I., Petignat, C., Wenger, A., Bille, J., Francioli, P., 2004. Faucets as a reservoir of endemic *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infections in intensive care units. *Intensive Care Med.* 30, 1964–1968.
- Cholley, P., Thouverez, M., Floret, N., Bertrand, X., Talon, D., 2008. The role of water fittings in intensive care rooms as reservoirs for the colonization of patients with *Pseudomonas aeruginosa*. *Intensive Care Med.* 34, 1428–1433.
- Chong, T.M., Yin, W.F., Chen, J.W., Mondy, S., Grandclément, C., Faure, D., Dessaux, Y., Chan, K.G., 2016. Comprehensive genomic and phenotypic metal resistance profile of *Pseudomonas putida* strain S13.1.2 isolated from a vineyard soil. *Ambio Express* 6, 95.
- Cuttelod, M., Senn, L., Terletskiy, V., Nahimana, I., Petignat, C., Eggimann, P., Bille, J., Prod'homme, G., Zanetti, G., Blanc, D.S., 2011. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units over a 10-year period (1998–2007). *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 57–62.
- Delafont, V., Brouke, A., Bouchon, D., Moulin, L., Héchar, Y., 2013. Microbiome of free-living amoebae isolated from drinking water. *Water Res.* 47, 6958–6965.
- Dwidjosiswojo, Z., Richard, J., Moritz, M.M., Dopp, E., Flemming, H.C., Wingender, J., 2011. Influence of copper ions on the viability and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* under conditions relevant to drinking water environments. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214, 485–492.
- EUCAST, 2017. Clinical Breakpoints-Bacteria (V 7.1) accessed 26.11.18. [http://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/previous\\_versions\\_of\\_documents](http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/previous_versions_of_documents).
- Freschi, L., Jeukens, J., Kukavica-Ibrulj, I., Boyle, B., Dupont, M.J., Larocque, J., Larose, S., Maaroufi, H., Fothergill, J.L., Moore, M., Winsor, G.L., Aaron, S.D., Barbeau, J., Bell, S.C., Burns, J.L., Camara, M., Cantin, A., Charette, S.J., Dewar, K., Déziel, E., Grimwood, K., Hancock, R.E.W., Harrison, J.J., Heeb, S., Jelsbak, L., Jia, B., Kenna, D.T., Kidd, T.J., Klockgether, J., Lam, J.S., Lamont, I.L., Lewenza, S., Loman, N., Malouin, F., Manos, J., McArthur, A.G., McKeown, J., Milot, J., Naghra, H., Nguyen, D., Pereira, S.K., Perron, G.G., Pirnay, J.P., Rainey, P.B., Rousseau, S., Santos, P.M., Stephenson, A., Taylor, V., Turton, J.F., Wagelchner, N., Williams, P., Thrane, S.W., Wright, G.D., Brinkman, F.S.L., Tucker, N.P., Tümmler, B., Winstanley, C., Levesque, R.C., 2015. Clinical utilization of genomics data produced by the international *Pseudomonas aeruginosa* consortium. *Front. Microbiol.* 6, 1036.
- Garvey, M.L., Bradley, C.W., Holden, E., Weibren, M., 2017. Where to do water testing for *Pseudomonas aeruginosa* in a healthcare setting. *J. Hosp. Infect.* 97, 192–195.
- Hao, X., Lüthje, F., Rønn, R., German, N.A., Li, X., Huang, F., Kisaka, J., Huffman, D., Alwathnani, H.A., Zhu, Y.G., Rensing, C., 2016. A role for copper in protozoan grazing - two billion years selecting for bacterial copper resistance: role of copper in protozoan predation. *Mol. Microbiol.* 102, 628–641.
- Health Technical Memorandum 04-01, 2016. Part B: operational management. In: Health Technical Memorandum 04-01: Safe Water in Healthcare Premises accessed 26.11.18. <https://www.gov.uk/government/collections/health-technical-memorandum-disinfection-and-sterilization>.
- Heijerick, D.G., Van Sprang, P.A., Van Hyfte, A.D., 2006. Ambient copper concentrations in agricultural and natural European soils: an overview. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 858.
- Hobman, J.L., Crossman, L.C., 2015. Bacterial antimicrobial metal ion resistance. *J. Med. Microbiol.* 64, 471–497.




- Hota, S., Hirji, Z., Stockton, K., Lemieux, C., Dedier, H., Wolfaardt, G., Gardam, M., 2009. Outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 30, 25–33.
- 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.
- Kim, J.S., Chowdhury, N., Yamasaki, R., Wood, T.K., 2018. Viable but non-culturable and persistence describe the same bacterial stress state. *Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14075>.
- Kotay, S., Chai, W., Guilford, W., Barry, K., Mathers, A.J., 2017. Spread from the sink to the patient: in situ study using green fluorescent protein (GFP)-expressing *Escherichia coli* to model bacterial dispersion from hand-washing sink-trap reservoirs. *Appl. Environ. Microbiol.* 83 pii: e03327-16.
- Larsen, M.V., Cosentino, S., Rasmussen, S., Friis, C., Hasman, H., Marvig, R.L., Jelsbak, L., Sicheritz-Pontén, T., Ussery, D.W., Aarestrup, F.M., Lund, O., 2012. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1355–1361.
- Leedjäv, A., Ivask, A., Virta, M., 2008. Interplay of different transporters in the mediation of divalent heavy metal resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. *J. Bacteriol.* 190, 2680–2689.
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J.D., Faucher, S.P., 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 5, 258.
- Liapis, E., Bour, M., Valot, B., Jové, T., Zahar, J., Potron, A., Plésiat, P., Jeannot, K., 2018. Complex genetic exchanges involving carbapenemase IMP-63 between *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida*. In: 28<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. Abstract PS057.
- Loveday, H.P., Wilson, J.A., Kerr, K., Pitchers, R., Walker, J.T., Browne, J., 2014. Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa* infections: a rapid systematic review. *J. Hosp. Infect.* 86, 7–15.
- Mellmann, A., Bletz, S., Böking, T., Kipp, F., Becker, K., Schultes, A., Prior, K., Harmsen, D., 2016. Real-time genome sequencing of resistant bacteria provides precision infection control in an institutional setting. *J. Clin. Microbiol.* 54, 2874–2881.
- Michel-Briand, Y., Baysse, C., 2002. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie* 84, 499–510.
- Molina, L., Bernal, P., Udaondo, Z., Segura, A., Ramos, J.L., 2013. Complete genome sequence of a *Pseudomonas putida* clinical isolate, strain H8234. *Genome Announc.* 1 pii: e00496-13.
- Monteil, C.L., Yahara, K., Studholme, D.J., Mageiros, L., Méric, G., Swingle, B., Morris, C.E., Vinatzer, B.A., Sheppard, S.K., 2016. Population-genomic insights into emergence, crop adaptation and dissemination of *Pseudomonas syringae* pathogens. *Microb. Genom.* 2, e000089.
- Navarro, C.A., von Bernath, D., Martínez-Bussenius, C., Castillo, R.A., Jerez, C.A., 2016. Cytoplasmic CopZ-like protein and periplasmic rusticyanin and AcoP Proteins as possible copper resistance determinants in *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1015–1022.
- NF EN ISO 16266, 2008. Indice de classement: T 90–419: Qualité de l'eau - Détection et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* - Méthode par filtration sur membrane.
- Nunes, I., Jacquiod, S., Brejnrod, A., Holm, P.E., Johansen, A., Brandt, K.K., Priemé, A., Sørensen, S.J., 2016. Coping with copper: legacy effect of copper on potential activity of soil bacteria following a century of exposure. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92 pii: fiw175.
- Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C., Juan, C., 2015. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist. Updates* 21–22, 41–59.
- Petitjean, M., Martak, D., Silvant, A., Bertrand, X., Valot, B., Hocquet, D., 2017. Genomic characterization of a local epidemic *Pseudomonas aeruginosa* reveals specific features of the widespread clone ST395. *Microb. Genom.* 3, e000129.
- Quaranta, D., McCarty, R., Bandarian, V., Rensing, C., 2007. The copper-inducible *Cin* operon encodes an unusual methionine-rich azurin-like protein and a pre-QO reductase in *Pseudomonas putida* KT2440. *J. Bacteriol.* 189, 5361–5371.
- Quick, J., Cumley, N., Wearn, C.M., Niebel, M., Constantinidou, C., Thomas, C.M., Pallen, M.J., Moïemen, N.S., Bamford, A., Oppenheim, B., Loman, N.J., 2014. Seeking the source of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a recently opened hospital: an observational study using whole-genome sequencing. *BMJ Open* 4, e006278.
- Rogues, A.M., Boulestreau, H., Lashéras, A., Boyer, A., Gruson, D., Merle, C., Castaing, Y., Bébear, C.M., Gachie, J.P., 2007. Contribution of tap water to patient colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* in a medical intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 67, 72–78.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–542.
- September, S.M., Els, F.A., Venter, S.N., Brözel, V.S., 2007. Prevalence of bacterial pathogens in biofilms of drinking water distribution systems. *J. Water Health* 5, 219–227.
- Slekovec, C., Plantin, J., Cholley, P., Thouverez, M., Talon, D., Bertrand, X., Hocquet, D., 2012. Tracking down antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a wastewater network. *PLoS One* 7, e49300.
- Teitzel, G.M., Geddie, A., De Long, S.K., Kirisits, M.J., Whiteley, M., Parsek, M.R., 2006. Survival and growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188, 7242–7256.
- Teixeira, E.C., Franco de Oliveira, J.C., Marques Novo, M.T., Bertolini, M.C., 2008. The copper resistance operon CopAB from *Xanthomonas axonopodis* pathovar *citri*: gene inactivation results in copper sensitivity. *Microbiology* 154, 402–412.
- Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B., 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2233–2239.
- Trautmann, M., Bauer, C., Schumann, C., Hahn, P., Höher, M., Haller, M., Lepper, P.M., 2006. Common RAPD pattern of *Pseudomonas aeruginosa* from patients and tap water in a medical intensive care unit. *Int. J. Hyg Environ. Health* 209, 325–331.
- Varin, A., Valot, B., Cholley, P., Morel, C., Thouverez, M., Hocquet, D., Bertrand, X., 2017. High prevalence and moderate diversity of *Pseudomonas aeruginosa* in the U-bends of high-risk units in hospital. *Int. J. Hyg Environ. Health* 220, 880–885.
- Wang, H., Bédard, E., Prévost, M., Camper, A.K., Hill, V.R., Pruden, A., 2017. Methodological approaches for monitoring opportunistic pathogens in premise plumbing: a review. *Water Res.* 117, 68–86.
- Williams, C.L., Neu, H.M., Gilbreath, J.J., Michel, S.L.J., Zurawski, D.V., Merrell, D.S., 2016. Copper resistance of the emerging pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 6174–6188.
- Willmann, M., Bezdán, D., Zapata, L., Susak, H., Vogel, W., Schröppel, K., Liese, J., Weidenmaier, C., Autenrieth, I.B., Ossowski, S., Peter, S., 2015. Analysis of a long-term outbreak of XDR *Pseudomonas aeruginosa*: a molecular epidemiological study. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 1322–1330.
- Wingender, J., Flemming, H.C., 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int. J. Hyg Environ. Health* 214, 417–423.

## ISAb<sub>1</sub>-dependent overexpression of *eptA* in clinical strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to colistin

Anaïs Potron <sup>1,2\*</sup>, Jean-Baptiste Vuilleminot<sup>2</sup>, Hélène Puja<sup>2</sup>, Pauline Triponney<sup>1</sup>, Maxime Bour<sup>1</sup>, Benoit Valot<sup>2</sup>, Marl  ne Amara<sup>3</sup>, Laurent Cavali  <sup>4</sup>, Christine Bernard<sup>5</sup>, Laurence Parmeland<sup>6</sup>, Florence Reibel<sup>7</sup>, Gerald Larrouy-Maumus<sup>8</sup>, Laurent Dortet<sup>9,10</sup>, Rémy A. Bonnin <sup>9,10</sup> and Patrick Plésiat<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>French National Reference Centre for Antibiotic Resistance, University Hospital of Besançon, Besançon, France; <sup>2</sup>UMR6249, CNRS Chrono-Environnement, Franche-Comté University, Besançon, France; <sup>3</sup>Hospital of Versailles, Le Chesnay, France; <sup>4</sup>University Hospital of Toulouse, Toulouse, France; <sup>5</sup>Grand Hôpital de l'Est Parisien, Jossigny, France; <sup>6</sup>Saint-Joseph Saint-Luc Hospital, Lyon, France; <sup>7</sup>Groupe Hospitalier Nord Essonne, Longjumeau, France; <sup>8</sup>MRC Centre for Molecular Bacteriology and Infection, Department of Life Sciences, Faculty of Natural Sciences, Imperial College London, London, UK; <sup>9</sup>EA7361 'Structure, Dynamic, Function and Expression of Broad Spectrum  $\beta$ -Lactamases', Paris-Sud University, LabEx Lermite, Faculty of Medicine, Le Kremlin-Bic  tre, France; <sup>10</sup>French National Reference Centre for Antibiotic Resistance, Associate Laboratory, Le Kremlin-Bic  tre, France

\*Corresponding author. Tel: 00-33-3-63-08-22-06; Fax: 00-33-3-70-63-23-64; E-mail: anaïs.potron@univ-fcomte.fr  [orcid.org/0000-0002-2966-7947](https://orcid.org/0000-0002-2966-7947)

Received 21 January 2019; returned 7 March 2019; revised 18 April 2019; accepted 8 May 2019

**Background:** Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* often results from mutational activation of the two-component system PmrAB and subsequent addition of phospho-ethanolamine (pEtN) to lipooligosaccharide by up-regulated pEtN transferase PmrC.

**Objectives:** To characterize mechanisms of colistin resistance independent of PmrCAB in *A. baumannii*.

**Methods:** Twenty-seven colistin-resistant *A. baumannii* were collected from 2012 to 2018. Analysis of operon *pmrCAB* was performed by PCR and sequencing. Seven strains were investigated further by WGS and whole-genome MLST (wgMLST).

**Results:** Seven out of the 27 selected isolates were found to overexpress *eptA*, a gene homologous to *pmrC*, likely as a consequence of upstream insertion of an ISAb<sub>1</sub> element. Insertion sites of ISAb<sub>1</sub> were mapped 13, 18 and 156 bp ahead of the start codon of *eptA* in five strains, one strain and one strain, respectively. The finding that the isolates did not cluster together when compared by wgMLST analysis supports the notion that distinct insertion events occurred in close, but different, genetic backgrounds.

**Conclusions:** Activation of *eptA* and subsequent addition of pEtN to the cell surface represents a novel mechanism of resistance to colistin in *A. baumannii*.

### Introduction

*Acinetobacter baumannii* is the cause of a wide range of healthcare-associated infections.<sup>1,2</sup> Over the last decades, the emergence and diffusion of strains resistant to most of the available antibiotics have pushed clinicians to turn to polymyxins such as polymyxin B and colistin (polymyxin E) as the ultimate therapeutic option. These amphipathic, polycationic agents strongly bind to the phosphate residues of lipooligosaccharide (LOS), disorganize the bilayer structure of the outer membrane and eventually kill susceptible bacteria by interacting with the cytoplasmic membrane and/or by generating free hydroxyl radicals.<sup>3</sup> Because of increasing use of colistin, resistance to this antibiotic has increased steadily, especially in carbapenem-non-susceptible isolates of *A. baumannii*,<sup>4,5</sup> to now reach critical levels in some countries.<sup>6</sup>

Resistance of *A. baumannii* to polymyxins mostly relies on enzymatic modification of LOS and a consequent decrease in the net negative charge of the bacterial surface with which these antibiotics first interact.<sup>5</sup> In this microorganism, mutational activation of the two-component system PmrAB is the primary cause of polymyxin resistance, as it results in overproduction of phospho-ethanolamine (pEtN) transferase PmrC and subsequent addition of pEtN residues to the 1'- or 4'-phosphate group of lipid A.<sup>7,8</sup> *A. baumannii* is also able to convert *N*-acetyl-galactosamine into galactosamine by means of the product of the PmrB-regulated gene *naxD* in order to mitigate the negative charges of lipid A.<sup>9</sup> Beside these mechanisms, inactivation of lipid A biosynthesis genes *lpxA*, *lpxC*, *lpxD* and/or *lpsB* by mutations or insertion of IS elements is known to generate LOS-defective mutants that are

resistant to polymyxins, but that in turn have lost some WT fitness.<sup>10,11</sup> Very recently, insertion of an IS<sub>Aba125</sub> element in a gene encoding an H-NS-related transcriptional regulator was found to contribute to the high-level colistin resistance of a clinical strain of *A. baumannii*.<sup>12</sup> This insertion appeared to trigger expression of a distant gene, called *eptA*, the product of which shares 93% sequence identity with PmrC and, like PmrC, mediates a pEtN transferase activity.<sup>12</sup> Overexpression of *eptA* from a recombinant plasmid conferred 8-fold higher resistance to colistin, thus highlighting a potential role of *eptA* in protection against polymyxins.<sup>12</sup> Finally, other mechanisms of resistance to colistin have been evoked, whose relevance still awaits confirmation in clinical isolates.<sup>13–15</sup>

Between 2012 and 2018, the French National Reference Centre for Antibiotic Resistance (NRC-AR) collected 27 colistin-resistant *A. baumannii* from public and private medical laboratories. The aim of the present study was to elucidate the mechanisms of resistance to polymyxins in a subset of isolates exhibiting intact *pmrAB* genes.

## Materials and methods

### Bacterial strains and culture conditions

In France, medical laboratories are invited to refer their *A. baumannii* isolates to a national reference centre (French NRC-AR, University Hospital Jean Minjoz, Besançon) in order to characterize the mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactams, mostly carbapenems. All the isolates received by the French NRC-AR are screened for colistin resistance by culture in CAMHB (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) containing 1.5 mg/L colistin. Identification of the strains is confirmed by MALDI-TOF MS (MALDI Biotyper CA System, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). In this study, bacterial cultures were performed at 37°C in CAMHB or on Mueller–Hinton agar plates (Becton Dickinson). In some experiments, bacterial growth in CAMHB was monitored spectrophotometrically at  $A_{600}$  every hour over an 8 h period.

### Antibiotic susceptibility testing

MICs of antibiotics were determined by the broth microdilution method with customized 96-well Sensititre<sup>®</sup> plates (Thermo Fisher Scientific, Villebon-sur-Yvette, France). Results were interpreted according to the CLSI breakpoints as updated in 2018.<sup>16</sup>

### DNA amplification and sequencing

Total DNA was extracted and purified from selected strains by using a commercial kit (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. PCR and Sanger sequencing were performed as described previously with specific primers (Table S1, available as [Supplementary data](#) at JAC Online).<sup>17,18</sup>

### WGS and analysis

Seven isolates were subjected to WGS. Their total DNA was individually extracted and purified from an overnight culture in CAMHB with a PureLink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific), quantified in a NanoDrop spectrophotometer (Ozyme, Montigny-le Bretonneux, France) for appropriate dilution and finally sent to Microsynth AG (Balgach, Switzerland) for sequencing. DNA libraries were prepared with a Nextera XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) and sequenced on an Illumina NextSeq sequencer with v2 chemistry using 2×150 bp paired-end reads. The Illumina reads were assembled by using CLC Genomics Workbench 10.1.1 (Qiagen) and the resulting contigs were fully annotated

using the online Patric server (<https://www.patricbrc.org>). Searching for resistance genes was carried out by uploading total data sequences to the ResFinder (v3.1) server (<http://www.genomicepidemiology.org/>). The assembled genomic DNAs of isolates were compared by SNP analysis and whole-genome MLST (wgMLST) with the software package BioNumerics 7.6.3. MLST was performed *in silico* using the online MLST 2.0 tool (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>). The two different MLST schemes (Oxford and Pasteur schemes) available for *A. baumannii* were compared (<http://pubmlst.org/abaumannii/>). The Whole Genome Shotgun project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under accession numbers SAXI000000000 (RCS1), SAXJ000000000 (RCS2), SAXK000000000 (RCS3), SAXL000000000 (RCS4), SAXM000000000 (RCS5), SAXN000000000 (RCS6) and SAXO000000000 (RCS7).

### Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted by using an RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) with the following modifications. An overnight culture of *A. baumannii* in drug-free CAMHB was diluted 1:100 in 3 mL of fresh medium and incubated aerobically at 37°C up to an  $A_{600}$  of 0.8. A 500  $\mu$ L volume of bacterial suspension was treated with RNAprotect Bacteria Reagent as recommended by the manufacturer (Qiagen). Bacteria were then pelleted by centrifugation, resuspended in lysis TE buffer (containing 15 mg/mL lysozyme and 1  $\mu$ g/mL proteinase K) and left for 10 min at room temperature with brief vortexing every 2 min. Other steps in sample processing were performed according to Qiagen recommendations. Two micrograms of total RNA was reverse-transcribed with ImProm-II reverse transcriptase as specified by Promega (Madison, WI, USA). Oligonucleotides were designed using Primer3 web software (Table S1).<sup>19</sup> Specific cDNAs were quantified on a Rotor-Gene RG6000 instrument (Qiagen) by using a QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen). For each strain, the mRNA levels of target genes were normalized relative to housekeeping gene *rpoB* and were expressed as ratios to transcript levels of strain ATCC 19606. Mean gene expression values were calculated from three independent bacterial cultures, each assayed in duplicate.

### MALDIXin test

The MALDIXin assay was performed on strains RCS1, RCS2 and RCS3 as described previously.<sup>20</sup> Briefly, a fresh colony grown on Mueller–Hinton agar was resuspended in 200  $\mu$ L of distilled water, washed three times and then resuspended in 100  $\mu$ L of double-distilled water. A 0.4  $\mu$ L volume of this bacterial suspension was deposited onto the target and immediately overlaid with 0.8  $\mu$ L of a 2,5-dihydroxybenzoic acid matrix (Sigma–Aldrich, Gillingham, UK), used at a final concentration of 10 mg/mL in chloroform/methanol (90:10, v/v). The bacterial suspension and the matrix were mixed directly on the target by pipetting and the mix was dried gently. MALDI-TOF MS analysis was performed in a 4800 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the reflectron mode. Samples were analysed by operating at 20 kV in the negative ion mode, using an extraction delay time set at 20 ns. MS data were analysed using Data Explorer version 4.9 (Applied Biosystems).

## Results

### Collection of isolates

Between September 2016 and September 2018, 940 MDR *A. baumannii* strains were analysed by the French NRC-AR, of which 18 (1.9%) displayed resistance to colistin (MIC >2 mg/L). Nine other colistin-resistant isolates, which had been collected between January 2012 and August 2016, were added to this collection for further analysis. The *mcr-1* gene and its homologues were not detected in these isolates. Compared with WT strains, 20 out of the 27 isolates appeared to harbour mutations in the *pmrCAB*

**Table 1.** Features of patients harbouring the *eptA*-overexpressing strains of *A. baumannii*

Patient	Age (years)	Sex	Travel history	Hospital	Ward	Date of isolation (month/year)	Clinical specimen of isolation	Infection/colonization	Isolate	Colistin treatment prior to strain isolation
1	79	female	none	A	ICU	10/2014	distal bronchial sample	colonization	RCS1	no
2	84	male	North Macedonia	B	urology	11/2015	urine sample	infection	RCS2	?
3	62	male	Saudi Arabia	C (E before)	ICU	09/2016	rectal swab	colonization	RCS3	?
4	70	male	Thailand	D	ICU	07/2017	throat sample	colonization	RCS4	yes
5	57	male	none	E	ICU	08/2017	bronchoalveolar lavage sample	colonization	RCS5	no
6	72	male	none	F	gerontology	07/2018	urine sample	colonization	RCS6	no
7	63	male	Turkey	G	ICU	09/2018	bronchial aspiration sample	colonization	RCS7	no

**Table 2.** Characteristics of the colistin-resistant *A. baumannii* isolates

Isolate	Pasteur ST/Oxford ST	Colistin MIC (mg/L)	Acquired resistance genes					macrolides, lincosamides and streptogramins
			$\beta$ -lactams	aminoglycosides	sulphonamides	tetracyclines		
RCS1	2/451	16	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1D</sub>	<i>armA</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aphA1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet</i> (B)	<i>msr</i> (E), <i>mph</i> (E)	
RCS2	2/218	4	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	<i>strA</i> , <i>strB</i>		<i>tet</i> (B)		
RCS3	2/218	128	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1D</sub>	<i>armA</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aphA1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet</i> (B)	<i>msr</i> (E), <i>mph</i> (E)	
RCS4	2/1634	4	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1D</sub>	<i>armA</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aphA1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet</i> (B)	<i>msr</i> (E), <i>mph</i> (E)	
RCS5	2/218	256	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1D</sub>	<i>armA</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aphA1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet</i> (B)	<i>msr</i> (E), <i>mph</i> (E)	
RCS6	2/208	32	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	<i>strA</i> , <i>strB</i>		<i>tet</i> (B)		
RCS7	2/218	8	<i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1D</sub>	<i>armA</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aphA1</i>	<i>sul2</i>	<i>tet</i> (B)	<i>msr</i> (E), <i>mph</i> (E)	

genes, some of which were previously associated with colistin resistance in clinical or *in vitro*-selected mutants of *A. baumannii* (Table S2). We therefore focused our attention on the seven uncharacterized strains. These isolates had been recovered from various clinical specimens ( $n=3$  respiratory samples,  $n=2$  urine samples,  $n=1$  rectal swab and  $n=1$  throat sample) and collected in hospitals located at long distances from each other (Table 1). Only one patient had received colistin therapy prior to the isolation of a colistin-resistant *A. baumannii* and four patients had a history of international travel to various countries (Table 1).

### Genotyping data

According to the Pasteur MLST scheme, the seven isolates belonged to widespread sequence type ST2 (Table 2). According to the Oxford scheme, four of the isolates belonged to ST218 (RCS2, RCS3, RCS5 and RCS7), while the others were single- or double-locus variants of ST218 (ST208, RCS6; ST451, RCS1; and ST1634, RCS4) (Table 2). Thus, all seven strains were related to International Clone II (also referred to as Global Clone 2 or GC2).

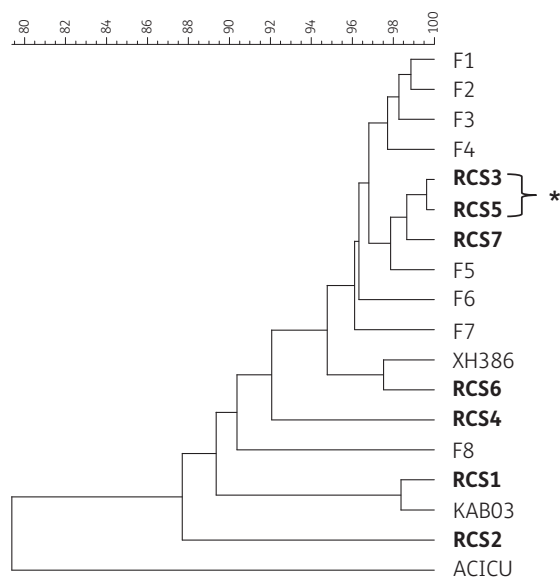
We used the wgMLST method to better discriminate the isolates and compared them with 11 other ST<sup>Pas</sup>2 *A. baumannii*

(Pasteur scheme). In addition to reference strain ACICU (accession number NC\_010611), these comparators included eight strains from various French geographical areas (F1–F8) and two well-characterized isolates from China (XH386) and Korea (KAB03).<sup>21,22</sup> wgMLST analysis revealed that the seven colistin-resistant isolates did not cluster together and were distributed throughout the whole population of ST<sup>Pas</sup>2 *A. baumannii* strains (Figure 1). Of note, two ST218 strains (RCS3 and RCS5) differed by 15 SNPs only. These bacteria had been obtained from patients admitted to two different hospitals (Hospitals C and E in Table 1). However, a common origin of contamination is probable as both patients had stayed in Hospital E before the transfer of one of them to Hospital C.

### Resistance to non-polymyxin antibiotics

The seven isolates were highly resistant to penicillins, penicillin/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations, ceftazidime, cefepime and carbapenems (data not shown). Most were also resistant to aminoglycosides, fluoroquinolones and/or minocycline. Colistin MICs ranged from 4 to 256 mg/L (Table 2). According to an international consensus,<sup>23</sup> RCS2 and RCS6 can be classified as XDR, while the five others are pandrug resistant.





**Figure 1.** Cluster analysis of colistin-resistant *A. baumannii* isolates using wgMLST allele data. Phylogenetic analysis was performed using the seven colistin-resistant *A. baumannii* isolates (in bold) and 11 other isolates belonging to ST2 (Pasteur scheme). The single set of isolates with a potential epidemiological link is indicated by the asterisk. The scale represents percentage allele identity.

Analysis of WGS data showed that the naturally occurring gene *bla*<sub>OXA-66</sub> co-existed with the acquired gene *bla*<sub>OXA-23</sub>, which codes for carbapenemase OXA-23, in the seven strains (Table 2).<sup>24</sup> Likely accounting for the elevated resistance of bacteria to broad-spectrum cephalosporins, an *ISAbal* element was found inserted upstream of gene *bla*<sub>ADC-30</sub> in two strains (RCS2 and RCS6) and *bla*<sub>ADC-73</sub> in five strains (RCS1, RCS3, RCS4, RCS5 and RCS7). ISs such as *ISAbal* and *ISAbal125* are a well-known cause of gene overexpression and resistance in *A. baumannii*.<sup>25,26</sup> Variants ADC-30 and ADC-73 of the natural class C cephalosporinase differ by a single amino acid substitution, G247S. Aminoglycoside resistance determinants *strAB*, *armA* and *aphA1* occurred in seven, five and four strains, respectively. Finally, mobile genes that promote resistance to macrolides [*msr*(E) and *mph*(E)], sulphonamides (*sul2*) and tetracyclines [*tet*(B)] were also identified in the isolates (Table 2).

### Mechanism of polymyxin resistance

Analysis of the genomic sequences of studied strains failed to demonstrate the presence of mutations in the *lpxA*, *lpxC*, *lpxD* and *lpsB* LOS biosynthesis genes, as compared with colistin-susceptible reference strain ACICU (accession number NC\_010611). Sequence alignments also showed that six strains carried the same *pmrA* allele as those of reference strains ATCC 19606 (accession number APRG01000000), ATCC 17978 (accession number CP000521) and CIP 70.10 (accession number LN865143), while a D106Y substitution in response regulator PmrA was found in RCS6. Taking *A. baumannii* ATCC 17978 as reference, sensor PmrB displayed an A444V variation in seven strains and an A138T substitution in five of them (RCS1, RCS3, RCS4, RCS5 and RCS7). However, these two substitutions were considered as common polymorphisms since they occurred in various colistin-susceptible strains (French NRC-AR,

data not shown). To our knowledge, the additional mutation P55L identified in PmrB from strain RCS6 has not been reported so far and its relevance remains unclear. Finally, the *pmrC* allele from the seven strains was identical to that of colistin-susceptible strain MDR-ZJ06 (accession number CP001937).

More interestingly, we found that one or more contigs contained a closely related orthologue of gene *pmrC*. Gene annotation analysis available from the Patric server confirmed the presence of two pEtN transferase-encoding genes, namely *pmrC* and *eptA*, in the selected isolates, whose products shared between 89% and 90% sequence identity. *eptA* was highly conserved among the selected isolates, with a maximal difference of two nucleotides between the three alleles identified. Sequences of alleles *eptA*-3 (RCS1 and RCS2), *eptA*-4 (RCS3 and RCS5) and *eptA*-5 (RCS4, RCS6 and RCS7) have been deposited in GenBank under accession numbers MK393859, MK393860 and MK393861, respectively. Proteins EptA-3 and EptA-4 differ from EptA-5 (also produced by *A. baumannii* ATCC 19606) by the single substitutions R127H and R127C, respectively. The possible effects of these substitutions on pEtN transferase activity remain to be investigated. A Blast search showed that the aforementioned *eptA* alleles exhibited 98% sequence homology with *eptA*-1, described by Lesho et al.<sup>27</sup> in a colistin-resistant clinical *A. baumannii* isolate (accession number KC700024). However, in contrast to this latter strain, all of our isolates appeared to contain a copy of element *ISAbal* inserted upstream of the *eptA* alleles. Three different *ISAbal* insertion sites were identified (Figure 2). In five isolates (RCS1, RCS3, RCS4, RCS5 and RCS7), *ISAbal* was located 13 bp ahead of *eptA*, while in RCS2 and RCS6 the element resided 18 and 156 bp upstream of the gene, respectively. As a transposition signature, identical 9 bp direct repeats flanking *ISAbal* were noted in the strains (Figure 2).

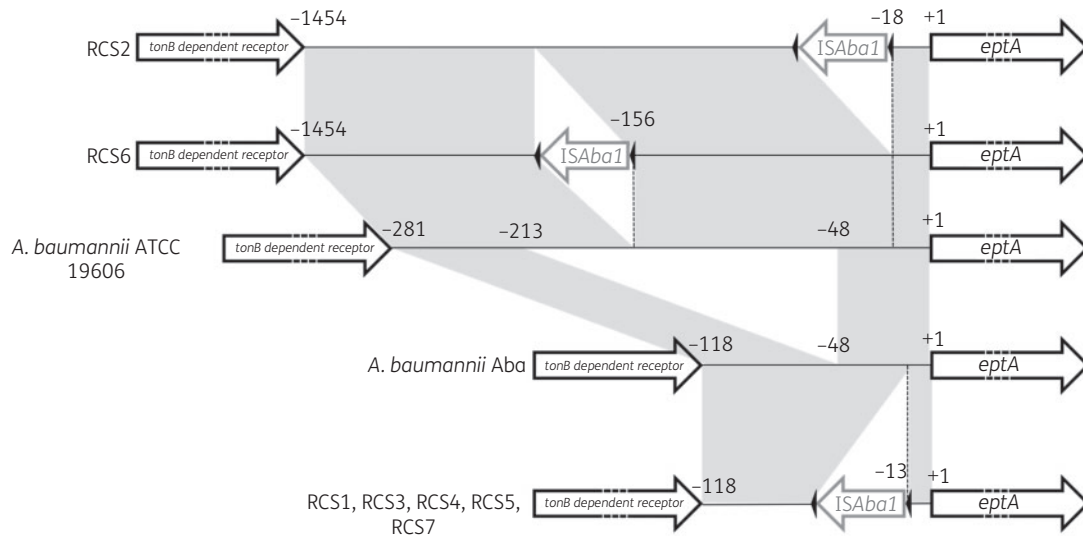
### Impact of *ISAbal* on *eptA* expression

Real-time quantitative PCR experiments were carried out with primers targeting genes *eptA*, *pmrB* and *pmrC*. They revealed that *eptA* was expressed 20.5–49 times more in the studied strains than in reference strain ATCC 19606 (Figure 3). On the other hand, similar levels of *pmrB* and *pmrC* transcripts were found in the isolates and the control, except for RCS6, a strain harbouring D106Y and P55L substitutions in PmrA and PmrB, respectively, and whose gene *pmrC* expression was 82-fold higher than the baseline. The individual role played by these two mutations in activation of *pmrC* was not assessed further.

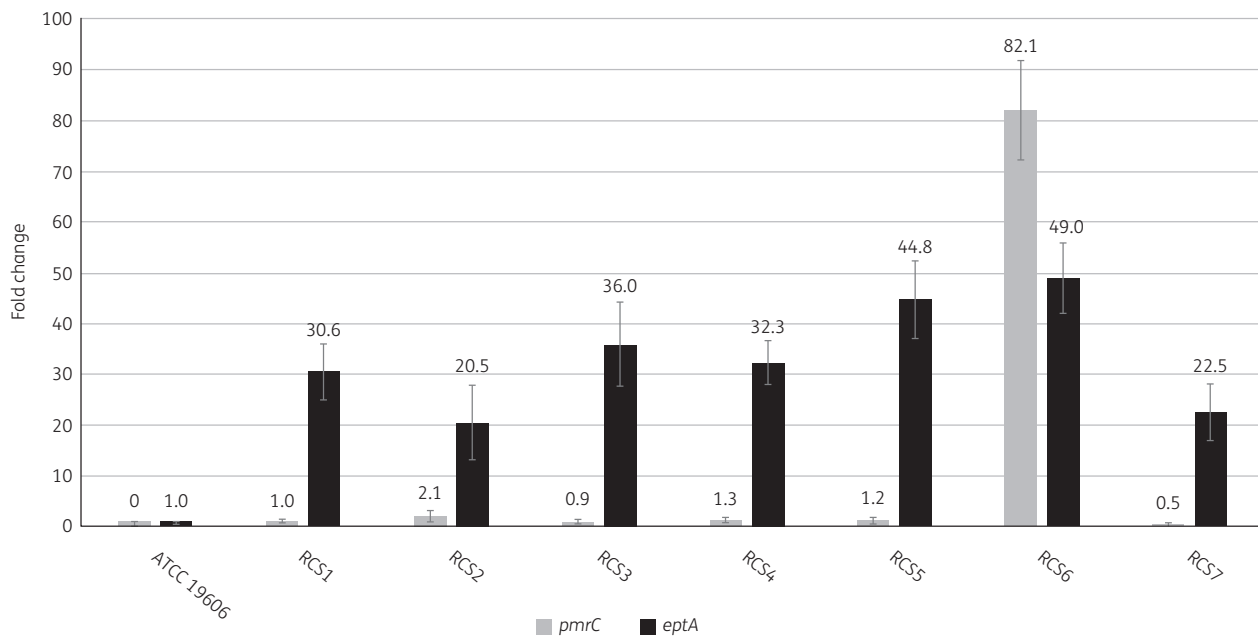
The clinical strains showed the same growth kinetics and colony morphology as those of strain ATCC 19606 (data not shown), which suggests a minimal impact of *eptA* derepression on bacterial fitness. In addition, the insertion of *ISAbal* upstream of *eptA* turned out to be rather stable since no colistin-susceptible revertants could be obtained after 30 serial passages in drug-free medium (data not shown).

### MALDIXin test

It was recently shown that the mass spectrum of colistin-resistant *A. baumannii* is characterized by two sets of peaks centred at *m/z* 1935.3 and *m/z* 2033.3.<sup>20</sup> These peaks correspond to *m/z* +25 and *m/z* +123 shifts of mass unit of the native lipid A at *m/z* 1910.3 and are due to pEtN-modified-monophosphorylated and



**Figure 2.** Schematic representation of the genomic region upstream of *eptA*. Open black arrows represent coding sequences and indicate the direction of transcription. The *ISAbal* element is represented by an open grey arrow. Black triangles represent the direct repeats of the IS. *A. baumannii* strain Aba lacks a sequence of 165 bp between the TonB-dependent receptor- and EptA-encoding genes (accession number CP030083). Nucleotide positions of the elements are indicated above the sequence maps.



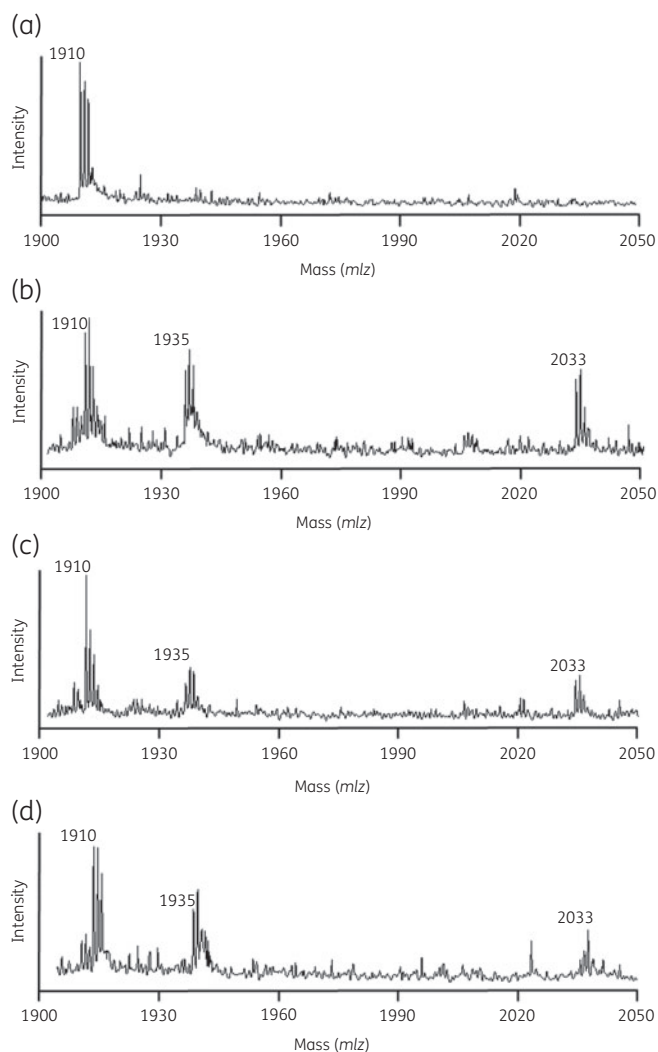
**Figure 3.** Relative expression of genes *pmrC* (grey bars) and *eptA* (black bars) in selected clinical strains as compared with *A. baumannii* ATCC 19606. Values presented are means of three independent experiments.

pEtN-modified-bisphosphorylated hepta-acyl lipid A, respectively. As expected, the two specific peaks at *m/z* 1935.3 and *m/z* 2033.3 related to pEtN-modified lipid A were detected in three tested isolates (Figure 4).

## Discussion

The increasing prevalence of colistin-resistant *A. baumannii* is becoming a major challenge in many hospitals. The present work

describes an intrinsic mechanism that contributes to the evolution of *A. baumannii* towards pandrug resistance. Seven out of 27 colistin-resistant *A. baumannii* were found to overexpress the *pmrC* homologue *eptA*, likely as a result of proximal insertion of *ISAbal*, a genetic element prevalent in *A. baumannii* genomes.<sup>26</sup> By providing a strong promoter in *cis*, *ISAbal*-like elements activate dormant resistance genes such as *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>ADC</sub> and *bla*<sub>OXA-23-like</sub>.<sup>25,26</sup> In the studied isolates, insertion of *ISAbal* occurred at different positions upstream of *eptA* (13, 18 and 156 bp), through



**Figure 4.** Representative spectra of a colistin-susceptible *A. baumannii* isolate (a) and three colistin-resistant *A. baumannii* strains (RCS1, RCS2 and RCS3 in b, c and d, respectively). Peaks of interest are indicated. The peak at  $m/z$  1935.3 corresponds to the addition of pEtN to the phosphate group at position 4' of native lipid A of *A. baumannii* with concomitant loss of the phosphate residue at position 1, and the peak at  $m/z$  2033.3 corresponds to the addition of one pEtN to the phosphate group at position 1 of native lipid A of *A. baumannii*.

distinct genetic events. However, the *eptA* mRNA levels did not correlate with the distance between *ISAbA1* and the *eptA* transcription start. Compared with ATCC 19606, these transcripts levels were from 22.5- to 44.8-fold higher for an *ISAbA1-eptA* distance of 13 bp, 20.5-fold higher for a distance of 18 bp and 49-fold higher in strain RCS6, where *ISAbA1* is inserted 156 bp upstream of *eptA*. The impact of enzyme EptA on colistin MIC (32 mg/L) for strain RCS6 is unclear because the pEtN transferase PmrC is up-regulated in this bacterium. In addition, the variations in colistin MICs (from 4 to 256 mg/L) observed among the six strains harbouring a WT *pmrCAB* locus suggest the involvement of PmrC-independent mechanisms of resistance in addition to EptA, as proposed elsewhere.<sup>14,15</sup>

Inactivation of an H-NS-like regulator by *ISAbA125* was recently reported as a cause of *eptA-1* overexpression and colistin

resistance in a mutant of *A. baumannii* selected under colistin therapy. Disruption of this global regulator had an important impact on cell physiology, as illustrated by the dysregulation of ~150 genes and strongly defective growth.<sup>12</sup> In our strains, insertion of *ISAbA1* upstream of *eptA* constituted a more straightforward way of *eptA* activation, which did not impair bacterial growth under standard laboratory conditions. While some *pmrB* mutants are known to be considerably less invasive than WT counterparts,<sup>28</sup> it remains to be determined whether EptA-dependent decoration of lipid A by pEtN somehow affects *A. baumannii* pathogenicity.

According to the Pasteur MLST scheme, all seven strains belonged to ST2, while they were distributed into four different STs with respect to the Oxford scheme. ST208 (1-3-3-2-2-97-3) and ST451 (1-3-3-2-2-142-3) are single-locus variants of ST218 (1-3-3-2-2-102-3), this latter differing from ST1634 by two alleles (1-62-3-2-2-164-3). The identification of several STs and three different insertion sites for *ISAbA1* in the *eptA*-overexpressing strains supports the notion of distinct genetic events occurring in close, but different, genomic backgrounds. This hypothesis is consistent with our wgMLST data since the seven isolates did not cluster together and were distributed among other ST2 strains.

The *eptA* gene seems to be common among *A. baumannii* isolates. Of 32 colistin-susceptible isolates analysed by the French NRC-AR, 27 (84%) were *eptA* positive, but none of them harboured a copy of *ISAbA1* upstream of the gene (data not shown). Lesho et al.<sup>27</sup> detected the presence of *eptA* homologues (*eptA-1* and *eptA-2*) in addition to *pmrC* in ~20% of 116 *A. baumannii* strains. Considering that *ISAbA1*-like elements and *eptA* genes are rather prevalent in *A. baumannii*, emergence of colistin resistance due to random insertion events should not be rare in nosocomial strains submitted to recurrent colistin treatments. While this manuscript was in preparation, four other *ISAbA1-eptA* colistin-resistant isolates were characterized in our laboratory (data not shown). In addition, two isogenic strains overexpressing *eptA* were isolated in Spain.<sup>29</sup> Overall, this study emphasizes the complexity and diversity of resistance mechanisms to colistin in clinical *A. baumannii*.

## Funding

The French National Reference Centre for Antibiotic Resistance (NRC-AR) is funded by the French Ministry of Health through the Santé publique France agency.

## Transparency declarations

None to declare.

## Supplementary data

Tables S1 and S2 are available as [Supplementary data](#) at JAC Online.

## References

- Wong D, Nielsen TB, Bonomo RA et al. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges. *Clin Microbiol Rev* 2017; **30**: 409–47.
- Antunes LC, Visca P, Towner KJ. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog Dis* 2014; **71**: 292–301.

- 3 Sampson TR, Liu X, Schroeder MR *et al.* Rapid killing of *Acinetobacter baumannii* by polymyxins is mediated by a hydroxyl radical death pathway. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 5642–9.
- 4 Giamarellou H. Epidemiology of infections caused by polymyxin-resistant pathogens. *Int J Antimicrob Agents* 2016; **48**: 614–21.
- 5 Jeannot K, Bolard A, Plésiat P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents* 2017; **49**: 526–35.
- 6 Nowak J, Zander E, Stefanik D *et al.* High incidence of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial. *J Antimicrob Chemother* 2017; **72**: 3277–82.
- 7 Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S *et al.* Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 3628–34.
- 8 Arroyo LA, Herrera CM, Fernandez L *et al.* The *pmrCAB* operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 3743–51.
- 9 Chin CY, Gregg KA, Napier BA *et al.* A PmrB-regulated deacetylase required for lipid A modification and polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; **59**: 7911–4.
- 10 Moffatt JH, Harper M, Harrison P *et al.* Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 4971–7.
- 11 Beceiro A, Moreno A, Fernandez N *et al.* Biological cost of different mechanisms of colistin resistance and their impact on virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 518–26.
- 12 Deveson Lucas D, Crane B, Wright A *et al.* Emergence of high-level colistin resistance in an *Acinetobacter baumannii* clinical isolate mediated by inactivation of the global regulator H-NS. *Antimicrob Agents Chemother* 2018; **62**: e02442-17.
- 13 Lima WG, Alves MC, Cruz WS *et al.* Chromosomally encoded and plasmid-mediated polymyxins resistance in *Acinetobacter baumannii*: a huge public health threat. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018; **37**: 1009–19.
- 14 Thi Khanh NN, Riordan DW, Do Hoang Nhu T *et al.* The induction and identification of novel colistin resistance mutations in *Acinetobacter baumannii* and their implications. *Sci Rep* 2016; **6**: 28291.
- 15 Pelletier MR, Casella LG, Jones JW *et al.* Unique structural modifications are present in the lipopolysaccharide from colistin-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 4831–40.
- 16 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing—Twenty-Eighth Edition: M100*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2018.
- 17 Haenni M, Bour M, Chatre P *et al.* Resistance of animal strains of *Pseudomonas aeruginosa* to carbapenems. *Front Microbiol* 2017; **8**: 1847.
- 18 Jousset AB, Bernabeu S, Bonnin RA *et al.* Development and validation of a multiplex PCR assay for the detection of the five families of plasmid-encoded colistin resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2019; **53**: 302–9.
- 19 Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T *et al.* Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 2012; **40**: e115.
- 20 Dortet L, Potron A, Bonnin RA *et al.* Rapid detection of colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* using MALDI-TOF-based lipidomics on intact bacteria. *Sci Rep* 2018; **8**: 16910.
- 21 Lee SY, Oh MH, Yun SH *et al.* Genomic characterization of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain, KAB03 belonging to ST451 from Korea. *Infect Genet Evol* 2018; **65**: 150–8.
- 22 Fang Y, Quan J, Hua X *et al.* Complete genome sequence of *Acinetobacter baumannii* XH386 (ST208), a multi-drug resistant bacteria isolated from pediatric hospital in China. *Genom Data* 2016; **7**: 269–74.
- 23 Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 268–81.
- 24 Zankari E, Hasman H, Cosentino S *et al.* Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 2640–4.
- 25 Lee CR, Lee JH, Park M *et al.* Biology of *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, antibiotic resistance mechanisms, and prospective treatment options. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; **7**: 55.
- 26 Lopes BS, Amyes SG. Role of ISAb1 and ISAb125 in governing the expression of *bla*ADC in clinically relevant *Acinetobacter baumannii* strains resistant to cephalosporins. *J Med Microbiol* 2012; **61**: 1103–8.
- 27 Lesho E, Yoon EJ, McGann P *et al.* Emergence of colistin-resistance in extremely drug-resistant *Acinetobacter baumannii* containing a novel *pmrCAB* operon during colistin therapy of wound infections. *J Infect Dis* 2013; **208**: 1142–51.
- 28 Pournaras S, Poulou A, Dafopoulou K *et al.* Growth retardation, reduced invasiveness, and impaired colistin-mediated cell death associated with colistin resistance development in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 828–32.
- 29 Gerson S, Betts JW, Lucassen K *et al.* Investigation of novel *pmrB* and *eptA* mutations in isogenic *Acinetobacter baumannii* isolates associated with colistin resistance and increased virulence *in vivo*. *Antimicrob Agents Chemother* 2019; **63**: e01586-18.



## **VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---

- Abraham, N., and Kwon, D.H. (2009). A single amino acid substitution in PmrB is associated with polymyxin B resistance in clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* *298*, 249–254.
- Aendekerk, S., Ghysels, B., Cornelis, P., and Baysse, C. (2002). Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiol. Read. Engl.* *148*, 2371–2381.
- Aendekerk, S., Diggle, S.P., Song, Z., Høiby, N., Cornelis, P., Williams, P., and Cámara, M. (2005). The MexGHI-OpmD multidrug efflux pump controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. *Microbiol. Read. Engl.* *151*, 1113–1125.
- Ahn, S., Jung, J., Jang, I.-A., Madsen, E.L., and Park, W. (2016). Role of Glyoxylate Shunt in Oxidative Stress Response. *J. Biol. Chem.* *291*, 11928–11938.
- Ainsworth, G.C., Brown, A.M., and Brownlee, G. (1947). Aerosporin, an antibiotic produced by *Bacillus aerosporus* Greer. *Nature* *159*, 263.
- Aires, J.R., Köhler, T., Nikaido, H., and Plésiat, P. (1999). Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* *43*, 2624–2628.
- Akama, H., Matsuura, T., Kashiwagi, S., Yoneyama, H., Narita, S.-I., Tsukihara, T., Nakagawa, A., and Nakae, T. (2004). Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* *279*, 25939–25942.
- Alguel, Y., Meng, C., Terán, W., Krell, T., Ramos, J.L., Gallegos, M.-T., and Zhang, X. (2007). Crystal Structures of Multidrug Binding Protein TtgR in Complex with Antibiotics and Plant Antimicrobials. *J. Mol. Biol.* *369*, 829–840.
- Alguel, Y., Lu, D., Quade, N., Sauter, S., and Zhang, X. (2010). Crystal structure of MexZ, a key repressor responsible for antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Struct. Biol.* *172*, 305–310.
- de Almeida, L.G., Ortiz, J.H., Schneider, R.P., and Spira, B. (2015). *phoU* inactivation in *Pseudomonas aeruginosa* enhances accumulation of ppGpp and polyphosphate. *Appl. Environ. Microbiol.* *81*, 3006–3015.
- Almuzara, M., Radice, M., de Gárate, N., Kossman, A., Cuirolo, A., Santella, G., Famiglietti, A., Gutkind, G., and Vay, V. (2007). VIM-2-producing *Pseudomonas putida*, Buenos Aires. *Emerg. Infect. Dis.* *13*, 668–669.

Andersen, C., Koronakis, E., Bokma, E., Eswaran, J., Humphreys, D., Hughes, C., and Koronakis, V. (2002). Transition to the open state of the TolC periplasmic tunnel entrance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 11103–11108.

del Barrio-Tofiño, E., Zamorano, L., Cortes-Lara, S., López-Causapé, C., Sánchez-Diener, I., Cabot, G., Bou, G., Martínez-Martínez, L., Oliver, A., Galán, F., et al. (2019). Spanish nationwide survey on *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial resistance mechanisms and epidemiology. *J. Antimicrob. Chemother.* *74*, 1825–1835.

Barrow, K., and Kwon, D.H. (2009). Alterations in two-component regulatory systems of *phoPQ* and *pmrAB* are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *53*, 5150–5154.

Beinlich, K.L., Chuanchuen, R., and Schweizer, H.P. (2001). Contribution of multidrug efflux pumps to multiple antibiotic resistance in veterinary clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* *198*, 129–134.

Benedict, R.G., and Langlykke, A.F. (1947). Antibiotic activity of *Bacillus polymyxa*. *J. Bacteriol.* *54*, 24.

Bhagirath, A.Y., Li, Y., Patidar, R., Yerey, K., Ma, X., Kumar, A., and Duan, K. (2019). Two Component Regulatory Systems and Antibiotic Resistance in Gram-Negative Pathogens. *Int. J. Mol. Sci.* *20*.

Bhattacharya, D., Dey, S., Kadam, S., Kalal, S., Jali, S., Koley, H., Sinha, R., Nag, D., Kholkute, S.D., and Roy, S. (2015). Isolation of NDM-1-producing multidrug-resistant *Pseudomonas putida* from a paediatric case of acute gastroenteritis, India. *New Microbes New Infect.* *5*, 5–9.

Biswas, S., Brunel, J.-M., Dubus, J.-C., Reynaud-Gaubert, M., and Rolain, J.-M. (2012). Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* *10*, 917–934.

Blair, J.M.A., and Piddock, L.J.V. (2009). Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Curr. Opin. Microbiol.* *12*, 512–519.

Blair, J.M., Richmond, G.E., and Piddock, L.J. (2014). Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. *Future Microbiol.* *9*, 1165–1177.

Bogaerts, P., Huang, T.-D., Rodriguez-Villalobos, H., Bauraing, C., Deplano, A., Struelens, M.J., and Glupczynski, Y. (2008). Nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas putida* isolates producing VIM-2 and VIM-4 metallo- $\beta$ -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* *61*, 749–751.

Bolard, A., Schniederjans, M., Haussler, S., Triponney, P., Valot, B., Plesiat, P., and Jeannot, K. (2019). Production of norspermidine contributes to aminoglycoside resistance in *pmrAB* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*

- Bouallègue, O., Mzoughi, R., Weill, F.-X., Mahdhaoui, N., Ben Salem, Y., Sboui, H., Grimont, F., and Grimont, P. a. D. (2004). Outbreak of *Pseudomonas putida* bacteraemia in a neonatal intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* *57*, 88–91.
- Breaker, R.R., Atilho, R.M., Malkowski, S.N., Nelson, J.W., and Sherlock, M.E. (2017). The Biology of Free Guanidine As Revealed by Riboswitches. *Biochemistry (Mosc.)* *56*, 345–347.
- Bricio-Moreno, L., Sheridan, V.H., Goodhead, I., Armstrong, S., Wong, J.K.L., Waters, E.M., Sarsby, J., Panagiotou, S., Dunn, J., Chakraborty, A., et al. (2018). Evolutionary trade-offs associated with loss of PmrB function in host-adapted *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Commun.* *9*, 2635.
- Bryan, L.E., and Kwan, S. (1983). Roles of ribosomal binding, membrane potential, and electron transport in bacterial uptake of streptomycin and gentamicin. *Antimicrob. Agents Chemother.* *23*, 835–845.
- Busse, H.J., Wöstmann, C., and Bakker, E.P. (1992). The bactericidal action of streptomycin: membrane permeabilization caused by the insertion of mistranslated proteins into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* and subsequent caging of the antibiotic inside the cells due to degradation of these proteins. *J. Gen. Microbiol.* *138*, 551–561.
- Cabot, G., Ocampo-Sosa, A.A., Domínguez, M.A., Gago, J.F., Juan, C., Tubau, F., Rodríguez, C., Moyà, B., Peña, C., Martínez-Martínez, L., et al. (2012). Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 6349–6357.
- Cai, W., Wannemuehler, Y., Dell’Anna, G., Nicholson, B., Barbieri, N.L., Kariyawasam, S., Feng, Y., Logue, C.M., Nolan, L.K., and Li, G. (2013). A Novel Two-Component Signaling System Facilitates Uropathogenic *Escherichia coli*’s Ability to Exploit Abundant Host Metabolites. *PLoS Pathog.* *9*.
- Carpenter, R.J., Hartzell, J.D., Forsberg, J.A., Babel, B.S., and Ganesan, A. (2008). *Pseudomonas putida* war wound infection in a US Marine: a case report and review of the literature. *J. Infect.* *56*, 234–240.
- Castanheira, M., Doyle, T.B., Smith, C.J., Mendes, R.E., and Sader, H.S. (2019). Combination of MexAB-OprM overexpression and mutations in efflux regulators, PBPs and chaperone proteins is responsible for ceftazidime/avibactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from US hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* *74*, 2588–2595.
- Caughlan, R.E., Sriram, S., Daigle, D.M., Woods, A.L., Bucu, J., Peterson, R.L., Dzik-Fox, J., Walker, S., and Dean, C.R. (2009). Fmt bypass in *Pseudomonas aeruginosa* causes induction of MexXY efflux pump expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* *53*, 5015–5021.
- Chambers, J.R., and Sauer, K. (2013). The MerR-like regulator BrIR impairs *Pseudomonas aeruginosa* biofilm tolerance to colistin by repressing PhoPQ. *J. Bacteriol.* *195*, 4678–4688.

- Chen, C.C., and Feingold, D.S. (1972). Locus of divalent cation inhibition of the bactericidal action of polymyxin B. *Antimicrob. Agents Chemother.* *2*, 331–335.
- Chen, L., and Duan, K. (2016). A PhoPQ-Regulated ABC Transporter System Exports Tetracycline in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *60*, 3016–3024.
- Chen, C.-H., Hsiu, R.-H., Liu, C.-E., and Young, T.-G. (2005). *Pseudomonas putida* bacteremia due to soft tissue infection contracted in a flooded area of central Taiwan: a case report. *J. Microbiol. Immunol. Infect. Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi* *38*, 293–295.
- Chen, D., Yang, L., Peters, B.M., Liu, J., Li, L., Li, B., Xu, Z., and Shirtliff, M.E. (2019). Complete Sequence of a Novel Multidrug-Resistant *Pseudomonas putida* Strain Carrying Two Copies of qnrVC6. *Microb. Drug Resist. Larchmt. N* *25*, 1–7.
- Chen, Y., Sun, M., Wang, M., Lu, Y., and Yan, Z. (2014). Dissemination of IMP-6-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST244 in multiple cities in China. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *33*, 1181–1187.
- Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bodilis, J., Maillot, O., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M.G.J., Orange, N., Dufour, A., and Cornelis, P. (2017). Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS Microbiol. Rev.* *41*, 698–722.
- Choi, K.-H., and Schweizer, H.P. (2006). mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Protoc.* *1*, 153–161.
- Choi, K.-H., Kumar, A., and Schweizer, H.P. (2006). A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J. Microbiol. Methods* *64*, 391–397.
- Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T.T., Becher, A., Karkhoff-Schweizer, R.R., and Schweizer, H.P. (2001). Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrob. Agents Chemother.* *45*, 428–432.
- Chuanchuen, R., Narasaki, C.T., and Schweizer, H.P. (2002). The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *J. Bacteriol.* *184*, 5036–5044.
- Chuanchuen, R., Murata, T., Gotoh, N., and Schweizer, H.P. (2005). Substrate-dependent utilization of OprM or OpmH by the *Pseudomonas aeruginosa* MexJK efflux pump. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 2133–2136.
- Clausell, A., Pujol, M., Alsina, M.A., and Cajal, Y. (2003). Influence of polymyxins on the structural dynamics of *Escherichia coli* lipid membranes. *Talanta* *60*, 225–234.

Daigle, D.M., Cao, L., Fraud, S., Wilke, M.S., Pacey, A., Klinoski, R., Strynadka, N.C., Dean, C.R., and Poole, K. (2007). Protein modulator of multidrug efflux gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *189*, 5441–5451.

Delmar, J.A., Su, C.-C., and Yu, E.W. (2013). Structural mechanisms of heavy-metal extrusion by the Cus efflux system. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* *26*, 593–607.

Deris, Z.Z., Akter, J., Sivanesan, S., Roberts, K.D., Thompson, P.E., Nation, R.L., Li, J., and Velkov, T. (2014). A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *J. Antibiot. (Tokyo)* *67*, 147–151.

Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., and 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.

Dixon, R.A., and Chopra, I. (1986). Leakage of periplasmic proteins from *Escherichia coli* mediated by polymyxin B nonapeptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* *29*, 781–788.

Docquier, J.-D., Riccio, M.L., Mugnaioli, C., Luzzaro, F., Endimiani, A., Toniolo, A., Amicosante, G., and Rossolini, G.M. (2003). IMP-12, a new plasmid-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* *47*, 1522–1528.

Dolan, S.K., and Welch, M. (2018). The Glyoxylate Shunt, 60 Years On. *Annu. Rev. Microbiol.* *72*, 309–330.

Döring, G., Conway, S.P., Heijerman, H.G., Hodson, M.E., Høiby, N., Smyth, A., and Touw, D.J. (2000). Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur. Respir. J.* *16*, 749–767.

Duque, E., Segura, A., Mosqueda, G., and Ramos, J.L. (2001). Global and cognate regulators control the expression of the organic solvent efflux pumps TtgABC and TtgDEF of *Pseudomonas putida*. *Mol. Microbiol.* *39*, 1100–1106.

Eda, S., Maseda, H., and Nakae, T. (2003). An elegant means of self-protection in gram-negative bacteria by recognizing and extruding xenobiotics from the periplasmic space. *J. Biol. Chem.* *278*, 2085–2088.

Edrington, T.C., Kintz, E., Goldberg, J.B., and Tamm, L.K. (2011). Structural Basis for the Interaction of Lipopolysaccharide with Outer Membrane Protein H (OprH) from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* *286*, 39211–39223.

Eicher, T., Cha, H., Seeger, M.A., Brandstätter, L., El-Delik, J., Bohnert, J.A., Kern, W.V., Verrey, F., Grütter, M.G., Diederichs, K., et al. (2012). Transport of drugs by the multidrug transporter AcrB involves an access and a deep binding pocket that are separated by a switch-loop. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 5687–5692.

- Eicher, T., Seeger, M.A., Anselmi, C., Zhou, W., Brandstätter, L., Verrey, F., Diederichs, K., Faraldo-Gómez, J.D., and Pos, K.M. (2014). Coupling of remote alternating-access transport mechanisms for protons and substrates in the multidrug efflux pump AcrB. *ELife* 3.
- El’Garch, F., Jeannot, K., Hocquet, D., Llanes-Barakat, C., and Plésiat, P. (2007). Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1016–1021.
- Ernst, R.K., Yi, E.C., Guo, L., Lim, K.B., Burns, J.L., Hackett, M., and Miller, S.I. (1999). Specific lipopolysaccharide found in cystic fibrosis airway *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 286, 1561–1565.
- Espinosa-Urgel, M., Serrano, L., Ramos, J.L., and Fernández-Escamilla, A.M. (2015). Engineering Biological Approaches for Detection of Toxic Compounds: A New Microbial Biosensor Based on the *Pseudomonas putida* TtgR Repressor. *Mol. Biotechnol.* 57, 558–564.
- Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J., and Poole, K. (1998). Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 180, 5443–5447.
- Falagas, M.E., and Kasiakou, S.K. (2005). Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 40, 1333–1341.
- Fernández, L., and Hancock, R.E.W. (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 661–681.
- Fernández, L., Gooderham, W.J., Bains, M., McPhee, J.B., Wiegand, I., and Hancock, R.E.W. (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., Jenssen, H., Bains, M., Wiegand, I., Gooderham, W.J., and Hancock, R.E.W. (2012). The two-component system CprRS senses cationic peptides and triggers adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa* independently of ParRS. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 6212–6222.
- Fernández, M., Duque, E., Pizarro-Tobías, P., Van Dillewijn, P., Wittich, R.-M., and Ramos, J.L. (2009). Microbial responses to xenobiotic compounds. Identification of genes that allow *Pseudomonas putida* KT2440 to cope with 2,4,6-trinitrotoluene. *Microb. Biotechnol.* 2, 287–294.
- Fetar, H., Gilmour, C., Klinoski, R., Daigle, D.M., Dean, C.R., and 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.

- Fiett, J., Baraniak, A., Mrówka, A., Fleischer, M., Drulis-Kawa, Z., Naumiuk, Ł., Samet, A., Hryniewicz, W., and Gniadkowski, M. (2006). Molecular epidemiology of acquired-metallo-beta-lactamase-producing bacteria in Poland. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 880–886.
- Finking, R., and Marahiel, M.A. (2004). Biosynthesis of nonribosomal peptides<sup>1</sup>. *Annu. Rev. Microbiol.* *58*, 453–488.
- Fournier, D., Richardot, C., Müller, E., Robert-Nicoud, M., Llanes, C., Plésiat, P., and Jeannot, K. (2013). Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* *68*, 1772–1780.
- Franke, S., Grass, G., Rensing, C., and Nies, D.H. (2003). Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *185*, 3804–3812.
- Fraud, S., and Poole, K. (2011). Oxidative stress induction of the MexXY multidrug efflux genes and promotion of aminoglycoside resistance development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 1068–1074.
- Fraud, S., Campigotto, A.J., Chen, Z., and Poole, K. (2008). MexCD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement in chlorhexidine resistance and induction by membrane-damaging agents dependent upon the AlgU stress response sigma factor. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 4478–4482.
- Frimodt-Møller, J., Rossi, E., Haagenen, J.A.J., Falcone, M., Molin, S., and Johansen, H.K. (2018). Mutations causing low level antibiotic resistance ensure bacterial survival in antibiotic-treated hosts. *Sci. Rep.* *8*, 12512.
- Gellatly, S.L., and Hancock, R.E.W. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog. Dis.* *67*, 159–173.
- George, K.W., Kagle, J., Junker, L., Risen, A., and Hay, A.G. (2011). Growth of *Pseudomonas putida* F1 on styrene requires increased catechol-2,3-dioxygenase activity, not a new hydrolase. *Microbiol. Read. Engl.* *157*, 89–98.
- Gibson, D.T., Koch, J.R., and Kallio, R.E. (1968). Oxidative degradation of aromatic hydrocarbons by microorganisms. I. Enzymic formation of catechol from benzene. *Biochemistry (Mosc.)* *7*, 2653–2662.
- Gilarranz, R., Juan, C., Castillo-Vera, J., Chamizo, F.J., Artiles, F., Álamo, I., and Oliver, A. (2013). First detection in Europe of the metallo-β-lactamase IMP-15 in clinical strains of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *19*, E424-427.
- Godoy, P., Molina-Henares, A.J., de la Torre, J., Duque, E., and Ramos, J.L. (2010). Characterization of the RND family of multidrug efflux pumps: in silico to in vivo confirmation of four functionally distinct subgroups. *Microb. Biotechnol.* *3*, 691–700.



- Gómez-Zorrilla, S., Juan, C., Cabot, G., Camoez, M., Tubau, F., Oliver, A., Dominguez, M.A., Ariza, J., and Peña, C. (2016). Impact of multidrug resistance on the pathogenicity of *Pseudomonas aeruginosa*: in vitro and in vivo studies. *Int. J. Antimicrob. Agents* 47, 368–374.
- Gomila, M., Peña, A., Mulet, M., Lalucat, J., and García-Valdés, E. (2015). Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. *Front. Microbiol.* 6.
- Gong, T., Xu, X., Dang, Y., Kong, A., Wu, Y., Liang, P., Wang, S., Yu, H., Xu, P., and Yang, C. (2018). An engineered *Pseudomonas putida* can simultaneously degrade organophosphates, pyrethroids and carbamates. *Sci. Total Environ.* 628–629, 1258–1265.
- Gooderham, W.J., Gellatly, S.L., Sanschagrin, F., McPhee, J.B., Bains, M., Cosseau, C., Levesque, R.C., and Hancock, R.E.W. (2009). The sensor kinase PhoQ mediates virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Read. Engl.* 155, 699–711.
- Gotoh, N., Tsujimoto, H., Poole, K., Yamagishi, J., and Nishino, T. (1995). The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by oprK of the mexA-mexB-oprK multidrug resistance operon. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 2567–2569.
- Gotoh, N., Tsujimoto, H., Tsuda, M., Okamoto, K., Nomura, A., Wada, T., Nakahashi, M., and Nishino, T. (1998). Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in DeltamexA-mexB-oprM mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1938–1943.
- Guan, L., Ehrmann, M., Yoneyama, H., and Nakae, T. (1999). Membrane Topology of the Xenobiotic-exporting Subunit, MexB, of the MexA,B-OprM Extrusion Pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 274, 10517–10522.
- Guazzaroni, M.-E., Teran, W., Zhang, X., Gallegos, M.-T., and Ramos, J.L. (2004). TtgV Bound to a Complex Operator Site Represses Transcription of the Promoter for the Multidrug and Solvent Extrusion TtgGHI Pump. *J. Bacteriol.* 186, 2921–2927.
- Guénard, S., Muller, C., Monlezun, L., Benas, P., Broutin, I., Jeannot, K., and Plésiat, P. (2014). Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 221–228.
- Gutu, A.D., Sgambati, N., Strasbourger, P., Brannon, M.K., Jacobs, M.A., Haugen, E., Kaul, R.K., Johansen, H.K., Høiby, N., and Moskowitz, S.M. (2013). Polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* phoQ mutants is dependent on additional two-component regulatory systems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2204–2215.
- Gutu, A.D., Rodgers, N.S., Park, J., and Moskowitz, S.M. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* high-level resistance to polymyxins and other antimicrobial peptides requires cprA, a gene that is disrupted in the PAO1 strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 5377–5387.
- Hächler, H., Santanam, P., and Kayser, F.H. (1996). Sequence and characterization of a novel chromosomal aminoglycoside phosphotransferase gene, aph (3')-IIb, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 1254–1256.

- Haenni, M., Bour, M., Châtre, P., Madec, J.-Y., Plésiat, P., and Jeannot, K. (2017). Resistance of Animal Strains of *Pseudomonas aeruginosa* to Carbapenems. *Front. Microbiol.* *8*.
- Haidar, G., Philips, N.J., Shields, R.K., Snyder, D., Cheng, S., Potoski, B.A., Doi, Y., Hao, B., Press, E.G., Cooper, V.S., et al. (2017). Ceftolozane-Tazobactam for the Treatment of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections: Clinical Effectiveness and Evolution of Resistance. *Clin. Infect. Dis.* *65*, 110–120.
- Hainrichson, M., Yaniv, O., Cherniavsky, M., Nudelman, I., Shallom-Shezifi, D., Yaron, S., and Baasov, T. (2007). Overexpression and initial characterization of the chromosomal aminoglycoside 3'-O-phosphotransferase APH(3')-IIb from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 774–776.
- Hall, C.W., Zhang, L., and Mah, T.-F. (2017). PA3225 Is a Transcriptional Repressor of Antibiotic Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *61*.
- Hamana, K. (1997). Polyamine distribution patterns within the families Aeromonadaceae, Vibrionaceae, Pasteurellaceae, and Halomonadaceae, and related genera of the gamma subclass of the Proteobacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* *43*, 49–59.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* *166*, 557–580.
- Hancock, R.E.W., and Brinkman, F.S.L. (2002). Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annu. Rev. Microbiol.* *56*, 17–38.
- Handing, J.W., Ragland, S.A., Bharathan, U.V., and Criss, A.K. (2018). The MtrCDE Efflux Pump Contributes to Survival of *Neisseria gonorrhoeae* From Human Neutrophils and Their Antimicrobial Components. *Front. Microbiol.* *9*.
- Hay, I.D., Wang, Y., Moradali, M.F., Rehman, Z.U., and Rehm, B.H.A. (2014). Genetics and regulation of bacterial alginate production. *Environ. Microbiol.* *16*, 2997–3011.
- Hay, T., Fraud, S., Lau, C.H.-F., Gilmour, C., and Poole, K. (2013). Antibiotic inducibility of the mexXY multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the MexZ anti-repressor ArmZ. *PLoS One* *8*, e56858.
- He, G.-X., Kuroda, T., Mima, T., Morita, Y., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2004). An H(+)-coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family of transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *186*, 262–265.
- Heacock-Kang, Y., Sun, Z., Zarzycki-Siek, J., Poonsuk, K., McMillan, I.A., Chuanchuen, R., and Hoang, T.T. (2018). Two Regulators, PA3898 and PA2100, Modulate the *Pseudomonas aeruginosa* Multidrug Resistance MexAB-OprM and EmrAB Efflux Pumps and Biofilm Formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* *62*.

- Helander, I.M., and Mattila-Sandholm, T. (2000). Fluorometric assessment of gram-negative bacterial permeabilization. *J. Appl. Microbiol.* *88*, 213–219.
- Henríquez, T., Stein, N.V., and Jung, H. (2019). PvdRT-OpmQ and MdtABC-OpmB efflux systems are involved in pyoverdine secretion in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol. Rep.* *11*, 98–106.
- Herrero, M., de Lorenzo, V., and 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.
- Hesse, C., Schulz, F., Bull, C.T., Shaffer, B.T., Yan, Q., Shapiro, N., Hassan, K.A., Varghese, N., Elbourne, L.D.H., Paulsen, I.T., et al. (2018). Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas* spp. *Environ. Microbiol.* *20*, 2142–2159.
- Hinz, A., Lee, S., Jacoby, K., and Manoil, C. (2011). Membrane Proteases and Aminoglycoside Antibiotic Resistance  $\nabla$ . *J. Bacteriol.* *193*, 4790–4797.
- Hocquet, D., Nordmann, P., El Garch, F., Cabanne, L., and Plésiat, P. (2006). Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 1347–1351.
- Hocquet, D., Roussel-Delvallez, M., Cavallo, J.-D., and Plésiat, P. (2007). MexAB-OprM- and MexXY-overproducing mutants are very prevalent among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to ticarcillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 1582–1583.
- Hocquet, D., Muller, A., Blanc, K., Plésiat, P., Talon, D., Monnet, D.L., and Bertrand, X. (2008). Relationship between antibiotic use and incidence of MexXY-OprM overproducers among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 1173–1175.
- Holmgaard, D.B., Hansen, F., Hasman, H., Justesen, U.S., and Hammerum, A.M. (2017). Characterization of a novel blaIMP gene, blaIMP-58, using whole genome sequencing in a *Pseudomonas putida* isolate detected in Denmark. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* *87*, 68–70.
- Holyoake, J., Caulfeild, V., Baldwin, S.A., and Sansom, M.S.P. (2006). Modeling, Docking, and Simulation of the Major Facilitator Superfamily. *Biophys. J.* *91*, L84–L86.
- Hong, J.S., Yoon, E.-J., Song, W., Seo, Y.B., Shin, S., Park, M.-J., Jeong, S.H., and Lee, K. (2018). Molecular Characterization of *Pseudomonas putida* Group Isolates Carrying blaVIM-2 Disseminated in a University Hospital in Korea. *Microb. Drug Resist. Larchmt.* *N 24*, 627–634.
- Hong, Z., Bolard, A., Giraud, C., Prévost, S., Genta-Jouve, G., Deregnacourt, C., Häussler, S., Jeannot, K., and Li, Y. (2019). Azetidine-Containing Alkaloids Produced by a Quorum-Sensing Regulated Nonribosomal Peptide Synthetase Pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *58*, 3178–3182.

- Horcajada, J.P., Montero, M., Oliver, A., Sorlí, L., Luque, S., Gómez-Zorrilla, S., Benito, N., and Grau, S. (2019). Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 32.
- Horii, T., Muramatsu, H., and Inuma, Y. (2005). Mechanisms of resistance to fluoroquinolones and carbapenems in *Pseudomonas putida*. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 643–647.
- Huang, C.-R., Lien, C.-Y., Tsai, W.-C., Lai, W.-A., Hsu, C.-W., Tsai, N.-W., Chang, C.-C., Lu, C.-H., Chien, C.-C., and Chang, W.-N. (2018). The clinical characteristics of adult bacterial meningitis caused by non-*Pseudomonas aeruginosa* *Pseudomonas* species: A clinical comparison with *Ps. aeruginosa* meningitis. *Kaohsiung J. Med. Sci.* 34, 49–55.
- Huergo, L.F., and Dixon, R. (2015). The Emergence of 2-Oxoglutarate as a Master Regulator Metabolite. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 79, 419–435.
- Hunter, R.C., and Newman, D.K. (2010). A putative ABC transporter, *hatABCDE*, is among molecular determinants of pyomelanin production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 192, 5962–5971.
- Imperi, F., Tiburzi, F., and Visca, P. (2009). Molecular basis of pyoverdine siderophore recycling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 20440–20445.
- Inoue, A., and Horikoshi, K. (1989). A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature* 338, 264–266.
- Isabella, V.M., Campbell, A.J., Manchester, J., Sylvester, M., Nayar, A.S., Ferguson, K.E., Tommasi, R., and Miller, A.A. (2015). Toward the rational design of carbapenem uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem. Biol.* 22, 535–547.
- Islam, S., Oh, H., Jalal, S., Karpati, F., Ciofu, O., Høiby, N., and Wretling, B. (2009). Chromosomal mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 60–66.
- Jeannot, K., Sobel, M.L., El Garch, F., Poole, K., and 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., and Plésiat, P. (2008). Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2455–2462.
- Jeannot, K., Bolard, A., and Plésiat, P. (2017). Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 49, 526–535.

- Jo, J.T.H., Brinkman, F.S.L., and Hancock, R.E.W. (2003). Aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of novel outer membrane proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* *47*, 1101–1111.
- Johnson, L., Mulcahy, H., Kanevets, U., Shi, Y., and Lewenza, S. (2012). Surface-localized spermidine protects the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane from antibiotic treatment and oxidative stress. *J. Bacteriol.* *194*, 813–826.
- Jones, A.K., Woods, A.L., Takeoka, K.T., Shen, X., Wei, J.-R., Caughlan, R.E., and Dean, C.R. (2017). Determinants of Antibacterial Spectrum and Resistance Potential of the Elongation Factor G Inhibitor Argyrin B in Key Gram-Negative Pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* *61*.
- Juan, C., Torrens, G., González-Nicolau, M., and Oliver, A. (2017). Diversity and regulation of intrinsic  $\beta$ -lactamases from non-fermenting and other Gram-negative opportunistic pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* *41*, 781–815.
- Juarez, P., Jeannot, K., Plésiat, P., and Llanes, C. (2017). Toxic Electrophiles Induce Expression of the Multidrug Efflux Pump MexEF-OprN in *Pseudomonas aeruginosa* through a Novel Transcriptional Regulator, CmrA. *Antimicrob. Agents Chemother.* *61*.
- Kaniga, K., Delor, I., and 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.
- Kawalek, A., Modrzejewska, M., Zieniuk, B., Bartosik, A.A., and Jagura-Burdzy, G. (2019). Interaction of ArmZ with the DNA-binding domain of MexZ induces expression of mexXY multidrug efflux pump genes and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.*
- Kieboom, J., and de Bont, J. (2001). Identification and molecular characterization of an efflux system involved in *Pseudomonas putida* S12 multidrug resistance. *Microbiol. Read. Engl.* *147*, 43–51.
- Kieboom, J., Dennis, J.J., de Bont, J.A., and Zylstra, G.J. (1998). Identification and molecular characterization of an efflux pump involved in *Pseudomonas putida* S12 solvent tolerance. *J. Biol. Chem.* *273*, 85–91.
- Kim, J., Shin, B., Park, C., and Park, W. (2017). Indole-Induced Activities of  $\beta$ -Lactamase and Efflux Pump Confer Ampicillin Resistance in *Pseudomonas putida* KT2440. *Front. Microbiol.* *8*, 433.
- Kim, S.E., Park, S.-H., Park, H.B., Park, K.-H., Kim, S.-H., Jung, S.-I., Shin, J.-H., Jang, H.-C., and Kang, S.J. (2012). Nosocomial *Pseudomonas putida* Bacteremia: High Rates of Carbapenem Resistance and Mortality. *Chonnam Med. J.* *48*, 91.

- Koch-Weser, J., Sidel, V.W., Federman, E.B., Kanarek, P., Finer, D.C., and Eaton, A.E. (1970). Adverse effects of sodium colistimethate. Manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. *Ann. Intern. Med.* *72*, 857–868.
- Kocsis, B., Toth, A., Gulyas, D., Ligeti, B., Katona, K., Rokusz, L., and Szabo, D. (2019). Acquired qnrVC1 and blaNDM-1 resistance markers in an international high-risk *Pseudomonas aeruginosa* ST773 clone. *J. Med. Microbiol.* *68*, 336–338.
- Koh, T.H., Wang, G.C.Y., and Sng, L.-H. (2004). IMP-1 and a novel metallo-beta-lactamase, VIM-6, in fluorescent pseudomonads isolated in Singapore. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 2334–2336.
- Köhler, T., Kok, M., Michea-Hamzhepour, M., Plesiat, P., Gotoh, N., Nishino, T., Curty, L.K., and Pechere, J.C. (1996). Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *40*, 2288–2290.
- Köhler, T., Michéa-Hamzhepour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L.K., and Pechère, J.C. (1997a). Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* *23*, 345–354.
- Köhler, T., Michea-Hamzhepour, M., Plesiat, P., Kahr, A.L., and Pechere, J.C. (1997b). Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *41*, 2540–2543.
- Köhler, T., Epp, S.F., Curty, L.K., and Pechère, J.C. (1999). Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *181*, 6300–6305.
- Kong, L., Liu, Z., Hu, X., and Liu, S. (2011). Interaction of polymyxin B with ds-DNA, and determination of DNA or polymyxin B via resonance Rayleigh scattering and resonance non-linear scattering spectra. *Microchim. Acta* *173*, 207–213.
- Korcova, J., Koprnova, J., Krcmery, V., and Krcmery, V. (2005). Bacteraemia due to *Pseudomonas putida* and other *Pseudomonas non-aeruginosa* in children. *J. Infect.* *51*, 81.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., and Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* *405*, 914.
- Korshunova, T.Y., Ramírez-Bahena, M.-H., Chetverikov, S.P., Igual, J.M., Peix, Á., and Loginov, O. (2016). *Pseudomonas turukhanskensis* sp. nov., isolated from oil-contaminated soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *66*, 4657–4664.
- Kreamer, N.N., Costa, F., and Newman, D.K. (2015). The ferrous iron-responsive BqsRS two-component system activates genes that promote cationic stress tolerance. *MBio* *6*, e02549.

- Krell, T., Terán, W., Mayorga, O.L., Rivas, G., Jiménez, M., Daniels, C., Molina-Henares, A.-J., Martínez-Bueno, M., Gallegos, M.-T., and Ramos, J.-L. (2007). Optimization of the palindromic order of the TtgR operator enhances binding cooperativity. *J. Mol. Biol.* *369*, 1188–1199.
- Kuroda, T., and Tsuchiya, T. (2009). Multidrug efflux transporters in the MATE family. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* *1794*, 763–768.
- Kwon, D.H., and Lu, C.-D. (2006). Polyamines Increase Antibiotic Susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 1623–1627.
- Lacks, S., and Greenberg, B. (1977). Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *J. Mol. Biol.* *114*, 153–168.
- Lam, J.S., Taylor, V.L., Islam, S.T., Hao, Y., and Kocíncová, D. (2011). Genetic and Functional Diversity of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide. *Front. Microbiol.* *2*.
- Lamarche, M.G., and Déziel, E. (2011). MexEF-OprN efflux pump exports the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) precursor HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline). *PLoS One* *6*, e24310.
- Lau, C.H.-F., Fraud, S., Jones, M., Peterson, S.N., and Poole, K. (2012). Reduced expression of the *rplU-rpmA* ribosomal protein operon in *mexXY*-expressing pan-aminoglycoside-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 5171–5179.
- Lau, C.H.-F., Fraud, S., Jones, M., Peterson, S.N., and Poole, K. (2013). Mutational activation of the AmgRS two-component system in aminoglycoside-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *57*, 2243–2251.
- Lau, C.H.-F., Hughes, D., and Poole, K. (2014). MexY-promoted aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of a putative proximal binding pocket in aminoglycoside recognition. *MBio* *5*, e01068.
- Lau, C.H.-F., Krahn, T., Gilmour, C., Mullen, E., and Poole, K. (2015). AmgRS-mediated envelope stress-inducible expression of the *mexXY* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *MicrobiologyOpen* *4*, 121–135.
- Lee, J.-Y., and Ko, K.S. (2014). Mutations and expression of PmrAB and PhoPQ related with colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* *78*, 271–276.
- Lee, A., Mao, W., Warren, M.S., Mistry, A., Hoshino, K., Okumura, R., Ishida, H., and Lomovskaya, O. (2000). Interplay between Efflux Pumps May Provide Either Additive or Multiplicative Effects on Drug Resistance. *J. Bacteriol.* *182*, 3142–3150.
- Lee, D.G., Urbach, J.M., Wu, G., Liberati, N.T., Feinbaum, R.L., Miyata, S., Diggins, L.T., He, J., Saucier, M., Déziel, E., et al. (2006). Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.* *7*, R90.

- Lee, J.-Y., Lim, M.H., Heo, S.T., and Ko, K.S. (2012). Repeated isolation of *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to both polymyxins and carbapenems from 1 patient. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* *72*, 267–271.
- Lee, K., Lim, J.B., Yum, J.H., Yong, D., Chong, Y., Kim, J.M., and Livermore, D.M. (2002). bla(VIM-2) cassette-containing novel integrons in metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 1053–1058.
- Lee, K., Park, A.J., Kim, M.Y., Lee, H.J., Cho, J.-H., Kang, J.O., Yong, D., and Chong, Y. (2009a). 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.* *50*, 335–339.
- Lee, S., Hinz, A., Bauerle, E., Angermeyer, A., Juhaszova, K., Kaneko, Y., Singh, P.K., and Manoil, C. (2009b). Targeting a bacterial stress response to enhance antibiotic action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 14570–14575.
- Li, X.-Z., and Poole, K. (1999). Organic solvent-tolerant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* display multiple antibiotic resistance. *Can. J. Microbiol.* *45*, 18–22.
- Li, J., Nation, R.L., Milne, R.W., Turnidge, J.D., and Coulthard, K. (2005). Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. *Int. J. Antimicrob. Agents* *25*, 11–25.
- Li, J., Nation, R.L., Turnidge, J.D., Milne, R.W., Coulthard, K., Rayner, C.R., and Paterson, D.L. (2006). Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect. Dis.* *6*, 589–601.
- Li, K., Xu, C., Jin, Y., Sun, Z., Liu, C., Shi, J., Chen, G., Chen, R., Jin, S., and Wu, W. (2013). SuhB Is a Regulator of Multiple Virulence Genes and Essential for Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio* *4*, e00419-13.
- Li, X.-Z., Zhang, L., Srikumar, R., and Poole, K. (1998).  $\beta$ -Lactamase Inhibitors Are Substrates for the Multidrug Efflux Pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *42*, 399–403.
- Li, X.-Z., Poole, K., and Nikaido, H. (2003a). Contributions of MexAB-OprM and an EmrE homolog to intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides and dyes. *Antimicrob. Agents Chemother.* *47*, 27–33.
- Li, X.-Z., Plésiat, P., and Nikaido, H. (2015). The Challenge of Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* *28*, 337–418.
- Li, Y., Mima, T., Komori, Y., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2003b). A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* *52*, 572–575.



- Liang, Z., Chen, Y., Chen, Y., Cheng, Y., and Zhang, L. (2016). RND efflux pump and its interrelationship with quorum sensing system. *Yi Chuan Hered.* *38*, 894–901.
- Liao, J., and Sauer, K. (2012). The MerR-like transcriptional regulator BrIR contributes to *Pseudomonas aeruginosa* biofilm tolerance. *J. Bacteriol.* *194*, 4823–4836.
- Liao, J., Schurr, M.J., and Sauer, K. (2013). The MerR-like regulator BrIR confers biofilm tolerance by activating multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J. Bacteriol.* *195*, 3352–3363.
- Liapis, E., Bour, M., Triponney, P., Jové, T., Zahar, J.-R., Valot, B., Jeannot, K., and Plésiat, P. (2019). Identification of Diverse Integron and Plasmid Structures Carrying a Novel Carbapenemase Among *Pseudomonas* Species. *Front. Microbiol.* *10*.
- Lister, P.D., Wolter, D.J., and 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, M., Luo, X., Zhang, L., Dai, J., Wang, Y., Tang, Y., Li, J., Sun, T., and Fang, C. (2009). *Pseudomonas xinjiangensis* sp. nov., a moderately thermotolerant bacterium isolated from desert sand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *59*, 1286–1289.
- Liu, Y., Liu, K., Yu, X., Li, B., and Cao, B. (2014). Identification and control of a *Pseudomonas* spp (*P. fulva* and *P. putida*) bloodstream infection outbreak in a teaching hospital in Beijing, China. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* *23*, 105–108.
- Llanes, C., Hocquet, D., Vogne, C., Benali-Baitich, D., Neuwirth, C., and 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., and 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.
- Loh, K.-C., and Cao, B. (2008). Paradigm in biodegradation using *Pseudomonas putida*—A review of proteomics studies. *Enzyme Microb. Technol.* *43*, 1–12.
- Loh, B., Grant, C., and Hancock, R.E. (1984). Use of the fluorescent probe 1-N-phenyl-naphthylamine to study the interactions of aminoglycoside antibiotics with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *26*, 546–551.
- Lombardi, G., Luzzaro, F., Docquier, J.-D., Riccio, M.L., Perilli, M., Coli, A., Amicosante, G., Rossolini, G.M., and Toniolo, A. (2002). Nosocomial Infections Caused by Multidrug-Resistant Isolates of *Pseudomonas putida* Producing VIM-1 Metallo- $\beta$ -Lactamase. *J. Clin. Microbiol.* *40*, 4051–4055.

- Macfarlane, E.L., Kwasnicka, A., Ochs, M.M., and Hancock, R.E. (1999). PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Mol. Microbiol.* *34*, 305–316.
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., et al. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *18*, 268–281.
- Marchand, I., Damier-Piolle, L., Courvalin, P., and Lambert, T. (2004). Expression of the RND-Type Efflux Pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* Is Regulated by the AdeRS Two-Component System. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 3298–3304.
- Martínez-García, E., and de Lorenzo, V. (2011). Engineering multiple genomic deletions in Gram-negative bacteria: analysis of the multi-resistant antibiotic profile of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* *13*, 2702–2716.
- Martínez-Ramos, I., Mulet, X., Moyá, B., Barbier, M., Oliver, A., and Albertí, S. (2014). Overexpression of MexCD-OprJ reduces *Pseudomonas aeruginosa* virulence by increasing its susceptibility to complement-mediated killing. *Antimicrob. Agents Chemother.* *58*, 2426–2429.
- Marvig, R.L., Sommer, L.M., Molin, S., and Johansen, H.K. (2015). Convergent evolution and adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* within patients with cystic fibrosis. *Nat. Genet.* *47*, 57–64.
- Maseda, H., Yoneyama, H., and Nakae, T. (2000). 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., and 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.
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., and Nishino, T. (2000a). Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *44*, 3322–3327.
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., and Nishino, T. (2000b). Contribution of the MexX-MexY-OprM Efflux System to Intrinsic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *44*, 2242.
- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., and Nishino, T. (2001). Hypersusceptibility of the *Pseudomonas aeruginosa* nfxB mutant to beta-lactams due to reduced expression of the ampC beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* *45*, 1284–1286.

- Matsuo, Y., Eda, S., Gotoh, N., Yoshihara, E., and Nakae, T. (2004). MexZ-mediated regulation of mexXY multidrug efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa* by binding on the mexZ-mexX intergenic DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* *238*, 23–28.
- McPhee, J.B., Lewenza, S., and Hancock, R.E.W. (2003). Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* *50*, 205–217.
- McPhee, J.B., Bains, M., Winsor, G., Lewenza, S., Kwasnicka, A., Brazas, M.D., Brinkman, F.S.L., and Hancock, R.E.W. (2006). Contribution of the PhoP-PhoQ and PmrA-PmrB Two-Component Regulatory Systems to Mg<sup>2+</sup>-Induced Gene Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *188*, 3995–4006.
- Mendes, R.E., Castanheira, M., Toleman, M.A., Sader, H.S., Jones, R.N., and Walsh, T.R. (2007). Characterization of an integron carrying bla<sub>IMP</sub>-1 and a new aminoglycoside resistance gene, aac(6′)-31, and its dissemination among genetically unrelated clinical isolates in a Brazilian hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 2611–2614.
- Meylan, S., Porter, C.B.M., Yang, J.H., Belenky, P., Gutierrez, A., Lobritz, M.A., Park, J., Kim, S.H., Moskowitz, S.M., and Collins, J.J. (2017). Carbon Sources Tune Antibiotic Susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* via Tricarboxylic Acid Cycle Control. *Cell Chem. Biol.* *24*, 195–206.
- Mikolosko, J., Bobyk, K., Zgurskaya, H.I., and Ghosh, P. (2006). Conformational flexibility in the multidrug efflux system protein AcrA. *Struct. Lond. Engl.* *14*, 577–587.
- Mima, T., Sekiya, H., Mizushima, T., Kuroda, T., and Tsuchiya, T. (2005). Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.* *49*, 999–1002.
- Mima, T., Joshi, S., Gomez-Escalada, M., and Schweizer, H.P. (2007). Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins. *J. Bacteriol.* *189*, 7600–7609.
- Mima, T., Kohira, N., Li, Y., Sekiya, H., Ogawa, W., Kuroda, T., and Tsuchiya, T. (2009). Gene cloning and characteristics of the RND-type multidrug efflux pump MuxABC-OpmB possessing two RND components in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Read. Engl.* *155*, 3509–3517.
- Mine, T., Morita, Y., Kataoka, A., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (1999). Expression in *Escherichia coli* of a New Multidrug Efflux Pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *43*, 415–417.
- Misra, R., and Bavro, V.N. (2009). Assembly and transport mechanism of tripartite drug efflux systems. *Biochim. Biophys. Acta* *1794*, 817–825.

- Molina-Santiago, C., Udaondo, Z., Gómez-Lozano, M., Molin, S., and Ramos, J.-L. (2017). Global transcriptional response of solvent-sensitive and solvent-tolerant *Pseudomonas putida* strains exposed to toluene: *Pseudomonas putida* transcriptomics to toluene. *Environ. Microbiol.* *19*, 645–658.
- Moore, R.A., DeShazer, D., Reckseidler, S., Weissman, A., and Woods, D.E. (1999). Efflux-mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *43*, 465–470.
- Morita, Y., Kodama, K., Shiota, S., Mine, T., Kataoka, A., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (1998). NorM, a Putative Multidrug Efflux Protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and Its Homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *42*, 1778–1782.
- Morita, Y., Komori, Y., Mima, T., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2001a). Construction of a series of mutants lacking all of the four major mex operons for multidrug efflux pumps or possessing each one of the operons from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: MexCD-OprJ is an inducible pump. *FEMS Microbiol. Lett.* *202*, 139–143.
- Morita, Y., Kimura, N., Mima, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2001b). Roles of MexXY- and MexAB-multidrug efflux pumps in intrinsic multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Gen. Appl. Microbiol.* *47*, 27–32.
- Morita, Y., Cao, L., Gould, V.C., Avison, M.B., and 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., Gilmour, C., Metcalf, D., and Poole, K. (2009). Translational control of the antibiotic inducibility of the PA5471 gene required for mexXY multidrug efflux gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *191*, 4966–4975.
- Morita, Y., Tomida, J., and Kawamura, Y. (2012). Primary mechanisms mediating aminoglycoside resistance in the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate PA7. *Microbiol. Read. Engl.* *158*, 1071–1083.
- Moskowitz, S.M., Ernst, R.K., and Miller, S.I. (2004). PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *J. Bacteriol.* *186*, 575–579.
- Moskowitz, S.M., Brannon, M.K., Dasgupta, N., Pier, M., Sgambati, N., Miller, A.K., Selgrade, S.E., Miller, S.I., Denton, M., Conway, S.P., et al. (2012). PmrB Mutations Promote Polymyxin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Colistin-Treated Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 1019–1030.
- Mosqueda, G., and Ramos, J.L. (2000). A set of genes encoding a second toluene efflux system in *Pseudomonas putida* DOT-T1E is linked to the tod genes for toluene metabolism. *J. Bacteriol.* *182*, 937–943.

- Mulet, M., Gomila, M., Lemaitre, B., Lalucat, J., and García-Valdés, E. (2012). Taxonomic characterisation of *Pseudomonas* strain L48 and formal proposal of *Pseudomonas entomophila* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* *35*, 145–149.
- Mulet, X., Cabot, G., Ocampo-Sosa, A.A., Domínguez, M.A., Zamorano, L., Juan, C., Tubau, F., Rodríguez, C., Moyà, B., Peña, C., et al. (2013). Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. *Antimicrob. Agents Chemother.* *57*, 5527–5535.
- Muller, C., Plésiat, P., and 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.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., and Yamaguchi, A. (2002). Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* *419*, 587–593.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T., and Yamaguchi, A. (2006). Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* *443*, 173–179.
- Nakashima, R., Sakurai, K., Yamasaki, S., Nishino, K., and Yamaguchi, A. (2011). Structures of the multidrug exporter AcrB reveal a proximal multisite drug-binding pocket. *Nature* *480*, 565–569.
- Nakashima, R., Sakurai, K., Yamasaki, S., Hayashi, K., Nagata, C., Hoshino, K., Onodera, Y., Nishino, K., and Yamaguchi, A. (2013). Structural basis for the inhibition of bacterial multidrug exporters. *Nature* *500*, 102–106.
- Nandakumar, M., Nathan, C., and Rhee, K.Y. (2014). Isocitrate lyase mediates broad antibiotic tolerance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Commun.* *5*, 4306.
- Nation, R.L., Velkov, T., and Li, J. (2014). Colistin and Polymyxin B: Peas in a Pod, or Chalk and Cheese? *Clin. Infect. Dis.* *59*, 88–94.
- Nation, R.L., Li, J., Cars, O., Couet, W., Dudley, M.N., Kaye, K.S., Mouton, J.W., Paterson, D.L., Tam, V.H., Theuretzbacher, U., et al. (2015). Framework for optimisation of the clinical use of colistin and polymyxin B: the Prato polymyxin consensus. *Lancet Infect. Dis.* *15*, 225–234.
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Santos, V.A.P.M. dos, Fouts, D.E., Gill, S.R., Pop, M., Holmes, M., et al. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* *4*, 799–808.
- Nies, D.H. (1995). The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *177*, 2707–2712.

- Nies, D.H., Nies, A., Chu, L., and Silver, S. (1989). Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 7351–7355.
- Nikaido, H., and Takatsuka, Y. (2009). Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim. Biophys. Acta* *1794*, 769–781.
- Nowicki, E.M., O'Brien, J.P., Brodbelt, J.S., and Trent, M.S. (2015). Extracellular zinc induces phosphoethanolamine addition to *Pseudomonas aeruginosa* lipid A via the ColRS two-component system. *Mol. Microbiol.* *97*, 166–178.
- Ntreh, A.T., Weeks, J.W., Nickels, L.M., and Zgurskaya, H.I. (2016). Opening the Channel: the Two Functional Interfaces of *Pseudomonas aeruginosa* OpmH with the Triclosan Efflux Pump TriABC. *J. Bacteriol.* *198*, 3176–3185.
- Ochsner, U.A., Johnson, Z., and Vasil, M.L. (2000). Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Read. Engl.* *146 (Pt 1)*, 185–198.
- Ogura, K., Shimada, K., and Miyoshi-Akiyama, T. (2019). A multilocus sequence typing scheme of *Pseudomonas putida* for clinical and environmental isolates. *Sci. Rep.* *9*, 13980.
- Okazaki, T., and Hirai, K. (1992). Cloning and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* *nfxB* gene, conferring resistance to new quinolones. *FEMS Microbiol. Lett.* *97*, 197–202.
- Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C., and Juan, C. (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* *21–22*, 41–59.
- Omote, H., Hiasa, M., Matsumoto, T., Otsuka, M., and Moriyama, Y. (2006). The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends Pharmacol. Sci.* *27*, 587–593.
- Opperman, T.J., and Nguyen, S.T. (2015). Recent advances toward a molecular mechanism of efflux pump inhibition. *Front. Microbiol.* *6*, 421.
- Orelle, C., Mathieu, K., and Jault, J.-M. (2019). Multidrug ABC transporters in bacteria. *Res. Microbiol.*
- Padilla, E., Llobet, E., Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., Bengoechea, J.A., and Albertí, S. (2010). *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.* *54*, 177–183.
- Palavutitotai, N., Jitmuang, A., Tongchai, S., Kiratisin, P., and Angkasekwinai, N. (2018). Epidemiology and risk factors of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *PLoS One* *13*, e0193431.

- Palma, M., Zurita, J., Ferreras, J.A., Worgall, S., Larone, D.H., Shi, L., Campagne, F., and Quadri, L.E.N. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* SoxR does not conform to the archetypal paradigm for SoxR-dependent regulation of the bacterial oxidative stress adaptive response. *Infect. Immun.* *73*, 2958–2966.
- Parte, A.C. (2014). LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res.* *42*, D613–D616.
- Patel, G., and Bonomo, R.A. (2011). Status report on carbapenemases: challenges and prospects. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* *9*, 555–570.
- Paulsen, I.T., Nguyen, L., Sliwinski, M.K., Rabus, R., and Saier, M.H. (2000). Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes<sup>11</sup> Edited by G. von Heijne. *J. Mol. Biol.* *301*, 75–100.
- Péchy-Tarr, M., Bruck, D.J., Maurhofer, M., Fischer, E., Vogne, C., Henkels, M.D., Donahue, K.M., Grunder, J., Loper, J.E., and Keel, C. (2008). Molecular analysis of a novel gene cluster encoding an insect toxin in plant-associated strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Environ. Microbiol.* *10*, 2368–2386.
- Pederick, V.G., Eijkelkamp, B.A., Begg, S.L., Ween, M.P., McAllister, L.J., Paton, J.C., and McDevitt, C.A. (2015). ZnuA and zinc homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* *5*, 13139.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.-H., and Velázquez, E. (2018). The current status on the taxonomy of *Pseudomonas* revisited: An update. *Infect. Genet. Evol.* *57*, 106–116.
- Perz, J.F., Craig, A.S., Stratton, C.W., Bodner, S.J., Phillips, W.E., and Schaffner, W. (2005). *Pseudomonas putida* septicemia in a special care nursery due to contaminated flush solutions prepared in a hospital pharmacy. *J. Clin. Microbiol.* *43*, 5316–5318.
- Peter, S., Oberhettinger, P., Schuele, L., Dinkelacker, A., Vogel, W., Dörfel, D., Bezdan, D., Ossowski, S., Marschal, M., Liese, J., et al. (2017). Genomic characterisation of clinical and environmental *Pseudomonas putida* group strains and determination of their role in the transfer of antimicrobial resistance genes to *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Genomics* *18*, 859.
- Petitjean, M., Martak, D., Silvant, A., Bertrand, X., Valot, B., and Hocquet, D. (2017). Genomic characterization of a local epidemic *Pseudomonas aeruginosa* reveals specific features of the widespread clone ST395. *Microb. Genomics* *3*, e000129.
- Phoenix, P., Keane, A., Patel, A., Bergeron, H., Ghoshal, S., and Lau, P.C.K. (2003). Characterization of a new solvent-responsive gene locus in *Pseudomonas putida* F1 and its functionalization as a versatile biosensor. *Environ. Microbiol.* *5*, 1309–1327.
- Plésiat, P., and Nikaido, H. (1992). Outer membranes of Gram-negative bacteria are permeable to steroid probes. *Mol. Microbiol.* *6*, 1323–1333.

- Pletzer, D., Braun, Y., Dubiley, S., Lafon, C., Köhler, T., Page, M.G.P., Mourez, M., Severinov, K., and Weingart, H. (2015). The *Pseudomonas aeruginosa* PA14 ABC Transporter NppA1A2BCD Is Required for Uptake of Peptidyl Nucleoside Antibiotics. *J. Bacteriol.* *197*, 2217–2228.
- Poirel, L., Cabanne, L., Collet, L., and Nordmann, P. (2006). Class II transposon-borne structure harboring metallo-beta-lactamase gene blaVIM-2 in *Pseudomonas putida*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 2889–2891.
- Poirel, L., Jayol, A., and Nordmann, P. (2017). Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin. Microbiol. Rev.* *30*, 557–596.
- Poole, K. (2001). Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* *3*, 255–264.
- Poole, K. (2014). Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: multidrug efflux and more. *Can. J. Microbiol.* *60*, 783–791.
- Poole, K., Krebs, K., McNally, C., and 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., and Bianco, N. (1996a). 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., Gotoh, N., Tsujimoto, H., Zhao, Q., Wada, A., Yamasaki, T., Neshat, S., Yamagishi, J., Li, X.Z., and Nishino, T. (1996b). Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* *21*, 713–724.
- Poole, K., Hay, T., Gilmour, C., and Fruci, M. (2019). The aminoglycoside resistance-promoting AmgRS envelope stress-responsive two-component system in *Pseudomonas aeruginosa* is zinc-activated and protects cells from zinc-promoted membrane damage. *Microbiology* *165*, 563–571.
- Prickett, M.H., Hauser, A.R., McColley, S.A., Cullina, J., Potter, E., Powers, C., and Jain, M. (2017). Aminoglycoside resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis results from convergent evolution in the mexZ gene. *Thorax* *72*, 40–47.
- Puja, H., Bolard, A., Noguès, A., Plésiat, P., and Jeannot, K. (2020). The Efflux Pump MexXY/OprM Contributes to the Tolerance and Acquired Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Colistin. *Antimicrob. Agents Chemother.* *64*.
- Pursell, A., Fruci, M., Mikalauskas, A., Gilmour, C., and Poole, K. (2015). EsrC, an envelope stress-regulated repressor of the mexCD-oprJ multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.* *17*, 186–198.



- Puzari, M., and Chetia, P. (2017). RND efflux pump mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: a major issue worldwide. *World J. Microbiol. Biotechnol.* *33*, 24.
- Ramaswamy, V.K., Vargiu, A.V., Mallocci, G., Dreier, J., and Ruggerone, P. (2018). Molecular Determinants of the Promiscuity of MexB and MexY Multidrug Transporters of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front. Microbiol.* *9*, 1144.
- Ramos, J.L., Duque, E., Huertas, M.J., and Haïdour, A. (1995). Isolation and expansion of the catabolic potential of a *Pseudomonas putida* strain able to grow in the presence of high concentrations of aromatic hydrocarbons. *J. Bacteriol.* *177*, 3911–3916.
- Ramos, J.L., Duque, E., Godoy, P., and Segura, A. (1998). Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* *180*, 3323–3329.
- Ramos, J.L., Duque, E., Gallegos, M.-T., Godoy, P., Ramos-Gonzalez, M.I., Rojas, A., Teran, W., and Segura, A. (2002). Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* *56*, 743–768.
- Ramos, J.-L., Sol Cuenca, M., Molina-Santiago, C., Segura, A., Duque, E., Gómez-García, M.R., Udaondo, Z., and Roca, A. (2015). Mechanisms of solvent resistance mediated by interplay of cellular factors in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Rev.* *39*, 555–566.
- Ranjitkar, S., Jones, A.K., Mostafavi, M., Zwirko, Z., Iartchouk, O., Barnes, S.W., Walker, J.R., Willis, T.W., Lee, P.S., and Dean, C.R. (2019). Target (MexB)- and Efflux-Based Mechanisms Decreasing the Effectiveness of the Efflux Pump Inhibitor D13-9001 in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: Uncovering a New Role for MexMN-OprM in Efflux of  $\beta$ -Lactams and a Novel Regulatory Circuit (MmnRS) Controlling MexMN Expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* *63*.
- Reddy, V.S., Shlykov, M.A., Castillo, R., Sun, E.I., and Saier, M.H. (2012). The major facilitator superfamily (MFS) revisited. *FEBS J.* *279*, 2022–2035.
- Richardot, C., Plésiat, P., Fournier, D., Monlezun, L., Broutin, I., and 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.
- Rocchetta, H.L., and Lam, J.S. (1997). Identification and functional characterization of an ABC transport system involved in polysaccharide export of A-band lipopolysaccharide in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *179*, 4713–4724.
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Méjean, V., and Foglino, M. (2000). Cell signalling by oligosaccharides. Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many? *Trends Microbiol.* *8*, 498–504.
- Rojas, A., Duque, E., Mosqueda, G., Golden, G., Hurtado, A., Ramos, J.L., and Segura, A. (2001). Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* *183*, 3967–3973.

- Rojas, A., Segura, A., Guazzaroni, M.E., Terán, W., Hurtado, A., Gallegos, M.T., and Ramos, J.L. (2003). In Vivo and In Vitro Evidence that TtgV Is the Specific Regulator of the TtgGHI Multidrug and Solvent Efflux Pump of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* *185*, 4755–4763.
- Rossolini, G.M., Luzzaro, F., Migliavacca, R., Mugnaioli, C., Pini, B., De Luca, F., Perilli, M., Pollini, S., Spalla, M., Amicosante, G., et al. (2008). First countrywide survey of acquired metallo-beta-lactamases in gram-negative pathogens in Italy. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 4023–4029.
- Ryan, K.J., Schainuck, L.I., Hickman, R.O., and Striker, G.E. (1969). Colistimethate toxicity. Report of a fatal case in a previously healthy child. *JAMA* *207*, 2099–2101.
- Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J., and Dowling, D.N. (2008a). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.* *278*, 1–9.
- Ryan, R.P., Fouhy, Y., Garcia, B.F., Watt, S.A., Niehaus, K., Yang, L., Tolker-Nielsen, T., and Dow, J.M. (2008b). Interspecies signalling via the *Stenotrophomonas maltophilia* diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* *68*, 75–86.
- Saderi, H., and Owlia, P. (2015). Detection of Multidrug Resistant (MDR) and Extremely Drug Resistant (XDR) *P. Aeruginosa* Isolated from Patients in Tehran, Iran. *Iran. J. Pathol.* *10*, 265–271.
- Saier, M.H., Tran, C.V., and Barabote, R.D. (2006). TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Res.* *34*, D181–D186.
- Sakhtah, H., Koyama, L., Zhang, Y., Morales, D.K., Fields, B.L., Price-Whelan, A., Hogan, D.A., Shepard, K., and Dietrich, L.E.P. (2016). The *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump MexGHI-OpmD transports a natural phenazine that controls gene expression and biofilm development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E3538-3547.
- Samin, G., Pavlova, M., Arif, M.I., Postema, C.P., Damborsky, J., and Janssen, D.B. (2014). A *Pseudomonas putida* strain genetically engineered for 1,2,3-trichloropropane bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* *80*, 5467–5476.
- Samonis, G., Vardakas, K.Z., Kofteridis, D.P., Dimopoulou, D., Andrianaki, A.M., Chatzinikolaou, I., Katsanevaki, E., Maraki, S., and Falagas, M.E. (2014). Characteristics, risk factors and outcomes of adult cancer patients with extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Infection* *42*, 721–728.
- Sánchez-Diener, I., Zamorano, L., López-Causapé, C., Cabot, G., Mulet, X., Peña, C., del Campo, R., Cantón, R., Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., et al. (2017). Interplay among Resistance Profiles, High-Risk Clones, and Virulence in the Caenorhabditis elegans *Pseudomonas aeruginosa* Infection Model. *Antimicrob. Agents Chemother.* *61*.

- Schindler, M., and Osborn, M.J. (1979). Interaction of divalent cations and polymyxin B with lipopolysaccharide. *Biochemistry (Mosc.)* 18, 4425–4430.
- Schurek, K.N., Marr, A.K., Taylor, P.K., Wiegand, I., Semenek, L., Khaira, B.K., and Hancock, R.E.W. (2008). Novel genetic determinants of low-level aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 4213–4219.
- Scotta, C., Juan, C., Cabot, G., Oliver, A., Lalucat, J., Bennisar, A., and Albertí, S. (2011). Environmental microbiota represents a natural reservoir for dissemination of clinically relevant metallo-beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 5376–5379.
- Sekiya, H., Mima, T., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (2003). Functional cloning and characterization of a multidrug efflux pump, mexHI-opmD, from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2990–2992.
- Sennhauser, G., Bukowska, M.A., Briand, C., and Grütter, M.G. (2009). Crystal structure of the multidrug exporter MexB from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* 389, 134–145.
- Shafer, W.M., Qu, X., Waring, A.J., and Lehrer, R.I. (1998). Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 1829–1833.
- Shawar, R.M., MacLeod, D.L., Garber, R.L., Burns, J.L., Stapp, J.R., Clausen, C.R., and Tanaka, S.K. (1999). Activities of tobramycin and six other antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2877–2880.
- Shi, J., Jin, Y., Bian, T., Li, K., Sun, Z., Cheng, Z., Jin, S., and Wu, W. (2015). SuhB is a novel ribosome associated protein that regulates expression of MexXY by modulating ribosome stalling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 98, 370–383.
- Silby, M.W., Winstanley, C., Godfrey, S.A.C., Levy, S.B., and Jackson, R.W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 652–680.
- Silhavy, T.J., Kahne, D., and Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000414.
- Sivaneson, M., Mikkelsen, H., Ventre, I., Bordi, C., and Filloux, A. (2011). Two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an intricate network mediating fimbrial and efflux pump gene expression. *Mol. Microbiol.* 79, 1353–1366.
- Smith, E.E., Buckley, D.G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L.R., D’Argenio, D.A., Miller, S.I., Ramsey, B.W., Speert, D.P., Moskowitz, S.M., et al. (2006). Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8487–8492.

Sobel, M.L., McKay, G.A., and Poole, K. (2003). Contribution of the MexXY multidrug transporter to aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* *47*, 3202–3207.

Sobel, M.L., Neshat, S., and Poole, K. (2005). 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.

Soon, R.L., Nation, R.L., Cockram, S., Moffatt, J.H., Harper, M., Adler, B., Boyce, J.D., Larson, I., and Li, J. (2011). Different surface charge of colistin-susceptible and -resistant *Acinetobacter baumannii* cells measured with zeta potential as a function of growth phase and colistin treatment. *J. Antimicrob. Chemother.* *66*, 126–133.

Souli, M., Galani, I., and Giamarellou, H. (2008). Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* *13*.

Souza Dias, M.B., Habert, A.B., Borrasca, V., Stempliuk, V., Ciolli, A., Araújo, M.R.E., Costa, S.F., and Levin, A.S. (2008). Salvage of long-term central venous catheters during an outbreak of *Pseudomonas putida* and *Stenotrophomonas maltophilia* infections associated with contaminated heparin catheter-lock solution. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* *29*, 125–130.

Spelman, D.W., Russo, P., Harrington, G., Davis, B.B., Rabinov, M., Smith, J.A., Spicer, W.J., and Esmore, D. (2000). Risk factors for surgical wound infection and bacteraemia following coronary artery bypass surgery. *Aust. N. Z. J. Surg.* *70*, 47–51.

Srikumar, R., Li, X.Z., and 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., Kon, T., Gotoh, N., and Poole, K. (1998). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* *42*, 65–71.

Stansly, P.G., Shepherd, R.G., and White, H.J. (1947). Polymyxin: a new chemotherapeutic agent. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* *81*, 43–54.

Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrener, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., et al. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* *406*, 959–964.

Sugawara, E., Nestorovich, E.M., Bezrukov, S.M., and Nikaido, H. (2006). *Pseudomonas aeruginosa* Porin OprF Exists in Two Different Conformations. *J. Biol. Chem.* *281*, 16220–16229.

Sun, F., Zhou, D., Wang, Q., Feng, J., Feng, W., Luo, W., Liu, Y., Qiu, X., Yin, Z., and Xia, P. (2016). Genetic characterization of a novel blaDIM-2-carrying megaplasmid p12969-DIM from clinical *Pseudomonas putida*. *J. Antimicrob. Chemother.* *71*, 909–912.

- Sun, X., Zahir, Z., Lynch, K.H., and Dennis, J.J. (2011). An Antirepressor, SrpR, Is Involved in Transcriptional Regulation of the SrpABC Solvent Tolerance Efflux Pump of *Pseudomonas putida* S12. *J. Bacteriol.* *193*, 2717–2725.
- Taber, H.W., Mueller, J.P., Miller, P.F., and Arrow, A.S. (1987). Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *51*, 439–457.
- Taconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D.L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., et al. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* *18*, 318–327.
- Tamber, S., Ochs, M.M., and Hancock, R.E.W. (2006). Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *188*, 45–54.
- Terán, W., Felipe, A., Segura, A., Rojas, A., Ramos, J.-L., and Gallegos, M.-T. (2003). Antibiotic-dependent induction of *Pseudomonas putida* DOT-T1E TtgABC efflux pump is mediated by the drug binding repressor TtgR. *Antimicrob. Agents Chemother.* *47*, 3067–3072.
- Terán, W., Krell, T., Ramos, J.L., and Gallegos, M.-T. (2006). Effector-repressor interactions, binding of a single effector molecule to the operator-bound TtgR homodimer mediates derepression. *J. Biol. Chem.* *281*, 7102–7109.
- Terán, W., Felipe, A., Fillet, S., Guazzaroni, M.-E., Krell, T., Ruiz, R., Ramos, J.L., and Gallegos, M.-T. (2007). Complexity in efflux pump control: cross-regulation by the paralogues TtgV and TtgT. *Mol. Microbiol.* *66*, 1416–1428.
- Tetard, A., Zedet, A., Girard, C., Plésiat, P., and Llanes, C. (2019). Cinnamaldehyde Induces Expression of Efflux Pumps and Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *63*.
- Tian, Z.-X., Yi, X.-X., Cho, A., O’Gara, F., and Wang, Y.-P. (2016). CpxR Activates MexAB-OprM Efflux Pump Expression and Enhances Antibiotic Resistance in Both Laboratory and Clinical nalB-Type Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS Pathog.* *12*, e1005932.
- Tikhonova, E.B., Wang, Q., and Zgurskaya, H.I. (2002). Chimeric Analysis of the Multicomponent Multidrug Efflux Transporters from Gram-Negative Bacteria. *J. Bacteriol.* *184*, 6499–6507.
- Treepong, P., Kos, V.N., Guyeux, C., Blanc, D.S., Bertrand, X., Valot, B., and Hocquet, D. (2018). Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. *Clin. Microbiol. Infect.* *24*, 258–266.
- Trent, M.S., Ribeiro, A.A., Lin, S., Cotter, R.J., and Raetz, C.R. (2001). An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *J. Biol. Chem.* *276*, 43122–43131.

- Trias, J., and Nikaido, H. (1990). Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *34*, 52–57.
- Trimble, M.J., Mlynářčik, P., Kolář, M., and Hancock, R.E.W. (2016). Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *6*.
- Tsakris, A., Tassios, P.T., Polydorou, F., Papa, A., Malaka, E., Antoniadis, A., and Legakis, N.J. (2003). Infrequent detection of acquired metallo-beta-lactamases among carbapenem-resistant *Pseudomonas* isolates in a Greek hospital. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *9*, 846–851.
- Tsutsumi, K., Yonehara, R., Ishizaka-Ikeda, E., Miyazaki, N., Maeda, S., Iwasaki, K., Nakagawa, A., and Yamashita, E. (2019a). Structures of the wild-type MexAB–OprM tripartite pump reveal its complex formation and drug efflux mechanism. *Nat. Commun.* *10*.
- Tsutsumi, K., Yonehara, R., Ishizaka-Ikeda, E., Miyazaki, N., Maeda, S., Iwasaki, K., Nakagawa, A., and Yamashita, E. (2019b). Structures of the wild-type MexAB–OprM tripartite pump reveal its complex formation and drug efflux mechanism. *Nat. Commun.* *10*, 1–10.
- Uzair, B., Kausar, R., Bano, S.A., Fatima, S., Badshah, M., Habiba, U., and Fasim, F. (2018). Isolation and Molecular Characterization of a Model Antagonistic *Pseudomonas aeruginosa* Divulging In Vitro Plant Growth Promoting Characteristics. *BioMed Res. Int.* *2018*, 6147380.
- Velkov, T., Thompson, P.E., Nation, R.L., and Li, J. (2010). Structure—Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. *J. Med. Chem.* *53*, 1898–1916.
- Velkov, T., Roberts, K.D., Nation, R.L., Thompson, P.E., and Li, J. (2013). Pharmacology of polymyxins: new insights into an “old” class of antibiotics. *Future Microbiol.* *8*, 711–724.
- Vettoretti, L., Plésiat, P., Muller, C., El Garch, F., Phan, G., Attrée, I., Ducruix, A., and Llanes, C. (2009). Efflux unbalance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* *53*, 1987–1997.
- Vogne, C., Aires, J.R., Bailly, C., Hocquet, D., and Plésiat, P. (2004). 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.* *48*, 1676–1680.
- Wang, D., Seeve, C., Pierson, L.S., and 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.
- Weeks, J.W., Nickels, L.M., Ntrel, A.T., and Zgurskaya, H.I. (2015). Non-equivalent roles of two periplasmic subunits in the function and assembly of triclosan pump TriABC from *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* *98*, 343–356.

- Westbrock-Wadman, S., Sherman, D.R., Hickey, M.J., Coulter, S.N., Zhu, Y.Q., Warrener, P., Nguyen, L.Y., Shawar, R.M., Folger, K.R., and Stover, C.K. (1999). Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* Efflux Pump Contributing to Aminoglycoside Impermeability. *Antimicrob. Agents Chemother.* *43*, 2975–2983.
- Westfall, L.W., Carty, N.L., Layland, N., Kuan, P., Colmer-Hamood, J.A., and Hamood, A.N. (2006). *mvaT* mutation modifies the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux operon *mexEF-oprN*. *FEMS Microbiol. Lett.* *255*, 247–254.
- Wilke, M.S., Heller, M., Creagh, A.L., Haynes, C.A., McIntosh, L.P., Poole, K., and Strynadka, N.C.J. (2008). The crystal structure of MexR from *Pseudomonas aeruginosa* in complex with its antirepressor ArmR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 14832–14837.
- Winsor, G.L., Griffiths, E.J., Lo, R., Dhillon, B.K., Shay, J.A., and Brinkman, F.S.L. (2016). Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database. *Nucleic Acids Res.* *44*, D646–D653.
- Wright, G.D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *57*, 1451–1470.
- Wu, C.-J., Huang, Y.-W., Lin, Y.-T., Ning, H.-C., and Yang, T.-C. (2016). Inactivation of SmeSyRy Two-Component Regulatory System Inversely Regulates the Expression of SmeYZ and SmeDEF Efflux Pumps in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS ONE* *11*.
- Wu, M., Wen, J., Chang, M., Yang, G., and Zhou, S. (2014). *Pseudomonas sihuiensis* sp. nov., isolated from a forest soil in South China. *Antonie Van Leeuwenhoek* *105*, 781–790.
- Yamamoto, M., Ueda, A., Kudo, M., Matsuo, Y., Fukushima, J., Nakae, T., Kaneko, T., and Ishigatsubo, Y. (2009). Role of MexZ and PA5471 in transcriptional regulation of *mexXY* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Read. Engl.* *155*, 3312–3321.
- Yang, L., Chen, L., Shen, L., Surette, M., and Duan, K. (2011). Inactivation of MuxABC-OpmB transporter system in *Pseudomonas aeruginosa* leads to increased ampicillin and carbenicillin resistance and decreased virulence. *J. Microbiol.* *49*, 107–114.
- Yao, X., Tao, F., Zhang, K., Tang, H., and Xu, P. (2017). Multiple Roles for Two Efflux Pumps in the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading *Pseudomonas putida* Strain B6-2 (DSM 28064). *Appl. Environ. Microbiol.* *83*.
- Yerushalmi, H., Lebendiker, M., and Schuldiner, S. (1995). EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa Multidrug Transporter, Exchanges Toxic Cations and H<sup>+</sup> and Is Soluble in Organic Solvents. *J. Biol. Chem.* *270*, 6856–6863.
- Yomoda, S., Okubo, T., Takahashi, A., Murakami, M., and Iyobe, S. (2003). Presence of *Pseudomonas putida* strains harboring plasmids bearing the metallo-beta-lactamase gene *bla*(IMP) in a hospital in Japan. *J. Clin. Microbiol.* *41*, 4246–4251.

- Yoneda, K., Chikumi, H., Murata, T., Gotoh, N., Yamamoto, H., Fujiwara, H., Nishino, T., and Shimizu, E. (2005). Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps by quantitative real-time polymerase chain reaction. *FEMS Microbiol. Lett.* *243*, 125–131.
- Yoshino, Y., Kitazawa, T., Kamimura, M., Tatsuno, K., Ota, Y., and Yotsuyanagi, H. (2011). *Pseudomonas putida* bacteremia in adult patients: five case reports and a review of the literature. *J. Infect. Chemother. Off. J. Jpn. Soc. Chemother.* *17*, 278–282.
- Yu, Z., Zhu, Y., Qin, W., Yin, J., and Qiu, J. (2017). Oxidative Stress Induced by Polymyxin E Is Involved in Rapid Killing of *Paenibacillus polymyxa*. *BioMed Res. Int.* *2017*, 5437139.
- Yuan, M., Chen, H., Zhu, X., Feng, J., Zhan, Z., Zhang, D., Chen, X., Zhao, X., Lu, J., Xu, J., et al. (2017). pSY153-MDR, a p12969-DIM-related mega plasmid carrying blaIMP-45 and armA, from clinical *Pseudomonas putida*. *Oncotarget* *8*, 68439–68447.
- Yun, B., Roberts, K.D., Thompson, P.E., Nation, R.L., Velkov, T., and Li, J. (2017). Design and Evaluation of Novel Polymyxin Fluorescent Probes. *Sensors* *17*.
- Zhou, J., Hao, D., Wang, X., Liu, T., He, C., Xie, F., Sun, Y., and Zhang, J. (2006). An important role of a “probable ATP-binding component of ABC transporter” during the process of *Pseudomonas aeruginosa* resistance to fluoroquinolone. *Proteomics* *6*, 2495–2503.



## Rôle de l'efflux actif de type RND dans la résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas sp.*

Les antibiotiques sont des molécules majeures de l'arsenal thérapeutique moderne contre les infections bactériennes. Cependant, ces dernières décennies ont vu naître émerger des souches résistantes, notamment chez le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*, reconnu comme cible prioritaire de développement de nouvelles stratégies thérapeutiques par l'Organisation Mondiale de la Santé. Son proche parent, *P. putida*, est rarement identifié dans des prélèvements cliniques mais sa capacité à acquérir des mécanismes de résistance en fait un excellent modèle d'étude. La surproduction des pompes d'efflux actif de la famille RND (*Resistance, Nodulation, Cell Division*) est l'un des mécanismes impliqués dans la résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Cette surproduction survient généralement suite à une altération de leur voie de régulation en raison d'une mutation génétique. Ces systèmes vont permettre d'exporter un large spectre d'antibiotiques, ce qui en fait un élément majeur du développement de souches multi-résistantes. La caractérisation de ces systèmes, de leurs substrats et de leur régulation est primordiale pour préserver l'activité des antibiotiques et designer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ce travail de thèse a été divisé en deux projets.

Au cours du premier projet, nous avons étudié les systèmes impliqués dans la résistance à la colistine chez *P. aeruginosa*, un peptide antimicrobien utilisé en dernier recours contre les souches multi-résistantes. Nous avons ainsi mis en évidence le rôle majeur joué par le système à deux composants (S2C) ParRS, qui contrôle l'expression de nombreux gènes, notamment l'opéron *arnBCADTEF-ugd* impliqué dans la synthèse et la fixation d'amino-arabinose sur le lipopolysaccharide, conférant une résistance à la colistine. Nous avons mis en évidence l'implication de la pompe RND MexXY(OprM), régulée par le S2C ParRS, dans la résistance à la colistine observée chez des mutants sélectionnés *in vitro* ainsi que des souches issues de prélèvements cliniques. La délétion de l'opéron *mexXY* conduit à une diminution de la résistance à la colistine de 16 à 128 fois chez les souches testées. Cependant, la surexpression de l'opéron *mexXY* chez la souche sensible PAO1 n'a pas suffi à conférer une résistance. La présence de la pompe est donc nécessaire, mais pas suffisante à l'obtention d'une résistance à la colistine, conférée par la surproduction de l'opéron *arn*. Cependant, le mécanisme par lequel MexXY(OprM) participe à la résistance n'est pas encore compris, et des études supplémentaires seront nécessaires pour mieux définir son rôle.

Le second projet a permis la caractérisation d'un nouveau système de type RND chez *P. putida*, capable de prendre en charge les aminosides, les macrolides, les fluoroquinolones et le céfépime et de participer à la résistance naturelle et acquise à ces molécules. Nous avons sélectionné *in vitro* un mutant issu de la souche de référence KT2440 qui était résistant à toutes les  $\beta$ -lactamines à l'exception de l'imipénème, aux aminosides, aux fluoroquinolones et aux macrolides. Ce mutant surproduisait deux pompes de type RND : la pompe TtgABC, ainsi qu'une pompe non caractérisée que nous avons nommée ParXY (pour *putida aminoglycoside resistance*). Le séquençage du génome de cette souche a montré qu'une inactivation du gène *sucD*, codant pour la succinyl-CoA synthétase du cycle de Krebs, était responsable de l'activation d'un S2C, que nous avons nommé ParRS, codé par un opéron de deux gènes directement en amont de l'opéron *parXY*. Ce système à deux composants était constitutivement actif dans le mutant *in vitro* et responsable de la co-activation de ParXY et TtgABC. La caractérisation d'une collection de souches cliniques de *P. putida* a montré l'existence d'une souche dans laquelle le gène *sucD* était inactivé avec un phénotype similaire au mutant *in vitro*. Dans l'ensemble, ce travail a permis de mieux comprendre le rôle des pompes RND chez *P. aeruginosa* et *P. putida*.

