



HAL
open science

Induction de la résistance aux antibiotiques chez la bactérie *pseudomonas aeruginosa* par les molécules électrophiles

Alexandre Tetard

► **To cite this version:**

Alexandre Tetard. Induction de la résistance aux antibiotiques chez la bactérie *pseudomonas aeruginosa* par les molécules électrophiles. *Biologie moléculaire*. Université Bourgogne Franche-Comté, 2021. Français. NNT : 2021UBFCE024 . tel-03854813

HAL Id: tel-03854813

<https://theses.hal.science/tel-03854813>

Submitted on 16 Nov 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 DE LA SANTE DE BESANCON**

ÉCOLE DOCTORALE N° 554 « ENVIRONNEMENTS-SANTÉ »

Doctorat de Science de la Vie et de la Santé

Par

M. Tetard Alexandre

INDUCTION DE LA RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES CHEZ LA BACTERIE

***PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PAR LES MOLECULES ELECTROPHILES**

Présentée et soutenue publiquement

Le 17 décembre 2021 à Besançon

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

UMR 6249 Chrono-Environnement

Membres du jury :

Pr Geneviève Hery-Arnaud	Université de Bretagne Occidentale	Rapportrice
Pr Jean-Michel Bolla	Université Aix-Marseille	Rapporteur
Pr Marie-Geneviève Dijoux-Franca	Université Claude Bernard Lyon 1	Examinatrice
Pr Jean-Marie Perrier-Cornet	Université Bourgogne Franche-Comté	Examineur
Dr Catherine Llanes	Université Bourgogne Franche-Comté	Directrice
Pr Patrick Plésiat	Université Bourgogne Franche-Comté	Co-directeur

Remerciements

Cette thèse est la concrétisation d'un travail multidisciplinaire, fruit de la collaboration avec des chercheurs de domaines différents que je souhaite citer dans ce manuscrit.

Pour commencer, je tiens à remercier sincèrement l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail. Tout d'abord Geneviève Hery-Arnaud (Faculté de Médecine de Brest) et Jean-Michel Bolla (Faculté de Médecine de Marseille), les rapporteurs de la thèse : vous avez accepté de consacrer du temps à ce manuscrit malgré la charge de travail qui vous incombe ; sachez que je suis sensible à l'honneur que vous me faites de siéger à mon jury de thèse. Je remercie également les examinateurs de ce jury, Marie-Geneviève Dijoux-Franca (Université Lyon 1, Claude Bernard) et Jean-Marie Perrier-Cornet (AgroSup, Université de Dijon) : votre présence rend ce jury composé d'experts issus de domaines différents qui, j'en suis sûr, apporteront de précieux conseils pour la suite à apporter à ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude.

Je veux également témoigner ma reconnaissance à Régis Delage-Mourroux (Laboratoire RIGHT, UFR des Sciences et des Techniques, Besançon) et à Christophe Bordi (Institut de Microbiologie de la Méditerranée, Marseille) pour leur participation aux entretiens annuels du CSST, le suivi de l'avancement de mon travail et leurs conseils sur les axes à développer.

Je remercie également mon co-directeur de thèse, Patrick Plésiat, pour son apport scientifique majeur tout au long de ce travail, mais aussi pour ses relectures rigoureuses des articles scientifiques et de ce manuscrit de thèse.

Un grand merci à ma directrice de thèse, Catherine Llanes pour m'avoir fait confiance lors de l'initiation de ce projet mais aussi pour son soutien et sa disponibilité en tout temps. Sa bonne humeur a permis à cette thèse de se dérouler très sereinement. Merci pour son accompagnement qui m'a permis de développer de nouvelles compétences.

Merci à Katy Jeannot et Anaïs Potron pour leur aide tout au long de cette thèse.

Il me semble important de remercier nos voisins chimistes de l'équipe PEPITE (UFR Santé, Besançon) qui m'ont donné de précieux conseils et ont permis l'accès à leur plateforme technique qui a permis la valorisation de deux publications. Merci à Andy Zedet, Yann Pellequer, Marc Pudlo, Corine Girard et Claire Chrétien.

Que toutes les personnes avec qui nous avons pu collaborer en dehors de l'Université de Franche-Comté trouvent ici l'expression de ma gratitude : Gaëtan Mislin et Estefania Olivia (Université de Strasbourg) pour leurs précieux conseils en chimie et pour l'utilisation de la RMN, ainsi que Jean-Michel Brunel (Université Aix-Marseille) pour nous avoir soufflé l'idée du tobracytril et avoir permis sa synthèse.

Merci à Isabelle Broutin et Gilles Phan, nos amis structuralistes de Paris Descartes que nous sollicitons régulièrement pour essayer de prédire les impacts des mutations sur les structures des protéines.

Je remercie également les collègues du laboratoire Chrono-Environnement : l'équipe de physiciens de Christophe Ramseyer, Sarah Foley, Freddy Torrealba Anzola et Bruno Cardey. Merci à Benoit Valot (plateforme B2ME, UFR Santé, Besançon) pour son aide en bio-informatique, son temps et sa patience.

Je remercie profondément mon ami Paulo Juarez (SMALTIS, Besançon), qui s'est toujours rendu disponible pour nous donner des conseils et nous a débloqué de situations qui semblaient sans issue.

Je remercie les microbiologistes et amies du laboratoire pour la bonne ambiance qu'elles ont instaurée durant toute cette thèse : merci à Susie, Aya, Soumaya, Ani, Charlotte, Chloé, Coralie, Adeline, Steffi, Audrey L, Audrey G, Sandra et Eline qui vient d'arriver et poursuit le projet sur les huiles essentielles. Merci à tous les stagiaires (Camil, Ilias, Mert, Samuel, Salomé B., Salomé K., Chaïma) qui sont passés dans notre équipe et qui se sont associés à mon travail sur les huiles essentielles, pour leur aide et leur bonne humeur.

Merci aux rares mecs du labo, Daniel pour les bonnes blagues. JB pour la bonne ambiance et nos extractions et productions de gel hydro clandestines, Malik, Loïs et Alban.

Je remercie mon père et ma mère pour leur aide durant mes études.

Merci à celle qui me soutient tous les jours.

Table des matières

.....	1
Liste des présentations orales	11
Abréviations	13
1. Introduction générale	15
2. Synthèse bibliographique	19
2.1 Différents types de résistance.....	19
2.1.1 Résistance innée.....	19
2.1.2 Résistance acquise	22
2.1.3 Résistance induite	23
2.2 Agents inducteurs de résistance	23
2.2.1 Résistance induite non-liée aux systèmes d'efflux	24
2.2.2 Résistance induite liée aux systèmes d'efflux.....	26
2.3 Agents inhibiteurs de résistance	36
2.3.1 Agents inhibiteurs d'enzymes inactivatrices.....	37
2.3.2 Agents limitant le nombre de cibles	37
2.3.3 Agents inhibiteurs de systèmes d'efflux	37
2.3.4 Agents perméabilisants	39
2.4 Les huiles essentielles (HEs)	40
2.4.1 Composition	41
2.4.2 Mode d'action	43
2.4.3 Utilisation des HEs dans les infections	45
2.4.4 Action combinée des HEs avec les antibiotiques	45
2.4.5 Mécanismes de défense bactérienne contre les HEs	48
2.4.6 Adaptation transitoire : l'efflux actif	48
2.4.7 Résistance aux HEs et mutations	49
2.5 Le cinnamaldéhyde	50
2.5.1 Chimie.....	50
2.5.2 Spectre d'action	51
2.5.3 Mode d'action	52
2.5.4 Impact du CNA sur la résistance aux antibiotiques.....	54
2.6 Le citral	54
2.6.1 Chimie.....	54

2.6.2	Spectre d'action	55
2.6.3	Mode d'action	56
2.6.4	Impact du citral sur la résistance aux antibiotiques	57
2.7	Electrophiles endogènes produits par l'hôte	58
3.	Résultats.....	61
3.1	Rôle du cinnamaldéhyde (CNA) dans l'induction transitoire de la résistance aux antibiotiques.....	61
3.1.1	Contexte et résumé.....	61
3.1.2	Article	64
3.1.3	Résultats complémentaires.....	86
3.2	Caractérisation de mutants résistants au cinnamaldéhyde.....	91
3.2.1	Contexte et résumé.....	91
3.2.2	Projet d'article	92
3.2.3	Résultats complémentaires.....	119
3.3	Effet du citral, un électrophile naturel non-phénolique, sur la résistance.....	123
3.3.1	Contexte et résumé.....	123
3.3.2	Article	126
3.3.3	Résultats complémentaires.....	145
3.4	Sensibilité des souches cliniques aux extraits d'huiles essentielles	150
3.4.1	Enquête sur la consommation d'huiles essentielles chez les patients CF du CRCM de Besançon.....	150
3.4.2	Evolution de la sensibilité des souches CF aux extraits d'huiles essentielles au cours du temps.....	153
3.4.3	Sensibilité aux HEs de souches cliniques non-CF MexAB ⁺	156
4.	Discussion.....	159
4.1	Rôle de l'efflux actif dans l'adaptation aux huiles essentielles.....	159
4.2	Contraintes expérimentales	162
4.2.1	La solubilité.....	162
4.2.2	Variabilité inter-souches	164
4.3	Utilisation et efficacité thérapeutique des HEs.....	164
4.3.1	Etudes pharmacologiques et toxicologiques	165
4.3.2	Etudes chez l'animal.....	165
4.1.1	Etudes cliniques.....	167
4.2	Huiles essentielles et mucoviscidose	167

4.2.1	Enquête auprès des patients CF	167
4.2.2	Impact des HEs sur les flores microbiennes	168
5.	Conclusion	169
6.	Matériel et méthodes	171
6.1	Solutions de travail	171
6.2	Techniques de microbiologie	171
6.2.1	Milieus de culture, plasmides et souches bactériennes	171
6.2.2	Mesure de croissance bactérienne	171
6.2.3	Détermination de la sensibilité aux antibiotiques avec ou sans composés	172
6.2.4	Antibiogrammes	172
6.2.5	Test de rapprochement de disques	172
6.2.6	Détermination de la CMI (concentration minimale inhibitrice)	172
6.2.7	CMI en milieux gélosé	173
6.2.8	CMI en microplaque	173
6.2.9	CMI avec antibiotiques pré-incubés	174
6.2.10	Courbes de bactéricidies	174
6.2.11	Tests d'induction avec des outils rapporteurs luminescents	174
6.2.12	Tests de virulence	175
6.2.13	Obtention de mutant résistants au cinnamaldéhyde	175
6.3	Techniques de biologie moléculaire	176
6.3.1	Extraction d'ADN bactérien	176
6.3.2	Polymerase chain reaction (PCR)	176
6.3.3	Electrophorèse en gel d'agarose	176
6.3.4	Purification des fragments d'ADN	176
6.3.5	Séquençage d'ADN	177
6.3.6	Clonage d'ADN	177
6.3.7	Transformation bactérienne	177
6.3.8	Conjugaison tri- et tétrapartite	177
6.3.9	Délétion génique par recombinaison homologue	178
6.3.10	Quantification de l'expression génique par RT-qPCR	178
6.4	Techniques analytiques physico-chimiques	180
6.4.1	Extractions des métabolites et détection par CCM	180
6.4.2	Mesure du potentiel Zeta des membranes bactériennes	180

6.4.3	Détection d'adduits par spectrométrie de masse.....	181
6.4.4	Détection d'adduits par spectrométrie Raman	181
7.	Bibliographie	187
8.	Annexes.....	212

Table des figures :

Figure 1 : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	17
Figure 2 : Différentes stratégies moléculaires capables de conférer de la résistance aux antibiotiques anti- <i>Pseudomonas</i>	20
Figure 3 : Représentation schématique des principaux systèmes de signalisation transmembranaires chez les bactéries.....	24
Figure 4 : Représentation schématique de l'action de la colistine sur la paroi bactérienne.	25
Figure 5 : Structure des systèmes d'efflux.....	27
Figure 6 : Régulation de l'opéron <i>mexAB-oprM</i>	29
Figure 7 : Régulation de l'opéron <i>mexCD-OprJ</i>	31
Figure 8 : Régulation de l'opéron <i>mexEF-oprN</i>	33
Figure 9 : Régulation de l'opéron <i>mexXY</i>	35
Figure 10 : Structure chimique des trois familles de composés dérivés du phénol.....	42
Figure 11 : Structure chimique de quelques molécules bactéricides extraites d'huiles essentielles.....	43
Figure 12 : Structure chimique du Cinnamaldéhyde, Acide cinnamique et Alcool cinnamique.....	51
Figure 13 : Métabolisation du CNA (cinnamaldéhyde).....	52
Figure 14 : Effets cellulaires du cinnamaldéhyde (CNA).....	53
Figure 15 : Structure chimique du citral.....	55
Figure 16 : Voie de dégradation du citral.....	56
Figure 17 : Représentation schématique des effets globaux du citral sur la bactérie <i>Acinetobacter baumannii</i> ..	57
Figure 18 : Différentes sources de production du glyoxal chez l'Homme.....	59
Figure 19 : Schéma récapitulatif de l'effet du cinnamaldéhyde sur la bactérie <i>P. aeruginosa</i>	63
Figure 20 : Induction de la résistance par le CNA.....	86
Figure 21 : Outils luminescents rapporteurs.....	87
Figure 22 : Mise en évidence du pouvoir inducteur de la vanilline.....	88
Figure 23 : Contrôle de luminescence des souches rapportrices de l'activité de <i>MexAB-OprM</i> par les voies.....	89
Figure 24 : Gènes régulateurs de l'opéron <i>mexAB-oprM</i> inactivés.....	119
Figure 25 : Niveaux d'expression de <i>mexB</i> chez différents mutants.....	120
Figure 26 : Tests de sensibilité au CNA.....	121
Figure 27 : Schéma récapitulatif de l'effet du citral sur la résistance aux antibiotiques de <i>P. aeruginosa</i>	125
Figure 28 : Formules chimiques du glutaraldéhyde et du malondialdéhyde.....	145
Figure 29 : Niveaux d'expression de <i>mexE</i> et <i>mexY</i>	146
Figure 30 : Cinétiques de bactéricidie.....	146
Figure 31 : Résistance à un disque antibiotique.....	147
Figure 32 : Procédés de synthèse du malondialdéhyde.....	148
Figure 33 : Structure chimique du Citronellole, Citronellal et de la Vanilline.....	149
Figure 34 : Fiche de renseignement adressée aux patients CF du CRCM adultes de Besançon.....	151
Figure 35 : Représentation graphique de la consommation d'huiles essentielles chez les patients.....	152
Figure 36 : Molécules extraites d'huiles essentielles préférentiellement consommées par les patients CF.....	153
Figure 37 : Chronologie des isolats prélevés entre 1998 et 2014 chez le patient P6.....	153
Figure 38 : Evolution de la résistance aux antibiotiques.....	154
Figure 39 : Niveau d'expression relatif des gènes <i>mexB</i> et <i>mexY</i> des souches cliniques isolées du patient P6...	155
Figure 40 : Sensibilité au cinnamaldéhyde de souches <i>TicHS</i>	155
Figure 41 : Corrélation entre la taille du génome bactérien et le nombre d'opérons.....	160
Figure 42 : Organisation des microplaques pour établir l'effet combiné des antibiotiques et des électrophiles.	173

Table des tableaux :

<i>Tableau 1 : Substrats et régulateurs des différentes pompes d'efflux de P. aeruginosa.....</i>	<i>21</i>
<i>Tableau 2 : Origine et cibles des principales classes d'inhibiteurs d'efflux.....</i>	<i>38</i>
<i>Tableau 3 : Tableaux représentant la diversité chimique des huiles essentielles.....</i>	<i>42</i>
<i>Tableau 4 : Activité des principaux extraits d'HEs bactéricides.....</i>	<i>45</i>
<i>Tableau 5 : Vue d'ensemble des effets antagonistes ou synergiques entre différentes HEs et antibiotiques.....</i>	<i>46</i>
<i>Tableau 6 : Impact des molécules extraites d'HEs sur PA14</i>	<i>90</i>
<i>Tableau 7 : Induction de la résistance aux antibiotiques par le MDA chez la souche PA14</i>	<i>148</i>
<i>Tableau 8 : Induction de la résistance aux antibiotiques chez des mutants déficients dans les systèmes MexEF-OprN et MexXY/OprM.</i>	<i>149</i>
<i>Tableau 9 : Mutations dans la protéine NalC des souches corses.</i>	<i>157</i>
<i>Tableau 10 : Systèmes à deux composants impliqués dans la résistance aux antibiotiques chez Pseudomonas spp</i>	<i>163</i>
<i>Tableau 11 : Coefficient de partage et solubilité dans l'eau de molécules d'HEs ou antibiotiques.....</i>	<i>164</i>
<i>Tableau 12 : Activité anti-virulence des HEs.</i>	<i>166</i>
<i>Tableau 13 : Pharmacopées complémentaires chez les patients CF</i>	<i>168</i>
<i>Tableau 14 : Liste des composés chimiques utilisés.</i>	<i>183</i>
<i>Tableau 15 : Liste des souches bactériennes et des plasmides utilisés.</i>	<i>184</i>
<i>Tableau 16 : Liste des amorces utilisées.....</i>	<i>185</i>

Liste des présentations orales

Induction des systèmes d'efflux de *Pseudomonas aeruginosa* par le cinnamaldéhyde, extrait de l'huiles essentielle de cannelle.

Alexandre Tetard, Patrick Plésiat, Catherine Llanes.

Réunion annuelle du Groupe de Recherche Pseudomonas, Marseille, Septembre 2018.

Nouveau regard sur l'utilisation des huiles essentielles dans le traitement des infections à *Pseudomonas aeruginosa*, l'exemple du cinnamaldéhyde.

Alexandre Tetard, Patrick Plésiat, Catherine Llanes.

19ème édition du Colloque Français des Jeunes Chercheurs sur la Mucoviscidose, Paris, Février 2019.

Impact of essentials oils on efflux mediated antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*.

Alexandre Tetard, Patrick Plésiat, Catherine Llanes.

Forum des jeunes chercheurs, Ecole Doctorale Environnement-Santé, Dijon, Avril 2019.

Induction of *Pseudomonas aeruginosa* efflux systems by chemical compounds extracted from essential oils.

Alexandre Tetard, Gaetan Mislin, Patrick Plésiat, Catherine Llanes.

Gordon Research Seminar on Efflux, Barga Italy, May 2019.

Actualités et perspectives de la recherche en mucoviscidose – Nouveau regard sur l'utilisation des huiles essentielles dans le traitement des infections à *Pseudomonas aeruginosa*.

Alexandre Tetard, Patrick Plésiat, Catherine Llanes.

Rencontres avec les malades atteints de mucoviscidose et leurs familles. Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM), CHU de Besançon, Mai 2019.

Effet de la combinaison antibiotiques/huiles essentielles sur la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*.

Alexandre Tetard, Patrick Plésiat, Catherine Llanes.

XXVème Forum des Jeunes Chercheurs, Juin 2019, Dijon.

Impact des huiles essentielles sur la résistance aux antibiotiques – l'exemple du cinnamaldéhyde.

Alexandre Tetard, Susie Gaillot, Benoit Valot Patrick Plésiat, Catherine Llanes

Réunion annuelle du Groupe de Recherche Pseudomonas, Voiron, Septembre 2019.

Association antibiotique – extrait d’huiles essentielles : effet antagoniste chez *Pseudomonas aeruginosa*.

Alexandre Tetard, Susie Gaillot, Benoit Valot Patrick Plésiat, Catherine Llanes.
15ème congrès national de la Société Française de microbiologie, Paris, Octobre 2019.

Huiles essentielles : chronique d’une résistance annoncée.

Alexandre Tetard, Patrick Plésiat, Catherine Llanes
Réunion de la Société de Biologie de Besançon, Besançon, Décembre 2019.

Short and long terms effect of cinnamaldehyde on *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance.

Alexandre Tetard, Susie Gaillot, Catherine Llanes.
European Young Investigators Meeting (EYIM). 43th European Cystic Fibrosis Society (ECFS) Conferences, June 2020, Lyon, France. Annulé Covid-19.

Huiles essentielles : effets du citral sur la résistance aux antibiotiques de *Pseudomonas aeruginosa*.

Alexandre Tetard, Sarah Foley, Freddy Torrealba Anzola, Gaetan Mislin, Yann Pellequer, Patrick Plésiat, Catherine Llanes.
22^{ème} colloque français des Jeunes Chercheurs travaillant sur la Mucoviscidose, mars 2021, en ligne.

Citral *with* or *without* antibiotics to treat the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*: sometimes the remedy is worse than the disease.

Alexandre Tetard, Sarah Foley, Freddy Torrealba Anzola, Patrick Plésiat, Catherine Llanes.
European Young Investigators Meeting (EYIM). 44th European Cystic Fibrosis Society (ECFS) Conferences, June 2021, on line.

Effet indésirable du citral sur la sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques

Alexandre Tetard, Patrick Plésiat, Catherine Llanes.
Réunion annuelle du Groupe de Recherche Pseudomonas, Malbuisson, Octobre 2021.

Abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
BET	Bromure d'Ethidium
CA-SFM	Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
CCCP	Carbonyl cyanide <i>m</i> -chloro-phenyl hydrazone
CCM	Chromatographie sur couche mince
CFU	<i>Colony Forming Units</i>
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CNA	Cinnamaldéhyde
CN-OH	Alcool cinnamique
DiSC3	3,3'-Dipropylthiadicarbonine
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
EPI	<i>Efflux Pump Inhibitor</i>
FIC	<i>Fractional Inhibition Concentration</i>
FWHM	<i>Full Width at Half Maximum</i> (largeur à mi-hauteur)
<i>g</i>	Accélération de la pesanteur
GLT	Glutaraldéhyde
HEs	Huiles Essentielles
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
McF	MacFarland
MDA	Malondialdéhyde
MH	Mueller-Hinton
MHA	Mueller-Hinton Agar
MHB	Mueller-Hinton <i>Broth</i>
min	Minute
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé (<i>World Health Organization</i>)
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i>
PAβN	Phénylalanine arginine β-naphthylamide
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIA	<i>Pseudomonas Isolation Agar</i>
QS	<i>Quorum Sensing</i>
RIA	<i>Resistance Inhibiting Agent</i>
RLU	<i>Relative Luminescence Units</i>
RMA	<i>Resistance Modifying Agent</i>
rpm	Rotations par minute
s	Secondes
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> Résistant à la Méthicilline
TAE	Tris-Acetate EDTA
TCS	<i>Two Components System</i> (système à deux composants)
UFC	Unités Formant Colonies

1. Introduction générale

Les maladies infectieuses font partie intégrante de l'histoire de l'humanité. Certaines d'entre elles (tuberculose, lèpre, peste) ont causé de grandes épidémies qui ont décimé les populations humaines depuis le Néolithique jusqu'à la fin du 19^{ème} siècle, période à laquelle se mettent en place : l'amélioration des conditions d'hygiène, l'arrivée des premiers vaccins puis, dans les années 1940, celle des antibiotiques. Toutefois, aujourd'hui, en raison du développement de l'antibiorésistance, les maladies infectieuses d'origine bactérienne posent encore, de nombreux problèmes. En Europe, les rapports de l'ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*) évoquent 400 000 personnes infectées dans le cadre d'une hospitalisation et environ 37 000 morts par an (<https://www.ecdc.europa.eu>). Même si les pays les moins développés sont les plus touchés (par exemple, on estime à 80% le nombre d'isolats de *Pseudomonas aeruginosa* résistants aux fluoroquinolones en Roumanie, contre 17% en France, d'après les données du CDDEP, *the Center for Disease, Dynamic, economy and Policy*, 2020), 12 500 morts sont attribués chaque année en France à des infections causées par des bactéries résistantes (Colomb-Cotinat *et al.*, 2016).

L'évolution de la résistance aux antibiotiques et les problèmes sanitaires qui lui sont associés sont d'autant plus alarmants que les nouvelles molécules thérapeutiques sont rares. En effet, partant d'une analyse de ces 50 dernières années, des modèles prédictifs estiment qu'il faudrait développer 20 nouvelles classes d'antibiotiques pour les 50 ans à venir (Coates *et al.*, 2011), ce qui semble impossible lorsque l'on sait que le dernier rapport de l'OMS (*World Health Organization, 2017 : Antibacterial agents in clinical development: An analysis of the antibacterial clinical development pipeline, including tuberculosis*) mentionne 51 molécules en développement mais d'une seule nouvelle famille, ce qui est très loin d'être suffisant.

La recherche d'alternatives thérapeutiques est donc, aujourd'hui plus que jamais, une voie à considérer : bactériophages, anticorps, peptides antimicrobiens ou encore oligonucléotides visant à inhiber les gènes de résistance, sont à l'ordre du jour des programmes de recherche (Ghosh *et al.*, 2019). En parallèle, reviennent en force des agents thérapeutiques connus depuis longtemps. Ainsi, les huiles essentielles bénéficient d'un regain d'intérêt de la part de la communauté scientifique et médicale, avec un fort capital sympathie de la part de la population générale et du personnel soignant (Boesl *et al.*, 2016). Sur les quelques 250 huiles aujourd'hui commercialisées, une douzaine (lavande, thym, cannelle, arbre à thé, menthe, eucalyptus, sauge, clou de girofle, cajepout...) présente des caractéristiques antimicrobiennes intéressantes (Wińska *et al.*, 2019). Finalement, la solution au problème de la diminution de l'efficacité des traitements antimicrobiens n'est peut-être pas de se détourner des antibiotiques que nous connaissons bien, mais de leur associer d'autres molécules dans l'optique d'un effet amélioré. On parle alors d'agents modificateurs de résistance ou « *resistance modifying agents* » : ce sont des agents capables de modifier la sensibilité d'une souche bactérienne à certains antibiotiques (effet additif ou synergique). En microbiologie clinique, un exemple bien connu et utilisé depuis longtemps est celui de l'association de l'amoxicilline (un antibiotique de la famille des β -lactamines) avec l'acide clavulanique, une

molécule naturelle produite par *Streptomyces clavuligerus*, dont la liaison irréversible avec les β -lactamases (des enzymes inactivatrices de β -lactamines) provoque leur inactivation, augmentant de fait l'activité de l'amoxicilline (Reading *et al.*, 1977). De nombreuses formules sont aujourd'hui à l'étude, parmi lesquelles, des huiles essentielles sont associées à des antibiotiques (Moussaoui *et al.*, 2016). Toutefois, si certains modificateurs de résistance synergisent l'action des antibiotiques, d'autres montrent des effets antagonistes. Ainsi, certaines molécules favorisent l'émergence de mutations génératrices de résistance. Par exemple, le triclosan ou les ammoniums quaternaires, des antiseptiques utilisés pour nettoyer les surfaces, sélectionnent des mutants *fabI* résistants à l'isoniazide, un antibiotique utilisé en première intention dans le traitement de la tuberculose (Levy 2002).

Si le problème de l'antibiorésistance concerne la plupart des bactéries pathogènes de l'Homme, dans ce travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à *Pseudomonas aeruginosa*, l'archétype des bactéries résistantes acquises à l'hôpital. Ce bacille à Gram négatif flagellé, commun dans les milieux humides, possède une très grande capacité d'adaptation et une versatilité métabolique lui permettant de coloniser différents environnements, même hostiles. Ce potentiel adaptatif est dû à un génome particulièrement grand (de 5,5 à 7 Mpb) (Stover *et al.*, 2000), codant un réseau complexe de régulation (Mathee *et al.*, 2008) dont 10% est dépendant du *quorum sensing*, un mécanisme de communication intercellulaire qui permet aux bactéries de coordonner l'expression de leurs gènes lorsqu'elles ont atteint une certaine densité de population (Venturi 2006). Cette formidable ressource génétique fait également de *P. aeruginosa* un agent infectieux pour les plantes (Walker *et al.*, 2004) et les animaux (Haenni *et al.*, 2015). L'environnement de l'Homme n'est pas épargné, car *P. aeruginosa* se développe facilement dans les canalisations, les siphons des éviers (Lashéras *et al.*, 2006). A partir de ces réservoirs, il colonise l'Homme et provoque des infections aiguës ou chroniques sur des terrains prédisposés, comme les malades dénutris, atteints de cancers ou d'hémopathie qui suivent une corticothérapie au long cours, les patients brûlés, polyopérés, polytransfusés et ceux soumis à de multiples manœuvres invasives qui sont autant de portes d'entrée dans l'organisme. Ainsi, *P. aeruginosa* est une espèce souvent acquise à l'hôpital, impliquée dans 8,4 % des infections nosocomiales, ce qui la place aujourd'hui en France au 3^{ème} rang après *Escherichia coli* (26%) et *Staphylococcus aureus* (16%) (INSERM, 2015). Moins fréquente dans les infections communautaires, *P. aeruginosa* est toutefois à l'origine d'infections chez les insuffisants respiratoires chroniques comme ceux atteints de mucoviscidose (CF, *Cystic Fibrosis*), chez qui la bactérie trouve un terrain de développement propice (Davies 2002). Dans le poumon CF, malgré la carence en ions (fer, zinc), la déshydratation du mucus, l'exposition à des espèces radicalaires de l'oxygène et les traitements antibiotiques, *P. aeruginosa* s'adapte par le biais d'une diversification génotypique et phénotypique au cours du temps (Mahenthalingam *et al.*, 1996, Fothergill *et al.*, 2010). Au final, l'implantation de *P. aeruginosa* dans le poumon CF accélère le déclin de la fonction respiratoire et réduit l'espérance de vie de ces patients (Govan *et al.*, 1986, Talwalkar *et al.*, 2016).

A l'heure actuelle, la seule stratégie thérapeutique pour lutter contre la colonisation/infection à *P. aeruginosa* repose sur l'administration d'antibiotiques. Toutefois, l'arsenal thérapeutique anti-pyocyanique se limite à un petit nombre de molécules souvent anciennes, notamment

des aminosides (tobramycine, amikacine), des β -lactamines (ceftazidime, méropénème, aztréonam), des fluoroquinolones (ciprofloxacine, lévofloxacine) et la colistine. Malgré une efficacité clinique certaine, et l'apparition de nouvelles molécules (céfidérocol) et nouvelles associations de β -lactamines/inhibiteurs de β -lactamases, telles que ceftolozane/tazobactam et ceftazidime/avibactam, l'antibiothérapie peut être mise en échec par l'émergence de mutants résistants (ECDC, 2018). Cette résistance peut être imputée à (1) la production d'enzymes inactivatrices d'antibiotiques (telles que la β -lactamase AmpC active sur les β -lactamines) ou d'enzymes modificatrices (APH(3')-IIb, active sur les aminosides), (2) la modification de la cible des antibiotiques par mutation ou transformation chimique, (3) la diminution de la perméabilité membranaire par perte de porines, ou (4) la surproduction de systèmes d'efflux actifs, des pompes qui permettent à la bactérie d'expulser dans le milieu extracellulaire des molécules toxiques endogènes ou exogènes en utilisant la force proton-motrice (Wright 2003) (**Figure 1**). A ces mécanismes d'origine intrinsèque, il faut en plus tenir compte du fait que la plupart des souches MDR (*multi-drug resistant*) (hors CF) ont acquis des gènes de résistance par transfert horizontal (Lerminiaux *et al.*, 2019). En conséquence, l'amélioration de la prise en charge anti-*Pseudomonas* reste un enjeu majeur surtout qu'à l'échelle mondiale, cette bactérie a été placée par l'OMS comme pathogène nécessitant de manière urgente la mise au point de nouveaux traitements (Tacconelli *et al.*, 2018).

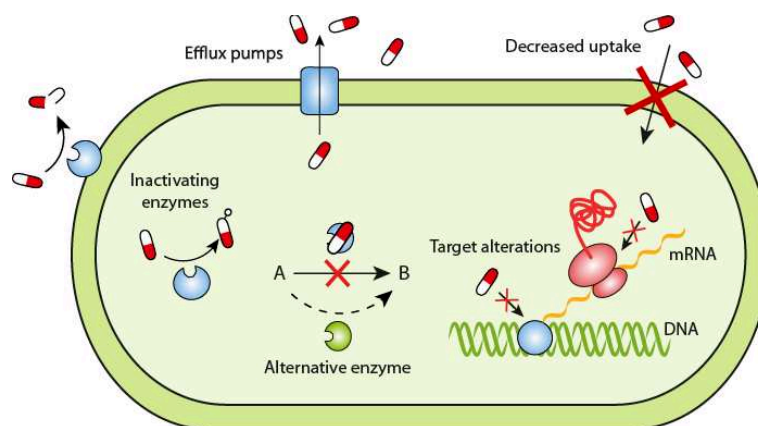


Figure 1 : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques. D'après (Gullberg *et al.*, 2011).

Dans ce contexte, la recherche de molécules actives pouvant aider à lutter contre les bactéries en association avec les antibiotiques est vivement encouragée. De la même façon, identifier celles dont l'action peut se révéler antagoniste à celle des antibiotiques semble également tout à fait pertinent dans la mesure où cela permet d'éviter des associations malheureuses. Ainsi, l'équipe de bactériologie médicale de l'UMR Chrono-Environnement a récemment montré que certains composés électrophiles (glyoxal, méthylglyoxal) étaient capables d'activer la surproduction de la pompe d'efflux MexEF-OprN de *P. aeruginosa* et d'augmenter la résistance aux antibiotiques substrats de cette pompe (fluoroquinolones, chloramphénicol, triméthoprime) (Juarez *et al.*, 2017). Les électrophiles ou RES (*Reactive Electrophilic Species*) sont des molécules qui, en raison de leur déficience en électrons, montrent une forte affinité pour des molécules pouvant leur en céder (nucléophiles). Les groupements chimiques avec un

fort caractère électrophile (principalement les aldéhydes) sont capables de former des liaisons avec des nucléophiles tels que l'ADN ou les protéines, générant ainsi un lourd stress chez les organismes vivants. Or, les huiles essentielles, dont la consommation échappe souvent à toute prescription médicale, peuvent renfermer, parmi des dizaines de molécules actives, des électrophiles. Dans ce travail, nous avons donc cherché à évaluer l'impact de ces produits lorsqu'ils sont utilisés en combinaison avec des antibiotiques sur la bactérie *P. aeruginosa* et ce, tout particulièrement dans le contexte de la mucoviscidose. Pour avoir une interprétation plus rigoureuse de nos résultats, nous avons étudié deux composés électrophiles majeurs purifiés : le cinnamaldéhyde qui représente plus de 60% de la composition de l'huile essentielle de cannelle et le citral, présent dans les mêmes proportions dans l'huile essentielle de citronnelle. Ces deux composés ont été choisis en fonction de leurs caractères chimiques différents (respectivement, un aldéhyde aromatique insaturé et un aldéhyde insaturé) et non en raison de leur consommation répandue auprès des patients. En effet, lors de l'initiation de ce projet de thèse, il n'existait pas de données quantitatives et qualitatives sur la consommation d'huiles essentielles. C'est pourquoi, en parallèle à nos expérimentations menées sur ces deux composés, nous avons initié une étude locale auprès des patients CF suivis au CHRU de Besançon dont les résultats seront détaillés dans la partie « résultats » de ce manuscrit.

Dans ce document, nous commencerons par présenter, dans la synthèse bibliographique, les mécanismes de résistance modulables permettant à *P. aeruginosa* d'ajuster sa tolérance aux antibiotiques (résistance induite transitoire). Nous constaterons à ce sujet que la modulation des niveaux de production des systèmes d'efflux est un formidable moyen que *P. aeruginosa* peut déployer en réponse à divers stress (Poole et Fruci 2016). Nous ferons ensuite l'inventaire des agents connus pour moduler l'activité des antibiotiques (*Resistance Modifying Agents*) en inhibant ou activant des mécanismes de résistance. Puis, nous présenterons les extraits d'huiles essentielles électrophiles avec lesquels nous avons travaillé (le cinnamaldéhyde et le citral) ; cette synthèse permettra de faire le point sur l'origine de leur activité bactéricide et les mécanismes développés par les bactéries pour y résister. Nous exposerons enfin nos résultats qui s'articuleront autour de trois thèmes, faisant chacun l'objet d'un article publié ou en cours de publication dans une revue internationale : (1) effet d'un aldéhyde phénolique, le cinnamaldéhyde, dans l'induction de la résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*, (2) caractérisation de mutants résistants au cinnamaldéhyde, (3) effet d'un aldéhyde non-phénolique, le citral, sur la sensibilité de *P. aeruginosa* aux antibiotiques.

2. Synthèse bibliographique

Depuis l'introduction des antibiotiques en thérapeutique anti-infectieuse, les bactéries telles que *Pseudomonas aeruginosa* ont développé des stratégies de résistance sophistiquées conduisant à l'apparition de « superbugs » pratiquement résistantes à toutes les molécules antibiotiques disponibles. Ces mécanismes de résistance sont largement étudiés, car ce sont eux qui mettent en échec les traitements anti-infectieux.

2.1 Différents types de résistance

Lorsque l'on parle de résistance aux antibiotiques, on doit distinguer la résistance *innée*, dont l'espèce dispose naturellement pour résister à certains antibiotiques, de la résistance *acquise* qui augmente le spectre et les niveaux de résistance par le biais de mutations ou l'acquisition de matériel génétique venant d'autres bactéries. En plus, certains de ces mécanismes peuvent être ponctuellement sollicités ou suractivés lors d'un stress. C'est la résistance *induite* ou *adaptative*, dont nous parlerons dans les prochains paragraphes (**Figure 2**).

2.1.1 Résistance innée

Comparé à d'autres pathogènes, *P. aeruginosa* est souvent plus difficile à éradiquer car l'espèce possède une *résistance innée* (ou *naturelle*) à un grand panel d'antibiotiques de la famille des aminosides, des β -lactamines et des fluoroquinolones. Cette particularité est due à la faible perméabilité de sa membrane externe qui limite l'entrée des antibiotiques dans la cellule bactérienne (Hancock 1998) et qui permet le fonctionnement plus efficace d'autres mécanismes de résistance naturelle tels que l'oxacillinase OXA-50 (Girlich *et al.*, 2004), la céphalosporinase AmpC (inactivatrice de β -lactamines) (Masuda *et al.*, 1999) ou les systèmes d'efflux actifs (Li, Zhang, et Poole 2000) (**Figure 2**).

L'expression basale inductible de AmpC confère à l'espèce une insensibilité aux céphalosporines de 1ère et de 2ème génération (C1G, C2G), à l'amoxicilline et au céfotaxime. Toutefois, elle n'est pas suffisante pour permettre une protection efficace *in vivo* vis-à-vis de molécules plus stables, mais elle peut être considérablement augmentée chez des mutants résistants de type *ampR*, *ampD* ou *dacB* (Kumari *et al.*, 2014). L'enzyme, normalement présente dans le périplasme, est parfois retrouvée dans les expectorations de patients CF, supposant une protection des clones faiblement producteurs par les mutants surproducteurs (Giwerzman *et al.*, 1992). *P. aeruginosa* possède également une enzyme modificateur des aminosides, l'APH(3')-IIb, qui lui permet de résister naturellement à la kanamycine, la néomycine et la spectinomycine (Hächler *et al.*, 1996).

Enfin, parmi les 12 systèmes d'efflux actif de la famille RND produits par *P. aeruginosa*, seuls deux d'entre eux (MexAB-OprM et MexXY/OprM) contribuent à la résistance naturelle de la

bactérie à plusieurs antibiotiques substrats de ces pompes. MexAB-OprM exporte en effet plusieurs β -lactamines (à l'exception de l'imipénème), la tétracycline, le chloramphénicol ou encore la norfloxacine (**Tableau 1**). Ainsi, l'inactivation d'un des gènes de l'opéron (*mexA*, *mexB* ou *oprM*) provoque la diminution de 2- à 8-fois des CMI de ces antibiotiques (Li *et al.*, 1995). Concernant MexXY/OprM, l'inactivation de son opéron, dont l'expression est inductible, diminue entre autres la CMI des aminosides et du céfépime de 2- à 4-fois (Sobel *et al.*, 2003).

Ces mécanismes naturels, caractéristiques de l'espèce *P. aeruginosa*, limitent le nombre de molécules d'antibiotiques utilisables.

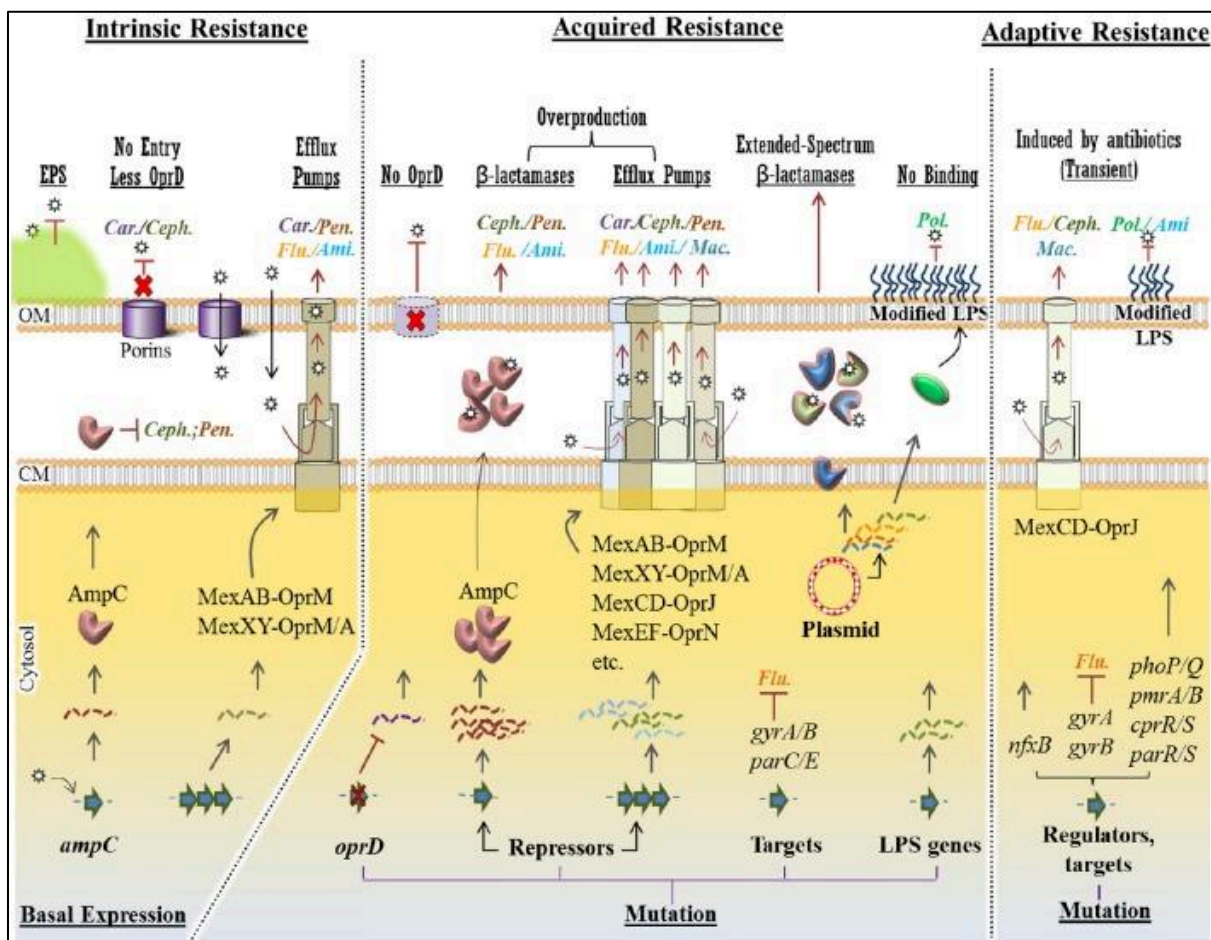


Figure 2 : Différentes stratégies moléculaires capables de conférer de la résistance aux antibiotiques anti-Pseudomonas. (Ca : Carbapénèmes ; Ceph : Cephalosporines ; Pen : Penicillines ; Ami : Aminosides ; Flu : Fluoroquinolone ; Mac : Macrolides et Po : Polymyxines). Sont présentés dans la partie haute de la figure (soulignés), les mécanismes intrinsèques comme la structure membranaire (ex : EPS, extracellular polymeric substance), OprD réduite, production basale de la β -lactamase AmpC et production basale de MexAB-OprM et MexXY/OprM : ils confèrent une **résistance basale, innée** à plusieurs groupes d'antibiotiques. **La résistance acquise**, par les changements mutationnels dans le gène OprD, dans les régulateurs transcriptionnels causant la surexpression des systèmes d'efflux entraine une résistance plus élevée, sur un plus large spectre d'antibiotiques. La résistance plasmidique est très importante par la diversité des gènes de résistance pouvant être échangés entre bactéries. La résistance aux polymyxines (consécutive à des transferts de gènes ou à des mutations) survient suite à des modifications des LPS (lipopolysaccharides) qui empêchent la liaison des antibiotiques à la membrane. **La résistance adaptative** se produit principalement en présence d'antibiotiques. C'est une résistance transitoire et réversible qui disparaît lorsque l'antibiotique disparaît. Les étoiles représentent les antibiotiques et les lignes pointillées/ondulées représentent les niveaux de transcription de chaque produit génique. CM, membrane cytoplasmique ; OM, membrane externe. D'après (Moradali *et al.*, 2017).

Tableau 1 : Substrats et régulateurs des différentes pompes d'efflux de *P. aeruginosa* (en grisé, celles jouant un rôle dans la résistance aux antibiotiques des souches cliniques).

Systèmes d'efflux	Régulateurs	Substrats
MexAB-OprM	<i>mexR, nalD, nalC/armR, rocS1/2-A2, brlR, mexT, cpxR, PA3225, cpxR, mdrR1/mdrR2, ampR ; amgR/amgS</i>	acriflavine, acridine orange, β -lactamines y compris les carbapénèmes (sauf l'imipénème), macrolides, (fluoro)quinolones, novobiocine, solvants organiques (hexane, xylène et toluène), sulfonamides, tétracyclines, tigécycline, triclosan, inhibiteur LpxC (CHIR-090), chloramphénicol, colistine (biofilm), céruléine, cristal violet, bromure d'éthidium, indole, pacidamycine, pseudopaline, inhibiteurs et molécules du <i>quorum sensing</i> , resvératrol, sodium dodecyl sulfate (SDS), thiolactomycine, triméthoprim.
MexCD-OprJ	<i>nfxB, esrC, algU, vqsM, PA2572</i>	azithromycine, eftobiprole, inhibiteur LpxC (CHIR-090), chloramphénicol, colistine (en biofilm), chlorexidine, céfépime, fluororoquinolones, inhibiteur des topoisomérases de type 2 bactériennes (NBTI5463), dérivés N-chloramine, solvants organiques (hexane, xylène), pacidamycine, ammoniums quaternaires, quinolones, tétracyclines, tigécycline, triclosan.
MexEF-OprN	<i>mexT, mexS, mvaT, ampR, brlR, parRS, mxtR, nmoR, PA2449, cmrA/PA2048</i>	inhibiteur LpxC (CHIR-090), chloramphénicol, diamide, (fluoro)quinolones, 4-hydroxy-2-heptyl quinoline, tétracyclines, triméthoprim, triclosan.
MexXY/OprM	<i>mexZ, armZ, amgRS, parRS, suhB, rplU, rpmA, PA2572, PA2573</i>	acriflavine, aminosides, ceftobiprol, bromure d'éthidium, céfépime, fluoroquinolones, peptide inhibiteur de déformylase (LBM415), macrolides, tétracyclines, tigécycline.
MexGHI-OpmD	<i>soxR</i>	acriflavine, bromure d'éthidium, fluoroquinolones, tétracyclines, tétraphénylphosphonium, inhibiteurs et molécules du <i>quorum sensing</i> , Va^{2+} , 5-methylphenazine-1-carboxylate.
MexJK/OprM	<i>mexL</i>	érythromycine, tétracyclines, triclosan.
MexMN/OprM		chloramphénicol, thiamphénicol, thiolactomycine.
MexPQ-OpmE	inconnus	macrolides, fluoroquinolones.
MexVW/OprM	inconnus	acriflavine, chloramphénicol, bromure d'éthidium, érythromycine, fluoroquinolones, quinolones, tétracyclines.
MuxABC-OpmB	inconnus	aztréonam, colistine, macrolides.
CzcCBA	<i>czcRS, copRS</i>	Cd^{2+} , Zn^{2+} .
TriABC-OpmH	inconnus	triclosan.

2.1.2 Résistance acquise

La résistance acquise augmente le spectre et/ou le niveau de résistance des souches de *P. aeruginosa* consécutivement à des mutations ou à l'acquisition de gènes *via* des transferts horizontaux à partir d'autres bactéries.

Les mutations affectent soit l'expression des gènes de résistance, soit l'activité de leurs produits, rendant les antibiotiques moins efficaces, voire inutilisables. Ces mutations, selon les gènes dans lesquels elles surviennent, touchent une ou plusieurs familles d'antibiotiques. Par exemple, elles provoquent : la résistance aux β -lactamines par la surexpression de AmpC (Juan *et al.*, 2005), aux carbapénèmes par la perte de la porine OprD (Quale *et al.*, 2006), aux fluoroquinolones par la modification des ADN topoisomérases, cibles de ces antibiotiques (Jalal *et al.*, 2000) et à l'ensemble de ces familles d'antibiotiques par la surexpression des pompes d'efflux de la famille RND (Li, Plésiat, et Nikaido 2015). Aujourd'hui, on ne cesse d'identifier de nouvelles mutations, et ceci, dans des gènes n'ayant pas toujours de lien évident avec la résistance aux antibiotiques. Par exemple, le résistome de *P. aeruginosa* aux aminosides implique près de 243 gènes dont les fonctions sont aussi différentes que, le métabolisme énergétique, la réplication et la réparation de l'ADN, la biosynthèse du LPS, la synthèse protéique... (El'Garch *et al.*, 2007, Sanz-García *et al.*, 2019). Ces mutations, généralement sélectionnées par la pression antibiotique, confèrent des niveaux de résistance variables : par exemple, une augmentation des CMI de 4- à 16-fois pour la kanamycine (El'Garch *et al.*, 2007). Elles peuvent s'accumuler au cours du temps, en particulier lors de la colonisation chronique chez les patients atteints de mucoviscidose (López-Causapé *et al.*, 2018).

En plus, certaines souches sont capables d'acquérir des gènes de résistance par transfert horizontal *via* des plasmides, transposons, ICEs (*Integrative and Conjugative Elements*) ou prophages, acquis par conjugaison, transformation ou transduction. Ainsi, les enzymes modificatrices des aminosides, capables de transférer des groupements acétyls (AAC, *aminoglycoside acetyltransferase*), phosphates (APH *aminoglycoside phosphoryltransferase*) ou nucléotidyls (ANT, *aminoglycoside nucleotidyltransferase*) sur les fonctions amines ou hydroxyles de ces antibiotiques sont codées par des éléments génétiques mobiles, expliquant le fait que ces enzymes aient diffusé dans de nombreuses souches (Poole 2005). Il en est de même avec les β -lactamases à spectre élargi (ESBL, *extended-spectrum β -lactamases*) décrites en premier lieu chez les entérobactéries mais qui, par leur capacité de propagation inter-espèces, ont concouru à l'émergence de nouvelles résistances chez *P. aeruginosa* (Kung *et al.*, 2010). Enfin, des enzymes inactivatrices des carbapénèmes, antibiotiques réservés aux infections sévères, émergent de façon croissante parmi les souches cliniques, qu'il s'agisse de carbapénémases à sérine active (GES, KPC...) dont la diffusion est facilitée par un portage plasmidique, ou de métallo-enzymes (MBL, *metallo- β -lactamases* IMP, VIM...) dont les gènes sont localisés principalement dans des intégrons (Queenan *et al.*, 2007). Les souches isolées dans le contexte de la mucoviscidose semblent échapper à cette résistance acquise par transferts et évoluent par des mutations chromosomiques (Winstanley *et al.*, 2016).

Au final, la résistance acquise fait émerger des souches multi-résistantes, responsables d'une surmorbidity chez les patients hospitalisés, une augmentation significative de la durée

d'hospitalisation, de la durée de ventilation mécanique pour les malades en réanimation, et du coût des soins (Shorr 2009).

2.1.3 Résistance induite

L'extraordinaire capacité de *P. aeruginosa* à s'adapter aux variations de son environnement (pH, anaérobiose), aux stress (y compris à l'exposition aux antibiotiques), aux variations des ressources nutritionnelles (sources de carbone) et aux activités des communautés microbiennes (biofilms), conduit parfois au développement d'une *résistance adaptative* (ou *induite*) aux antibiotiques. L'exposition à des facteurs déclencheurs module l'expression de certains gènes chromosomiques et induit une résistance. Une caractéristique importante de la résistance adaptative est son caractère transitoire, la bactérie retournant à un état sauvage de sensibilité une fois l'inducteur disparu. Cet état de fait peut expliquer pourquoi les résultats des analyses effectuées *in vitro* ne concordent pas toujours avec l'efficacité thérapeutique (Fick *et al.*, 1989). C'est tout particulièrement le cas, lorsque *P. aeruginosa* se développe en biofilm chez les patients atteints de mucoviscidose ou chez les malades ventilés. Ce phénomène bien que connu depuis plusieurs décennies (Barber *et al.*, 1966), commence à être pris en compte dans l'analyse des situations cliniques. Les mécanismes impliqués dans la résistance adaptative sont présentés dans les paragraphes suivants.

2.2 Agents inducteurs de résistance

Divers stress peuvent avoir un impact indirect sur la résistance aux antibactériens. Nous sommes donc ici dans un jeu à trois : un facteur exogène, la bactérie elle-même et l'antibiotique. Dans certains cas, toutefois, l'inducteur est l'antibiotique lui-même (ou les métabolites générés par les effets de l'antibiotique), réduisant le nombre d'acteurs à deux.

Pour détecter des stress d'origine endogène ou exogène, les bactéries possèdent des biosenseurs moléculaires complexes (systèmes à deux composants, chimiorécepteurs et autres protéines membranaires de signalisation, **Figure 3**). Ces biosenseurs assurent la transduction du signal dans la cellule et déclenchent une réponse physiologique adaptée, permettant à la bactérie de mieux résister au stress. Cette adaptation peut se traduire par un arrêt de la croissance, une perte de mobilité, la formation de biofilm, la surproduction d'alginate, la mucoïdie, la modification des lipopolysaccharides ou/et la résistance aux antibiotiques. Parfois, des antibiotiques différents activent les mêmes gènes de réponse au stress. C'est le cas de la tobramycine et de la ciprofloxacine qui activent chez *P. aeruginosa* la formation du biofilm, la production de systèmes d'efflux, de molécules du *quorum sensing*, de protéines de type *heat shock* et de protéines de réponse à l'hypoxie et au choc osmotique (Stewart *et al.*, 2015).

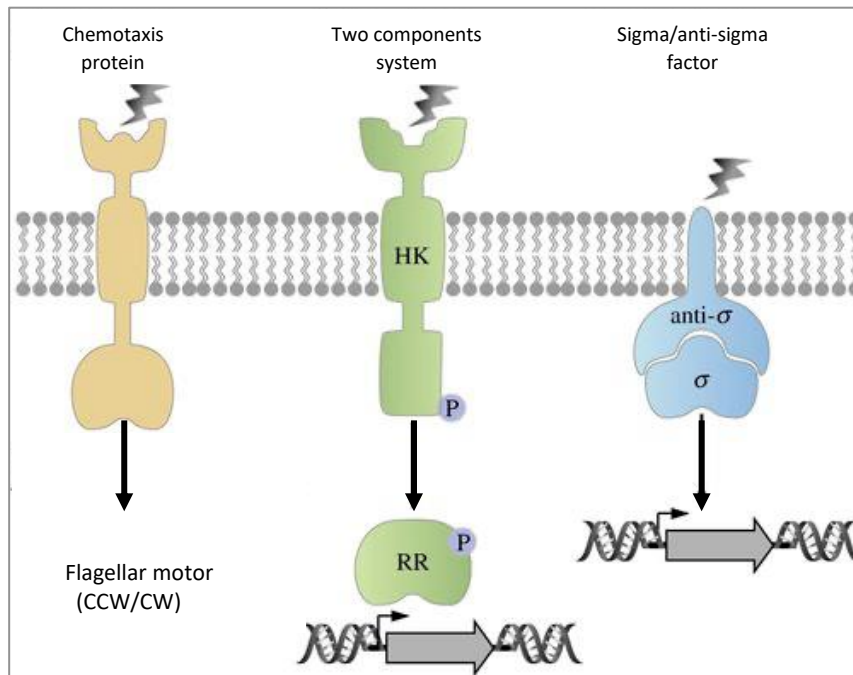


Figure 3 : Représentation schématique des principaux systèmes de signalisation transmembranaires chez les bactéries. D'après (Jung et al., 2018). Les chimiosenseurs (à gauche) sont généralement composés d'un domaine périplasmique de liaison au ligand et d'un domaine cytoplasmique de transduction du signal. Ils peuvent induire la transcription de gènes mais aussi provoquer le changement du sens de rotation des flagelles (CCW counter clockwise / CW clockwise). Les systèmes à deux composants (au centre) sont formés d'un senseur (histidine kinase, HK) intégré dans la membrane, qui s'auto-phosphoryle en réponse à un stimulus, puis transfère son groupement phosphate au régulateur de réponse (RR) cytoplasmique. Par exemple, le TCS ParRS (composé du senseur ParS et du régulateur ParR) permet l'activation d'au moins 3 mécanismes de résistance aux antibiotiques (Muller et al., 2011). Enfin, les facteurs sigma cytoplasmiques (à droite) se détachent de leur facteur anti-sigma lorsqu'ils perçoivent un stimulus. Par exemple, le facteur sigma AlgU se libère de sa liaison avec le facteur anti-sigma MucA en présence de lipides, induisant la biosynthèse d'alginate responsable du phénotype mucoïde (Li et al., 2020).

2.2.1 Résistance induite non-liée aux systèmes d'efflux

Les mécanismes de résistance préalablement évoqués peuvent donc être sollicités et accroître la résistance aux antibiotiques en présence de molécules dites « inductrices ».

Chez *P. aeruginosa* comme chez les entérobactéries du groupe III, l'expression de la β -lactamase naturelle AmpC peut être stimulée lorsque les bactéries sont cultivées en présence de certaines β -lactamines (céfoxitine, imipénème, ampicilline...) (Hanson et al., 1999). La perturbation du recyclage du peptidoglycane par les β -lactamines (Moya et al., 2009) provoque l'accumulation périplasmique puis cytoplasmique de produits de dégradation (mucopeptides) qui, en se fixant au régulateur AmpR, le transforment en activateur et induisent l'expression du gène de la β -lactamase AmpC (Lister et al., 2009).

En réduisant sa perméabilité membranaire, *P. aeruginosa* peut également augmenter sa résistance à certaines molécules antibactériennes (Blair et al., 2015). L'exemple le plus connu est celui de la porine OprD, la porte d'entrée spécifique des carbapénèmes dans la cellule bactérienne : sa sous-expression ou sa suppression sous l'effet de mutations accroît la CMI de ces antibiotiques de 4 à 8 fois en moyenne (Pirnay et al., 2002). Cela concerne également les agents polycationiques tels que les polymyxines et les peptides antimicrobiens, qui interagissent directement avec les charges négatives du LPS (Lambert 2002) et provoquent

une déstructuration de la membrane externe favorable à leur entrée dans le périplasma. Plusieurs études ont montré qu'une carence en magnésium du milieu environnant est associée à une résistance plus élevée à ces inhibiteurs (Kenward *et al.*, 1979). Dans ce cas, l'activation des systèmes à deux composants PhoPQ et PmrAB, induit l'expression de l'opéron *arnBCADTEF* qui code pour des enzymes capables de greffer des molécules de 4-amino-4-désoxy-L-arabinose sur les résidus phosphates du lipide A, ce qui modifie la charge du LPS et diminue l'entrée des polymyxines et des peptides antimicrobiens (Moskowitz *et al.*, 2004) (Figure 4).

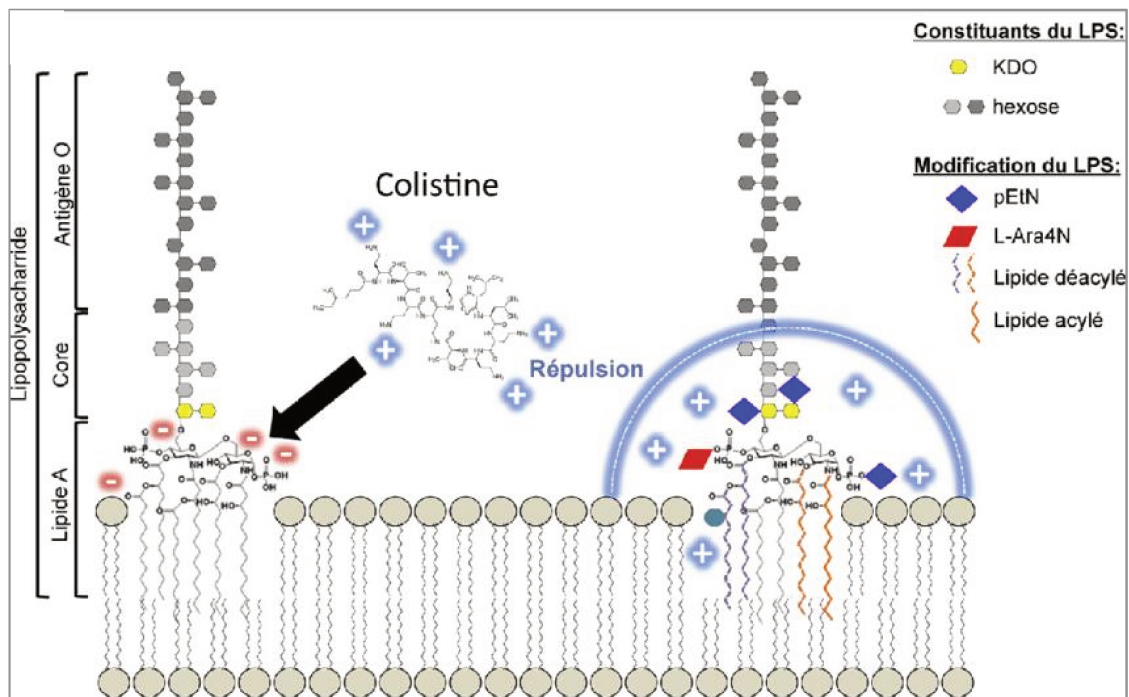


Figure 4 : Représentation schématique de l'action de la colistine sur la paroi bactérienne. La colistine chargée positivement interagit avec les charges négatives du LPS (à gauche). L'ajout de 4-amino-4-désoxy-L-arabinose (L-Ara4N) sous le contrôle de l'opéron *arnBCADTEF* modifie la charge du LPS, empêchant l'interaction de la colistine avec la surface bactérienne (à droite). pEtN : phosphoéthanolamine ; KDO : 2-ceto-3-désoxyoctonate (Dortet *et al.*, 2016).

De plus, il a été rapporté que chez certains patients CF, les souches peuvent sécréter de l'alginate, un polysaccharide qui contribue à diminuer leur sensibilité aux aminosides (Lambert 2002). La biosynthèse de l'alginate est activée dans les poumons des patients CF consécutivement à des mutations dans *mucA* (Damron *et al.*, 2012). Elle implique des voies de régulation complexes faisant intervenir des systèmes à deux composants tels que FimS/AlgR, impliqués également dans la régulation de la mobilité, et KinB/AlgB (Ma *et al.*, 1997). Dans ce contexte, il a été montré que des concentrations sub-inhibitrices d'imipénème (1µg/mL) peuvent augmenter jusqu'à 15 fois l'expression de l'opéron *alg* (responsable de la production d'alginate) lorsque *P. aeruginosa* est cultivé en biofilm ; toutefois, dans cette étude, la résistance aux aminosides n'as pas été évaluée (Bagge *et al.*, 2004).

Enfin, dans la mucoviscidose comme dans d'autres situations chroniques, le passage du mode de vie planctonique au biofilm est connu pour conférer un niveau de résistance supplémentaire à *P. aeruginosa* car non seulement le biofilm ralentit la progression des

antibiotiques mais en plus, il contient des bactéries métaboliquement peu actives (Mah *et al.*, 2001). Ainsi, le biofilm peut augmenter la résistance aux antibiotiques parfois d'un facteur 1000 comme cela a pu être observé pour la tobramycine (Mah *et al.*, 2001). L'initiation de la formation du biofilm est principalement dépendante du *quorum sensing*, des senseurs RetS, LadS et du système à deux composants GacS/GacA (Mikkelsen *et al.*, 2011, Moradali *et al.*, 2017). Chez *P. aeruginosa*, les inducteurs naturels mis en jeu sont les molécules autoinductrices du *quorum sensing*, tels que la *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL) et la *N*-butanoyl-L-homoserine lactone (C4-HSL) (Rasamiravaka *et al.*, 2015). En plus de cette induction naturelle, des travaux ont montré que le biofilm pouvait être également induit par des antiseptiques comme la chlorhexidine ou par certains antibiotiques comme l'amoxicilline, l'aztréonam ou la ciprofloxacine, utilisés à des concentrations sub-inhibitrices (Aka *et al.*, 2015). Il a été également rapporté qu'au sein des biofilms, l'ADN extracellulaire issu de la lyse des bactéries et participant à la structure du biofilm, pouvait, en plus, induire de la résistance. En effet, l'ADN extracellulaire chélate les cations Mg^{2+} qui stabilisent le LPS des bactéries encore vivantes. Cet environnement pauvre en cations favorise l'expression des voies PhoPQ et PmrAB, conduisant à une résistance des bactéries aux aminosides et aux peptides antimicrobiens cationiques (Mulcahy *et al.*, 2008).

2.2.2 Résistance induite liée aux systèmes d'efflux

Les systèmes d'efflux sont produits par de nombreuses cellules de tous les règnes du vivant. Ce sont des machineries protéiques transmembranaires permettant l'export actif, moyennant une fourniture énergétique, d'un large panel de composés du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire (**Figure 5**). Chez les bactéries, plusieurs familles de systèmes d'efflux ont été décrites en fonction de leur structure et de leur source d'énergie. Ainsi, les pompes des familles RND (*Resistance Nodulation cell Division*), MFS (*Major Facilitator Superfamily*), SMR (*Small Multidrug Resistance*) utilisent un gradient de protons, alors que celles des familles MATE (*Multidrug And compound Toxic Extrusion*) et ABC (*ATP-Binding Cassette*) utilisent respectivement un gradient d'ions sodium et l'ATP (Li, Plésiat, et Nikaido 2015). Ici, nous nous intéresserons à la famille RND dont les membres peuvent avoir pour substrats des molécules antibiotiques, réduisant ainsi leur accumulation intracellulaire et par conséquent leur interaction avec leur cible cellulaire (**Tableau 1**). Les systèmes de cette famille sont composés de trois protéines : une protéine de membrane externe, un transporteur inséré dans la membrane plasmique et enfin une protéine périplasmique de liaison. Ces protéines sont codées par des gènes organisés en opérons dont l'expression est régulée par des gènes répresseurs ou activateurs selon le cas.

Chez *P. aeruginosa*, on dénombre 12 systèmes d'efflux RND (Stover *et al.*, 2000) mais seulement 4 d'entre eux ont un intérêt clinique car ils sont capables de diminuer la sensibilité des souches aux antibiotiques ; il s'agit des pompes MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN et MexXY/OprM.

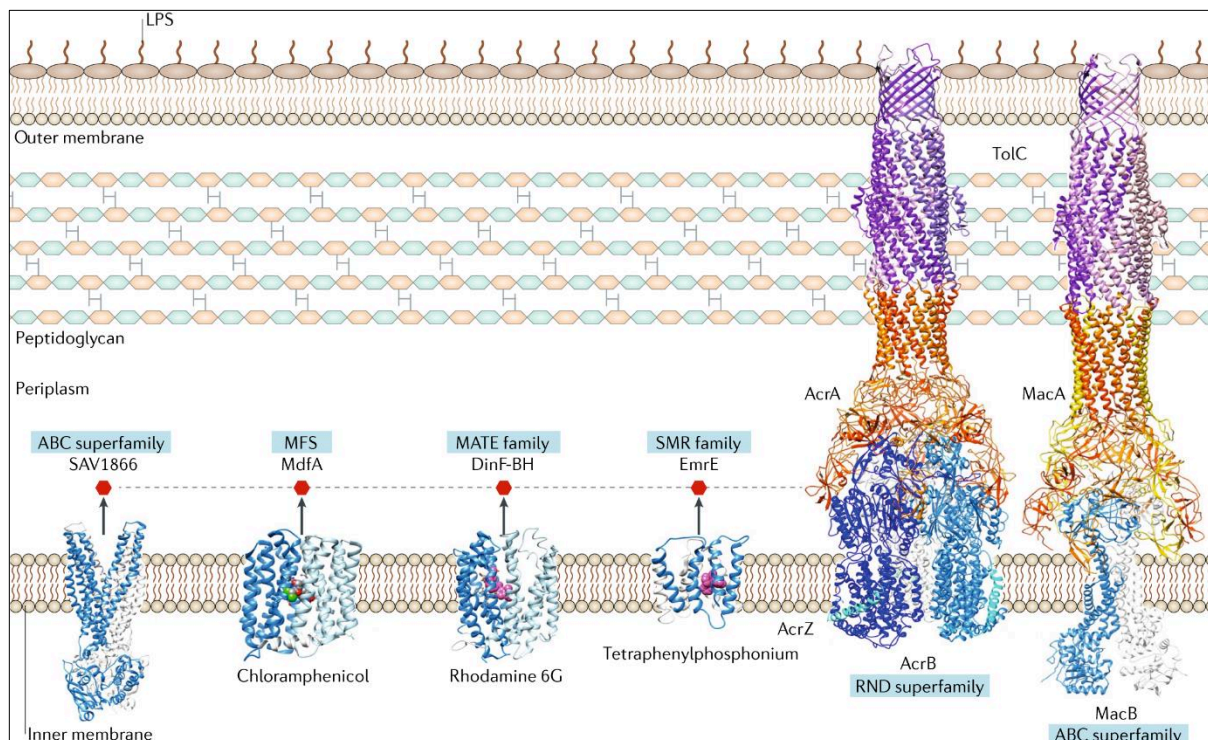


Figure 5 : Structure des systèmes d'efflux des familles RND (Resistance Nodulation cell Division), MFS (Major Facilitator Superfamily), SMR (Small Multidrug Resistance), MATE (Multidrug And compound Toxic Extrusion) et ABC (ATP-Binding Cassette). Le modèle appartenant à la famille RND est celui de AcrAB-TolC de *E. coli*, un système homologue à MexAB-OprM de *P. aeruginosa*. D'après (Du et al., 2018).

La mise en évidence d'une relation entre la surproduction d'un système d'efflux et la résistance aux antibiotiques passe par la caractérisation de mutants qui surproduisent de façon stable ce système, consécutivement à divers événements génétiques. Néanmoins, les systèmes d'efflux peuvent être surproduits de manière fugace par les bactéries, en général sous l'effet d'un stress, sans que le code génétique ni la descendance ne soient affectés. Les conditions dans lesquelles survient cette activation et l'impact qu'elle peut avoir sur l'efficacité thérapeutique des antibiotiques est plus difficile à évaluer. Dans les prochains paragraphes, nous détaillerons les facteurs susceptibles d'activer les 4 systèmes d'efflux cités plus haut et d'élever la résistance aux antibiotiques. Paradoxalement, les mécanismes d'efflux, décrits comme systèmes clés de la résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*, sont peu induits par les antibiotiques. Ce constat suggère que le rôle physiologique des pompes d'efflux n'est pas l'export des antibiotiques, mais la réponse à d'autres stress.

Enfin, même si elles ne seront pas traitées ici, d'autres pompes sont utilisées par *P. aeruginosa* pour s'adapter à des environnements stressants. C'est le cas par exemple de MexGHI-OpmD dont l'expression est induite par SoxR, un activateur transcriptionnel sensible au stress oxydant (Palma et al., 2005). Toutefois, leur rôle dans la résistance aux antibiotiques n'est pas connu.

2.2.2.1 MexAB-OprM

Présentation générale

Le système MexAB-OprM est le premier à avoir été caractérisé chez *P. aeruginosa* (Poole *et al.*, 1993). Il est principalement décrit comme responsable de l'efflux de β -lactamines et des (fluoro)quinolones même s'il peut prendre en charge diverses autres molécules, antibiotiques ou non (**Tableau 1**). Contrairement à d'autres systèmes, il participe à la résistance naturelle de *P. aeruginosa* aux antibiotiques car il est exprimé à un niveau basal chez les souches sauvages. En conséquence, son inactivation conduit à une augmentation de la sensibilité aux antibiotiques, les CMI de la ticarcilline et de l'aztréonam passant respectivement de 16 et 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ à 8 et 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Li, Plésiat, et Nikaido 2015). Régulé par plus de 10 gènes (**Figure 6**), l'opéron *mexAB-oprM* est principalement contrôlé par le répresseur local MexR, dont le gène est situé juste en amont. Ce répresseur de la famille MarR se fixe sous forme d'homodimère sur deux régions répétées inversées de la région intergénique *mexR-mexA*, au niveau du promoteur distal de *mexAB-oprM*, réprimant à la fois la transcription de l'opéron et sa propre expression (Evans *et al.*, 2001). L'activité de MexR est elle-même modulée par une autre protéine, ArmR (*Antirepressor for MexR*), dont le gène organisé en opéron avec PA3720 (de fonction inconnue) est naturellement réprimé par le répresseur de la famille TetR, NalC. Lorsqu'elle est produite, la protéine ArmR se fixe dans une cavité hydrophobe au sein du dimère MexR compromettant ainsi sa liaison à l'ADN (Cao *et al.*, 2004). Le troisième régulateur contrôlant la transcription de *mexAB-oprM* est également un répresseur, nommé NalD (Sobel *et al.*, 2005). Ce membre de la famille TetR exerce son action en se fixant sur la région intergénique *mexR-mexA* au niveau du second promoteur de *mexAB-oprM* (promoteur proximal), localisé en aval de celui contrôlé par MexR (Morita *et al.*, 2006). Dans les souches cliniques, il n'est pas rare de constater l'apparition de mutations dans un ou plusieurs de ces trois gènes répresseurs : *mexR* (mutants NalB) (Llanes *et al.*, 2004), *nalC* (mutants NalC) (Sobel *et al.*, 2005), et *nalD* (mutants NalD) (Horna *et al.*, 2018), ce qui provoque la surproduction de la pompe MexAB-OprM et une augmentation de la résistance aux antibiotiques substrats (entre 4 et 8-fois supérieure à celle d'une souche sauvage).

D'autres gènes régulateurs ont été identifiés mais leur action est indirecte ou s'exerce dans des conditions particulières. Ainsi, lorsque l'activateur transcriptionnel MexT surexprime l'opéron d'efflux *mexEF-oprN* chez les mutants *nfxC* (paragraphe 2.2.2.3), il réprime en même temps l'expression de MexAB-OprM médiée par le C4-HSL du *quorum sensing* (Maseda *et al.*, 2004) ; ce phénomène a pu être observé chez des mutants *nfxC* cliniques (Llanes *et al.*, 2011).

Le senseur RocS2 transmet des signaux au régulateur de réponse RocA2, conduisant à la répression de MexAB-OprM dans un modèle de culture en biofilm *in vitro* (Sivaneson *et al.*, 2011), PA3225 inhibe de manière indirecte l'activité de *mexAB-oprM* (Hall *et al.*, 2017), alors que AmpR (Balasubramanian *et al.*, 2012) et le système à deux composants AmgR/AmgS (Fruci *et al.*, 2018) l'activent indirectement. Enfin, dans des conditions de biofilm, CpxR (Tian *et al.*, 2016) et BlrR (Liao *et al.*, 2013) activent *mexAB-oprM*.

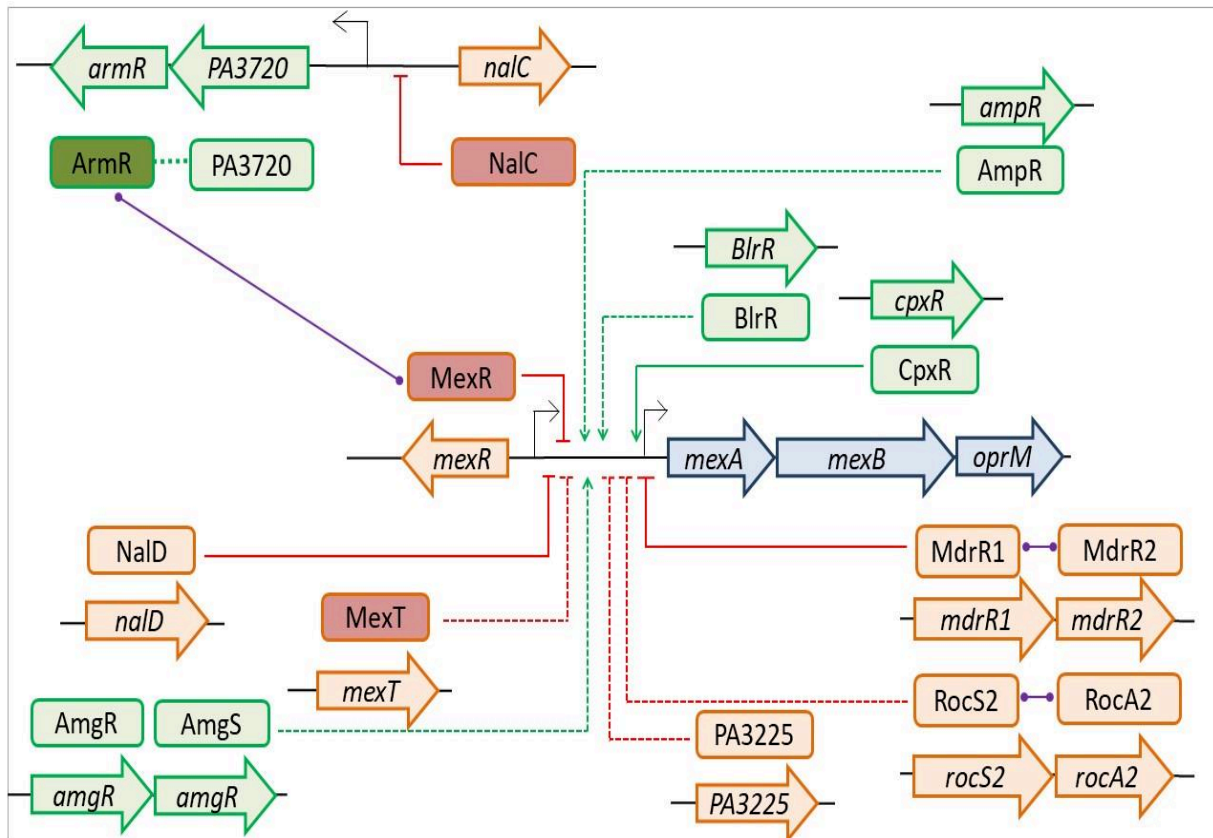


Figure 6 : Régulation de l'opéron mexAB-oprM (en orange, les répresseurs et en vert, les activateurs). MexR est le répresseur local de mexAB-oprM ; il peut être séquestré par ArmR dont l'effet semble être augmenté par la protéine PA3720. NalC est le répresseur de l'opéron PA3720-armR. NalD est un répresseur de mexAB-oprM. Les produits des gènes mexT, rocS2 et rocA2 en association, PA3225 inhibent de manière indirecte l'activité de mexAB-oprM, alors que AmpR et AmgR/AmgS l'activent indirectement. Enfin dans des conditions de biofilm CpxR, BlrR et MdrR1/MdrR2 activent mexAB-oprM même en présence de MexR. En clinique, les mutants sont principalement de type nalB (mutés dans mexR), nalC ou nalD (mutés dans nalC ou nalD). Les protéines dont le fond est plus foncé sont celles qui sont modulables par des stress. D'après (Fruci et Poole 2018; Hall, Zhang, et Mah 2017; Li, Plésiat, et Nikaido 2015; Tian et al., 2016; Heacock-Kang et al., 2018)

Induction de MexAB-OprM

L'expression constitutive de MexAB-OprM chez les souches sauvages est probablement due au fait que cette pompe majeure permet à *P. aeruginosa* de s'adapter à des environnements très différents. En effet, celle-ci possède de nombreux substrats non-antibiotiques tels que des colorants organiques (acridine orange, cristal violet, bromure d'éthidium), des détergents (triclosan), des sels biliaires (Li et Plésiat 2016), des composés volatils provenant des plantes comme l'huile essentielle de l'arbre à thé (Papadopoulos *et al.*, 2008) ou encore des métallophores (pseudopaline) (Gomez *et al.*, 2021). La molécule du *quorum sensing* 3-oxo-C12 HSL a même été suspectée d'être substrat de la pompe (Pearson *et al.*, 1995) au vu de sa faible concentration chez les mutants surproducteurs, mais des travaux récents ont montré que cela était dû au manque de disponibilité d'un précurseur, l'octanoate, en raison d'une altération du métabolisme des acides gras (Alcalde-Rico *et al.*, 2020).

Différents stress sont capables de provoquer la surproduction de MexAB-OprM. Par exemple, il est établi que les ROS (*reactive oxygen species*) peuvent, *via* l'oxydation du répresseur MexR (Evans *et al.*, 2001), induire une légère surexpression (2-fois) de l'opéron *mexAB-oprM* (Chen *et al.*, 2008). Comme tous les répresseurs de la famille MarR, la protéine MexR doit s'homodimériser pour interagir avec sa séquence ADN cible (Martin *et al.*, 1995). Cependant,

en situation de stress oxydant (H_2O_2 , hydroperoxyde de cumène ou disulfure de glutathion), la dimérisation de MexR n'est plus possible, ce qui empêche sa fixation au promoteur de *mexAB-oprM* et déprime son expression (Chen *et al.*, 2008). D'autres molécules comme les chlorophénols ou pentachlorophénols peuvent augmenter la production de MexAB-OprM *via* la séquestration de l'anti-répresseur NaIC (Starr *et al.*, 2012). Le mécanisme par lequel NaIC est séquestré n'a pas encore été élucidé mais des expériences de retard sur gel montrent qu'une concentration de 50 μM de pentachlorophénol permet d'empêcher la fixation de NaIC sur la séquence intergénique *naIC-PA3720* (Starr *et al.*, 2012). Notons que les chlorophénols induisent un stress oxydatif, potentiellement activateur de MexAB-OprM (McLamore *et al.*, 2010).

Certains antibiotiques peuvent également induire l'expression de *mexAB-oprM*. Par exemple, des expériences de *gel shift* ont montré que la novobiocine (une aminocoumarine) provoquait la dissociation du répresseur NaID de son site de fixation en amont de l'opéron d'efflux (Chen *et al.*, 2016). De façon indirecte, un traitement à la paromomycine augmente l'expression jusqu'à 4 fois de l'opéron *PA3720-armR* ; ArmR étant un activateur indirect de *mexAB-oprM*, sa production provoque une surexpression modeste de l'opéron d'efflux de l'ordre de 2-fois. Néanmoins, et de façon inexplicable, cette induction persiste chez des mutants portant un gène *armR* inactivé, suggérant l'existence d'autres voies d'induction (Fruci *et al.*, 2018). Par contre, l'induction disparaît lorsque l'on inactive le système à deux composants AmgRS. Ce système, connu pour être déclenché par le stress membranaire provoqué par les aminosides (Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999), permet la surexpression de *mexAB-oprM* par la fixation d'AmgR sur le promoteur de *mexAB-oprM*. D'ailleurs, le diamide, un composé capable d'oxyder les groupements thiols des protéines et provoquant leur accumulation dans le périplasme, semble avoir le même effet inducteur que celui de AmgRS. Bien que la cascade de régulation soit encore incomplètement élucidée, ces exemples montrent que MexAB-OprM participe au moins partiellement à la réponse au stress de l'enveloppe provoqué par des molécules antibiotiques ou non-antibiotiques (Fruci *et al.*, 2018). Toutefois, dans ces travaux, nous n'avons pas d'information sur l'éventuelle résistance aux substrats de MexAB-OprM qui pourrait en découler.

Très récemment, Laborda et ses collaborateurs ont criblé le pouvoir inducteur de 1243 composés naturels sur la pompe d'efflux MexAB-OprM à l'aide d'une construction luminescente : deux molécules possédant des noyaux aromatiques (le 4-chloroindole et une coumarine-like : le 2-butyl-2,3-dihydro-1H-naphtol[2',3':4,5]furo[2,3-f][1,3]benzoxazine-7,12-dione) ont montré le plus fort pouvoir inducteur sur l'opéron d'efflux (x2 et x2,8, respectivement), conduisant à une augmentation de la CMI de l'aztréonam de 2-fois (Laborda *et al.*, 2021). Chez une autre espèce de *Pseudomonas*, *P. syringae*, ce sont les flavonoïdes comme le butyl- ou le methylparabène (des composés phénoliques également), qui induisent MexAB-OprM en empêchant la fonction répressive de PmeR, l'équivalent de MexR chez cette espèce (Vargas *et al.*, 2011).

L'induction de la pompe majeure MexAB-OprM n'est pas une spécificité de *Pseudomonas*. Chez les entérobactéries, le système AcrAB-TolC (l'homologue de MexAB-OprM, essentiellement régulé par des activateurs transcriptionnels), est également sollicité de façon

transitoire en présence d'inducteurs. Par exemple, chez *Enterobacter asburiae* et *Enterobacter cloacae*, l'activation de cette pompe par le stress oxydant est dépendante du régulateur SoxR, comme le montre un mutant *soxR* de transposition ; toutefois, les auteurs de l'étude ne précisent pas si cette activation induit une résistance aux antibiotiques (Telke *et al.*, 2017). Chez *E. coli*, l'utilisation de mutants inactivés a montré que l'induction de AcrAB-TolC faisait partie de la réponse au stress global et qu'elle mettait en jeu des activateurs différents : Rob devient actif en présence d'acides gras (décanoate) ou de sels biliaires ; les activateurs SoxS et MarA sont dérégulés respectivement en situation de stress oxydatif et en présence de salicylate (Rosenberg *et al.*, 2003) ; et enfin, l'activateur RamA est surexprimé en présence d'indole, une molécule du *quorum-sensing* (Hirakawa *et al.*, 2005).

2.2.2.2 MexCD-OprJ

Présentation générale

MexCD-OprJ n'est que très peu exprimé chez les souches sauvages et son activation n'affecte pas le profil de résistance aux antibiotiques (Srikumar *et al.*, 1997). Néanmoins sa surexpression entraîne la diminution de la sensibilité de *P. aeruginosa* au chloramphénicol et aux quinolones (**Tableau 1**). En clinique, les mutants surproducteurs sont souvent inactivés dans *nfxB*, le gène répresseur local en amont de l'opéron (Poole *et al.*, 1996) (**Figure 7**).

A partir de mutants obtenus en laboratoire, il a été montré que d'autres gènes pouvaient réguler *mexCD-oprJ*. C'est le cas de *esrC* dont la délétion n'induit pas d'augmentation d'expression de *mexCD-oprJ*, sauf en cas de stress membranaire (jusqu'à 10 fois). C'est également le cas du gène PA2572 dont l'inactivation induit une faible surexpression de MexCD-OprJ (4 fois) (McLaughlin *et al.*, 2012). Le gène *vqsM*, lequel code un activateur global du *quorum sensing* et de la virulence, module également de façon indirecte MexCD-OprJ. Sa délétion induit la surexpression de MexCD-OprJ (Liang *et al.*, 2014).

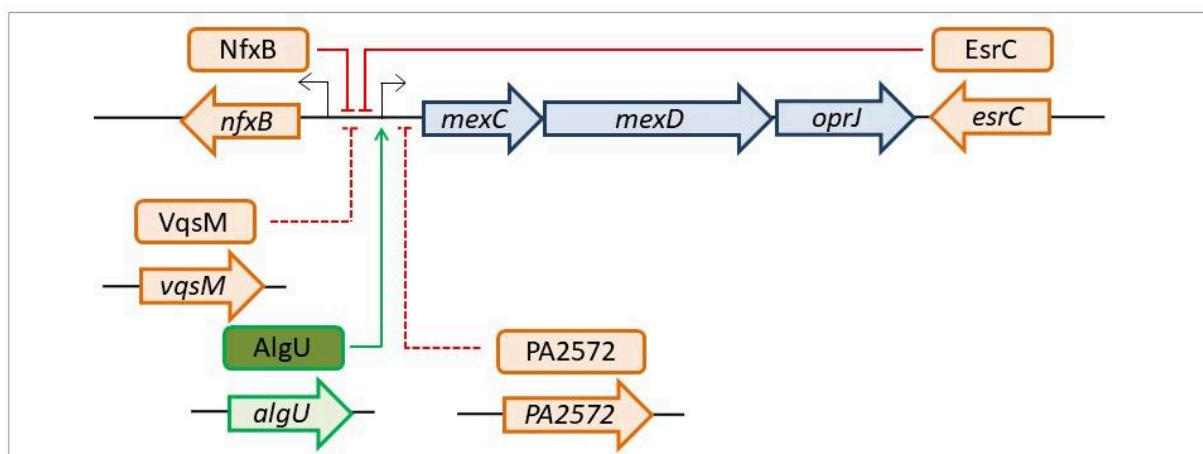


Figure 7 : Régulation de l'opéron mexCD-OprJ (en orange, les répresseurs et en vert, les activateurs). NfxB est le répresseur local de mexCD-oprJ. EsrC et PA2572 sont des répresseurs de mexCD-OprJ. AlgU active directement mexCD-oprJ, alors que VqsM, en activant la transcription du répresseur NfxB, a une action indirecte sur l'opéron d'efflux. Les protéines dont le fond est plus foncé sont celles qui sont inducibles par des stress. D'après (McLaughlin *et al.*, 2012, Liang *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2015, Purssell *et al.*, 2015).

Induction de MexCD-OprJ

MexCD-OprJ participe au potentiel adaptatif de *P. aeruginosa* lors de perturbations membranaires par des molécules telles que le chlorure de tétraphénylphosphonium, le bromure d'éthidium, la rhodamine ou des antiseptiques à large spectre comme la chlorhexidine (Morita *et al.*, 2003). Dans ce cas, la surproduction de l'opéron *mexCD-oprJ* dépend du facteur sigma AlgU, un régulateur-clé de la réponse au stress de l'enveloppe chez *P. aeruginosa* (Fraud *et al.*, 2008).

Parmi les molécules naturelles potentiellement inductrices de MexCD-OprJ, ont été identifiés un benzodioxane (le 4-(2,3-dihydro-1,4-benzodioxine-6-yl)-1-butanamine) et une coumarine (le 5-([benzyl(méthyl)amino]méthyl)-6-hydroxy-2-(4-méthoxyphényl)-4H-chromène-4-one), capables d'augmenter l'expression de l'opéron d'efflux respectivement de 7,6 et 11 fois (Laborda *et al.*, 2021).

2.2.2.3 MexEF-OprN

Présentation générale

Tout comme MexCD-OprJ, MexF-OprN est faiblement produit dans les souches sauvages (Köhler *et al.*, 1997). C'est la surproduction stable de cette pompe qui permet la résistance au chloramphénicol, au cotrimoxazole et aux fluoroquinolones (**Tableau 1**), mais aussi et de façon indirecte aux carbapénèmes, car MexT, l'activateur de MexEF-OprN, est également le répresseur du gène codant la porine OprD, porte d'entrée majeure de ces antibiotiques dans la bactérie (Ochs *et al.*, 1999). Dans les souches cliniques, la surexpression de MexEF-OprN repose essentiellement sur l'inactivation du gène *mexS*, dont le produit est une probable oxydo-réductase ; le(s) substrat(s) supposé(s) toxique(s) de MexS s'accumule(nt) dans le cytoplasme ce qui entrainerait la tétramérisation de MexT et donc son activation (Richardot *et al.*, 2016). Plus rarement, des mutations dans le gène *mexT* ont été identifiées dans les souches cliniques, conduisant à l'auto-activation de MexT (Juarez *et al.*, 2018) (**Figure 8**).

D'autres gènes sont également impliqués dans la régulation de MexEF-OprN, même si leur rôle est moins évident chez les mutants surproducteurs identifiés dans les souches cliniques. Certains ont un rôle de répresseur : *mvaT* qui code une protéine de la famille H-NS (*histone-like nucleoid structuring family*) et dont l'inactivation conduit à la surexpression (jusqu'à 6 fois) de *mexEF-oprN* (Westfall *et al.*, 2006), *ampR* un gène de régulation globale dont l'inactivation affecte plus de 500 gènes et induit l'expression de *mexEF-oprN* (Balasubramanian *et al.*, 2012), le gène senseur *mxtR* qui régule la production des molécules du PQS (*Pseudomonas quinolone signal*) en réprimant le régulateur MexT et dont l'inactivation conduit à la surproduction de MexEF-OprN (Zaoui *et al.*, 2012), *nmoR* dont l'inactivation augmente de 25 fois l'expression de l'opéron (Vercammen *et al.*, 2015), et PA2449 (*gcsR*), un gène impliqué dans la régulation du catabolisme de la glycine, une source majeure de carbone chez *P. aeruginosa* (Sarwar *et al.*, 2016) et dont l'inactivation augmente 50 fois l'expression de *mexEF-oprN* par un mécanisme encore inconnu (Lundgren *et al.*, 2013). D'autres gènes régulateurs, au contraire, ont un rôle d'activateur. Il s'agit de *parR* dont l'inactivation entraîne la sous-expression (environ 8 fois) de *mexS* et consécutivement celle de *mexEF-oprN* (Wang *et al.*, 2013), mais

aussi *blrR*, codant une protéine de la famille MerR, capable d'activer directement l'expression de *mexAB-oprM* et de *mexEF-oprN* et qui apparaît diminuée chez des mutant $\Delta blrR$ (Liao *et al.*, 2013).

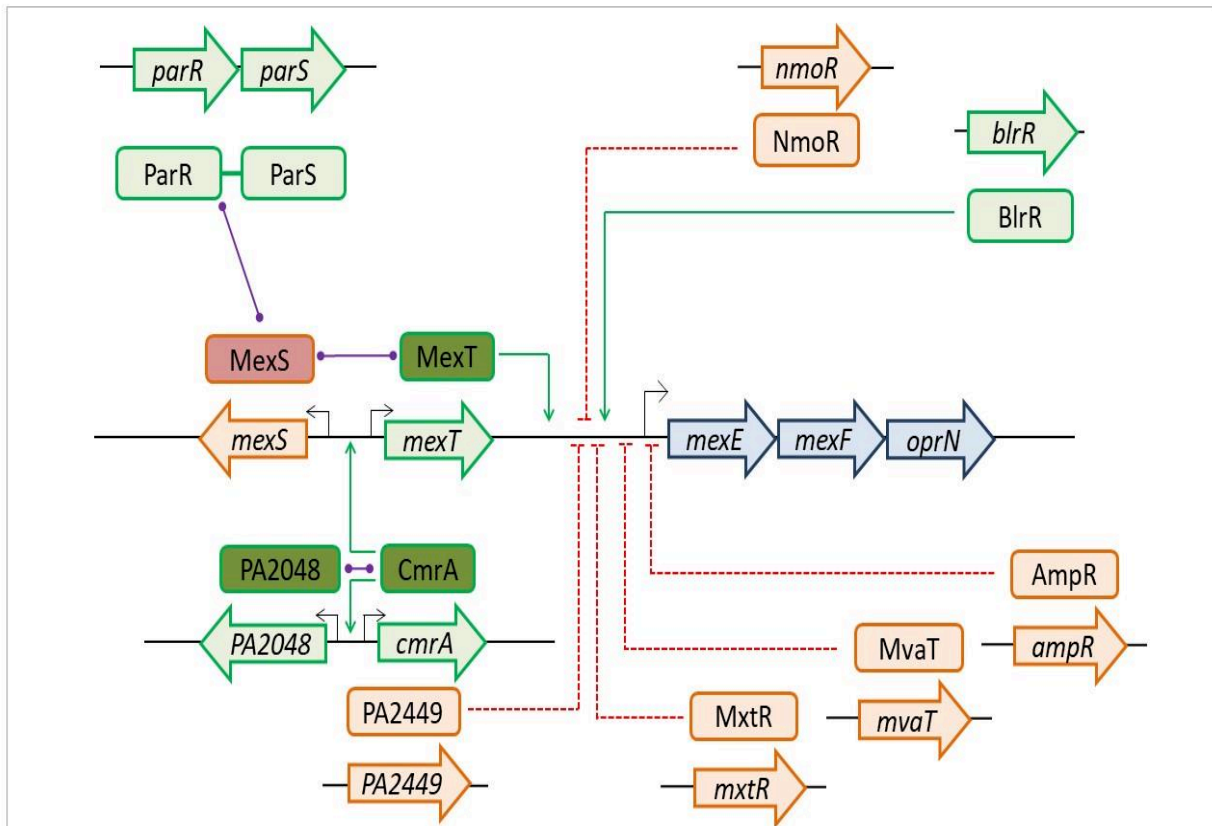


Figure 8 : Régulation de l'opéron *mexEF-oprN* (en orange, les répresseurs et en vert, les activateurs). L'expression de *mexEF-oprN* peut être provoquée par l'activateur MexT, dont la fixation sur le promoteur est dépendante de l'inactivation de l'enzyme MexS, soit par mutation, soit par interaction avec le régulateur du système ParRS. Le régulateur transcriptionnel CmrA avec l'enzyme PA2048 active MexT. BlrR est un activateur direct de *mexEF-oprN* et PA2449, MxtR, MvaT, NmoR et AmpR diminuent l'expression de *mexEF-oprN* par des voies encore inconnues. Les protéines dont le fond est plus foncé sont celles qui sont inducibles par des stress. D'après (Lundgren *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2015, Vercammen *et al.*, 2015, Juarez *et al.*, 2018).

Induction de MexEF-OprN

Quelques-uns parmi ces régulateurs répondent à des signaux environnementaux et induisent transitoirement MexEF-OprN. Par exemple, il a été montré que MxtR était sensible à l'état redox de l'ubiquinone-0. Lorsque ce transporteur d'électrons de la chaîne respiratoire est réduit par du dithionite, la cinétique de phosphorylation de MxtR diminue, empêchant son activité ; la dépression consécutive de MexT conduit à la surproduction de MexEF-OprN (Zaoui *et al.*, 2012).

Il semble également exister un lien entre le stress nitreux et MexEF-OprN puisque l'utilisation de molécules donneuses de NO telles que le s-nitrosoglutathion (GSNO) ou le diéthylènetriamine (DETANONOate) induisent la surexpression de la pompe de façon MexT-dépendante (Fetar *et al.*, 2011). Parmi les gènes également surexprimés, *xenB* est particulièrement intéressant car son produit joue un rôle dans l'élimination des groupes nitreux sur les molécules telles que la nitroglycérine ou le trinitrotoluène (Fuller *et al.*, 2009).

Le stress disulfure est également capable de mobiliser la pompe MexEF-OprN car un traitement au diamide, qui provoque une déplétion en glutathion, active MexT et consécutivement le système d'efflux (Fargier *et al.*, 2012).

Des conditions d'hypoxie semblent aussi pouvoir induire l'expression de la pompe d'efflux MexEF-OprN. En effet, l'inactivation du senseur à oxygène *Pseudomonas* propyl hydrolase (PPHD) augmente la virulence de *P. aeruginosa* mais également la production de MexEF-OprN (500-fois plus que chez la souche parentale). Les auteurs ont constaté que la souche sauvage PAO1 se comportait de la même façon dans des conditions d'hypoxie, suggérant que le manque d'oxygène induit une augmentation de la virulence et la surexpression de MexEF-OprN *via* PPDH (Schaible *et al.*, 2020).

Enfin, des travaux, réalisés au laboratoire, ont mis en évidence que *P. aeruginosa* surexprimait la pompe MexEF-OprN de manière transitoire en présence de glyoxal et de méthylglyoxal (Juarez *et al.*, 2017). Ces molécules électrophiles activent les gènes *PA2048* et *cmrA*, dont les produits (respectivement, une mono-oxygénase et un activateur transcriptionnel de la famille AraC) activent MexEF-OprN *via* le régulateur MexT (Juarez *et al.*, 2017). C'est ce résultat qui nous a poussé à nous intéresser aux huiles essentielles qui, pour la plupart, contiennent des molécules électrophiles.

2.2.2.4 *MexXY/OprM*

Présentation générale

Comme MexAB-OprM, MexXY/OprM participe à la résistance naturelle de *P. aeruginosa*. Il a pour substrats le céfépime et les fluoroquinolones, mais aussi et de façon spécifique les antibiotiques de la famille des aminosides (Aires *et al.*, 1999, Sobel *et al.*, 2005, Morita *et al.*, 2012). Bien que les protéines MexX et MexY soient codées par le même opéron, elles fonctionnent avec la porine OprM du système MexAB-OprM, excepté chez les souches telles que *P. aeruginosa* PA7 qui contient un gène codant une protéine de membrane externe (OprA) au sein de l'opéron (*mexXY-oprA*) (Morita *et al.*, 2012). En 1999, l'augmentation de la sensibilité de PAO1 aux aminosides (de 2 à 8 fois), consécutivement à l'insertion inactivatrice du transposon Tn501 dans *mexX*, a permis de mettre en évidence l'impact de MexXY dans la résistance naturelle de *P. aeruginosa* (Aires *et al.*, 1999). MexZ est le répresseur local de *mexXY*. Comme tous les régulateurs de la famille TetR, il agit en homodimère au niveau de la région inter-génique *mexZ-mexX* (Aires *et al.*, 1999). Depuis, d'autres régulateurs ont été décrits comme étant capables de modifier l'expression de l'opéron d'efflux (**Figure 9**). Par exemple, l'activité de MexZ peut être compromise par l'anti-répresseur ArmZ (Yamamoto *et al.*, 2009). Le gène *armZ* fait lui-même partie d'un opéron (*armZ-PA5470*) dont l'expression est atténuée par un *peptide leader* de 13 acides aminés, PA5471.1, dont le gène se situe en amont de l'opéron *armZ-PA5470* (Morita *et al.*, 2009). Dans les conditions normales de croissance, la transcription de *PA5471.1* et de la région intergénique donne naissance à un ARNm avec un signal d'arrêt inhibant la transcription de *armZ*. Lorsque la synthèse protéique est perturbée, la traduction du *peptide leader* est compromise, ce qui modifie la conformation de cet ARNm et permet la transcription de l'opéron *armZ-PA5470*, la production de l'anti-répresseur ArmZ et par conséquent la surexpression de *mexXY*. Ainsi, divers événements

généétiques ont été décrits dans la littérature pour provoquer la surexpression de *mexXY* via ArmZ : c'est le cas de la surexpression des gènes *rplU* ou *rpmA* (Lau *et al.*, 2012) et des mutations dans *shuB* qui conduisent à une accumulation de protéines mal repliées et, par conséquent, à l'activation de ArmZ (Shi *et al.*, 2015). Enfin, et sans lien avec ArmZ, l'inactivation des gènes *PA2572* et *PA2573*, augmente l'expression de *mexXY* (entre 9- et 17-fois) par un mécanisme encore inconnu (McLaughlin *et al.*, 2012).

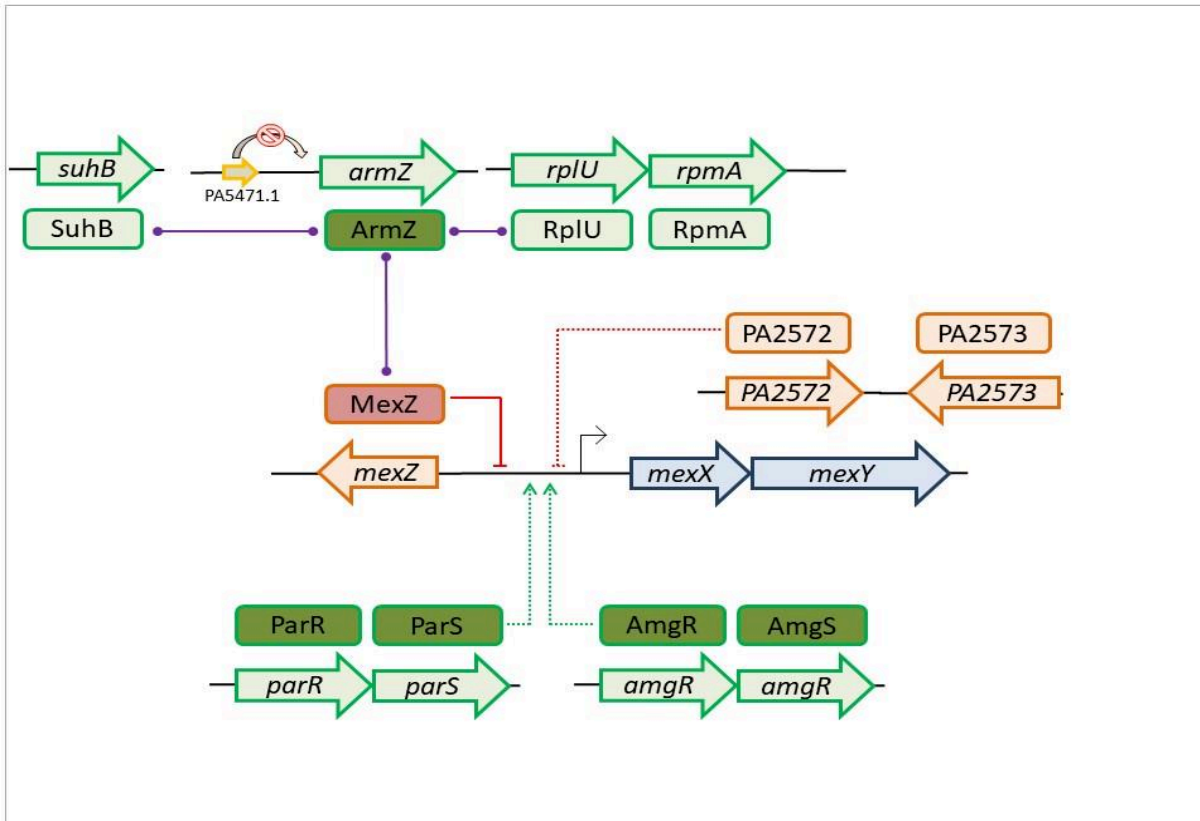


Figure 9 : Régulation de l'opéron *mexXY* (en orange les répresseurs et en vert les activateurs). Le répresseur local MexZ agit sous la forme d'un homodimère et peut être inactivé par l'antirépresseur ArmZ. Des mutations dans les gènes *rplU/rpmA* et *suhB* entraînent la surexpression de MexXY dépendante de ArmZ. Des mutations gain de fonction ou une induction des systèmes à deux composants *ParR/S* et *AmgR/S* peuvent induire la surexpression de *mexXY*. Enfin, par un mécanisme inconnu, les produits des gènes *PA2572* et *PA2573* agissent comme des répresseurs indirects de *mexXY*. D'après (McLaughlin *et al.*, 2012, Li *et al.*, 2015).

Dans les souches cliniques, on distingue 3 types de mutants surproducteurs de MexXY/OprM. Les mutants *agrZ* (aminoglycoside resistance MexZ-dependent) présentent une mutation dans *mexZ* (empêchant sa formation ou son homodimérisation) ou dans la région intergénique *mexZ-mexX* (Llanes *et al.*, 2004). Ils peuvent être sélectionnés par l'ajout de n'importe quel substrat de MexXY/OprM dans le milieu de culture et sont courants en clinique (Guénard *et al.*, 2014). Les mutants *agrW1* affichent des mutations perturbant la synthèse protéique, telles que celles trouvées dans *rplA*, codant la protéine ribosomale L1 (Guénard *et al.*, 2014). Enfin, les mutants *agrW2*, qui surexpriment de 2 à 8 fois la pompe d'efflux par rapport à la souche sauvage, renferment des mutations gain de fonction dans les gènes du système à deux composants *ParRS*, activateur de l'expression de MexXY-OprM (Guénard *et al.*, 2014; Li et Plésiat 2016; Muller, Plésiat, et Jeannot 2011).

Induction de MexXY/OprM

Comme les trois autres pompes, MexXY/OprM répond à différents stress. Le stress oxydatif étant le plus commun chez les bactéries aérobies, MexXY/OprM est surproduite sous l'effet du peroxyde d'hydrogène. Cette induction est perdue lorsque les gènes codant l'anti-répresseur ArmZ ou le répresseur MexZ sont inactivés (Chang *et al.*, 2005a, b, Fraud *et al.*, 2011, Hay *et al.*, 2013). La particularité de MexXY/OprM réside dans le fait que c'est la seule pompe inductible par les antibiotiques ayant pour cible le ribosome bactérien (Jeannot *et al.*, 2005, Morita *et al.*, 2006). Trois voies permettent de surproduire MexXY/OprM en réponse à ces antibiotiques : (1) l'activation de l'anti-répresseur ArmZ lors de la pause ribosomale et son interaction avec MexZ (Morita *et al.*, 2006) ; dans cette voie, l'inactivation de la protéine SuhB induirait l'expression de *mexXY* par un mécanisme dépendant de ArmZ (Li *et al.*, 2013, Shi *et al.*, 2015) ; (2) des protéines mal repliées, conséquence de l'action perturbatrice des antibiotiques sur le ribosome, activent le système à deux composants AmgRS, dont la protéine AmgR agit indirectement sur MexXY *via* la protéine PA5528 (Lau *et al.*, 2015) ; (3) les interactions des peptides antimicrobiens (tels que la colistine, la polymyxine B et l'indolicidine) avec les LPS de la membrane externe induisent l'expression de *mexXY* par l'activation du système à deux composants ParRS (Muller *et al.*, 2011).

2.3 Agents inhibiteurs de résistance

Les bactéries, par leur capacité à coloniser quasiment tous les environnements, peuvent perturber les équilibres microbiens et nuire aux végétaux comme aux animaux. C'est pourquoi il n'est pas surprenant de constater que de nombreux organismes vivants produisent des molécules capables d'inactiver ou d'atténuer les mécanismes de résistance développés par les bactéries contre des molécules ou agents toxiques. De la même façon, les bactéries productrices d'antibiotiques ont elles-mêmes développé des stratégies leur permettant de se protéger contre ces facteurs, par exemple, par des mécanismes basés sur le modèle poison/antipoison (Mak *et al.*, 2014).

La recherche de molécules naturelles ou synthétiques ayant des propriétés anti-résistances est devenue un enjeu majeur dans la lutte contre les infections notamment nosocomiales. Ces agents sont des RIA (*Resistance Inhibiting Agents*) ou ARB (*Antibiotic Resistance Breakers*) (Laws *et al.*, 2019). Ils sont utilisés en association avec des antibiotiques et jouent le rôle de chimiosensibilisateurs. Quelques fois, ces molécules peuvent être utilisées non pas pour améliorer l'activité d'un antibiotique mais pour éviter l'émergence de la résistance. C'est le cas du complexe iodiné FS-1 anti-tuberculose. Certains auteurs avancent l'hypothèse que la sélection de mutants résistants aux antibiotiques serait trop coûteuse énergétiquement pour les bactéries en présence d'iode FS-1 et diminuerait leur viabilité (Gagneux *et al.*, 2006). Ainsi, dans un modèle d'infection expérimentale utilisant le cochon d'inde, il a été montré que les souches de *Mycobacterium tuberculosis* combattues avec la combinaison antibiotiques/FS-1 étaient moins résistantes aux antibiotiques que les isolats soumis à des antibiotiques seuls (Illin *et al.*, 2017).

L'activité potentialisatrice des RIA peut jouer à plusieurs niveaux : la perméabilité membranaire, l'efflux, les enzymes inactivatrices ou la cible des antibiotiques.

2.3.1 Agents inhibiteurs d'enzymes inactivatrices

L'exemple le plus ancien est sûrement celui de l'acide clavulanique, introduit dans les années 1970 conjointement avec les β -lactamines à large spectre pour favoriser leur activité. Cette molécule, produite naturellement par une bactérie filamenteuse du sol, *Streptomyces clavuligerus*, est un substrat des β -lactamases bactériennes. En s'y fixant de façon irréversible, elle empêche l'action de celles-ci sur les β -lactamines administrées conjointement (Reading *et al.*, 1977). D'autres inhibiteurs irréversibles de β -lactamases ont depuis été introduits sur le marché : le sulbactam, puis son dérivé le tazobactam dont l'usage a été approuvé en 1993 en association avec la pipéracilline (Bush 1988). Plus récemment, on a assisté au développement d'inhibiteurs réversibles qui se lient à l'enzyme de façon provisoire : l'avibactam, le vaborbactam et le rélébactam (Shlaes 2013).

2.3.2 Agents limitant le nombre de cibles

La cible des β -lactamines étant les PLP (Protéines Liant la Pénicilline), principalement les PLP2 et PLP3 chez *P. aeruginosa*, on peut améliorer l'efficacité de cette famille d'antibiotiques en saturant un maximum de cibles potentielles. Ainsi, l'association de l'amoxicilline (saturation des PBP4 et 5) et de la céfotaxime (saturation des PBP 2 et 3) a un effet synergique sur la bactérie *Enterococcus faecalis* (Mainardi *et al.*, 1995). De la même manière, il a été montré chez des souches de *Staphylococcus aureus* sauvages ou résistantes à la méthicilline (SARM), que l'association β -lactamine/fofosfomycine était synergique, la fosfomycine diminuant l'expression des PLP et augmentant par conséquent l'efficacité des β -lactamines (Utsui *et al.*, 1986).

2.3.3 Agents inhibiteurs de systèmes d'efflux

La recherche de molécules capables d'inhiber l'efflux actif des antibiotiques (EPIs, *Efflux Pump Inhibitors*) est un objectif pour de nombreuses équipes. Pour résumer, les principales classes d'EPIs sont présentées dans le **Tableau 2**.

Tableau 2 : Origine et cibles des principales classes d'inhibiteurs d'efflux. D'après (Tegos et al., 2002, Negi et al., 2014, Opperman et al., 2014, Siriyong et al., 2017, Borselli et al., 2019, Sharma et al., 2019).

Familles	Exemples	Cibles
Dérivés de plantes		
Alkaloïdes	Résérpine	Super-familles MFS et RND : NorA de <i>S. aureus</i> et Bmr de <i>B. subtilis</i> .
	Pipérine	NorA de <i>S. aureus</i> et les pompes d'efflux de <i>Mycobacterium smegmatis</i> , <i>M. tuberculosis</i>
	Connessine	Inhibiteur de MexAB-OprM chez <i>P. aeruginosa</i> .
Flavonoïdes	Baicaléine (5,6,7-trihydroflavone)	NorA de <i>S. aureus</i> ; potentialise l'effet de la ciprofloxacine et des β -lactamines chez les SARM.
	5'-méthoxy-hydrocarpine	Augmente l'efficacité de la berbérine et de la norfloxacine chez <i>S. aureus</i> et <i>M. smegmatis</i> en bloquant les pompes de la famille RND.
Polyphénols	Gallate de catéchine	NorA de <i>S. aureus</i> .
	Epigallocatechine	Augmente l'efficacité de la tétracycline, l'érythromycine et la ciprofloxacine chez des Gram + et – (<i>Staphylococcus spp</i> et <i>Campylobacter spp</i>).
	Curcumine	Potentiel inhibiteur de pompes chez <i>P. aeruginosa</i> .
	3,4-dibromopyrrole-2,5-dione	Inhibition de MexAB-OprM, MexXY/OprM chez <i>P. aeruginosa</i> et AcrAB-TolC chez <i>E. coli</i> .
Diterpènes phénoliques	Acide carniosique, carnosol	Potentiale l'activité de la tétracycline et de l'érythromycine chez des souches de <i>S. aureus</i> exprimant l'ABC transporteur MsrA et la pompe d'efflux TetK.
	Géraniol	Diminue la CMI du chloramphénicol chez les souches de <i>Enterobacter aerogenes</i> surexprimant AcrAB-TolC.
Acides	5'-méthoxyhydrocarpin	Potentiale l'activité des antibiotiques chez <i>S. aureus</i> .
Produits de synthèse		
Peptidomimétiques	PA β N	Premier inhibiteur d'origine synthétique actif sur les pompes de la famille RND.
Dérivés des quinoléines	Pyridoquinolones	Inhibiteurs compétitifs des pompes de la famille RND. Restaurent l'activité de la norfloxacine chez <i>E. aerogenes</i> .
Dérivés de l'arylpipéridine et de l'arylpipérazine	Arylpipéridine	Agit sur les pompes MDR de <i>S. aureus</i> et sur AcrAB-tolC de <i>E. coli</i> . Aucune activité sur MexAB-OprM et MexCD-OprJ de <i>P. aeruginosa</i> .
	Arylpipérazine	Restaure l'activité du bromure d'éthidium et de la lévofloxacine sur les souches de <i>E. coli</i> surexprimant AcrAB et AcrEF.
Pyranopiridine	MBX2319	Inhibiteur de AcrAB-TolC chez <i>E. coli</i> .
Dérivés des polyamines-isoprényl	Cpd1-Cpd7	Inhibe l'efflux par dépolarisation chez <i>Bordetella bronchiseptica</i> .

SARM : *S. aureus* résistant à la méthicilline

La molécule de synthèse Phe-Arg- β -naphthylamide (PA β N) (Renau *et al.*, 1999) malgré son activité de EPI n'est pas utilisable en thérapeutique en raison de sa toxicité chez l'Homme (Lamers *et al.*, 2013). De nombreux EPIs sont d'origine naturelle. C'est le cas de la réserpine, un alcaloïde du rhizome de *Rauwolfia serpentina*, capable d'interagir avec les pompes de la famille MFS telles que Bmr3 de *Bacillus subtilis* (Klyachko *et al.*, 1997) et NorA de *S. aureus* (Stavri *et al.*, 2007). Toutefois, l'utilisation de cette molécule peut avoir des effets adverses, car en bloquant la pompe d'efflux PmrA de *Streptococcus pneumoniae*, la réserpine sélectionne des mutants multirésistants surproduisant les ABC transporteurs PatA et PatB (Garvey *et al.*, 2008).

Divers EPIs isolés de plantes ont montré une activité synergique avec les antibiotiques (le pentaester, la chalcone, le stilbène, le spinozan A, l'isoflavone...) (Stavri *et al.*, 2007). Par exemple, en inhibant la pompe NorA de *S. aureus*, le pentaester rend la bactérie sensible à des antibiotiques extraits de plantes tels que la berbérine et l'acide cassique, ainsi qu'aux fluoroquinolones, ciprofloxacine et norfloxacine (Stermitz *et al.*, 2003). Ces résultats suggèrent que d'autres molécules extraites de plantes, comme les huiles essentielles et leurs composés, pourraient synergiser l'action des antibiotiques. Cet aspect sera développé dans les paragraphes suivants.

2.3.4 Agents perméabilisants

De manière simple, les RIA peuvent agir en augmentant la perméabilité membranaire. C'est le cas de l'EDTA qui en chélatant les cations divalents Ca²⁺ et Mg²⁺, provoque la rupture des liaisons électrostatiques entre les molécules adjacentes du LPS et crée des brèches dans le continuum lipidique de la membrane externe (Muschel *et al.*, 1968). Toutefois l'action perméabilisante ne suffit pas toujours à augmenter l'activité des antibiotiques. Trois peptides antimicrobiens perméabilisants (*VAYR* = RRGWVLALYLRLYGRR; *ARVA = RRGWLALRLVLALY ; VVRG = WVVLRLGLY) ont été évalués sur *E. coli* et *S. aureus* en association avec des molécules antibiotiques (ampicilline, ciprofloxacine, streptomycine et vancomycine). Sur toutes les combinaisons testées, le FIC (*Fractional Inhibition Concentration*¹) était supérieur à 1, signifiant l'absence de synergie entre les peptides et les antibiotiques (He *et al.*, 2015).

Comme vu dans les paragraphes précédents, les inhibiteurs d'efflux actif (EPIs) se révèlent souvent trop toxiques pour une utilisation thérapeutique. L'action perméabilisante de certains peptides antimicrobiens a donc été testée pour diminuer les concentrations d'inhibiteurs de pompes à efflux, et restaurer l'activité des antibiotiques. Ainsi, une étude sur des souches de *P. aeruginosa* surproduisant la pompe MexAB-OprM a montré qu'en présence de PA β N (EPI) et de polymyxine B nonapeptide (PMBN, perméabilisant), l'activité de plusieurs antibiotiques (azithromycine, doxycycline et pipéracilline) augmentait d'un facteur allant de 2 jusqu'à 133,

¹ FIC (*Fractional Inhibition Concentration*) : rapport de la valeur de la CMI d'un antibiotique utilisé en association sur la valeur de CMI du même antibiotique utilisé seul. Le FIC index permet de déterminer si l'effet entre deux molécules est antagoniste (> 2), indifférent (entre 2 et 1), additif (entre 1 et 0,5) ou synergique (\leq 0,5) (Langeveld *et al.*, 2014).

tandis que la viabilité des cellules initiatrices de biofilm chutait jusqu'à dix millions de fois (Ferrer-Espada *et al.*, 2019).

Toujours dans le but de permettre une meilleure pénétration (et donc une action) des antibiotiques, certaines associations d'antibiotiques semblent donner des résultats intéressants, notamment l'association ampicilline/gentamicine, dans laquelle l'ampicilline facilite l'entrée de la gentamicine par son action inhibitrice sur la synthèse de la paroi bactérienne (Moellering *et al.*, 1971, Davis 1982). Toutefois, ces résultats n'ont pas été confirmés depuis.

Non considérés comme de réels agents perméabilisants, les sidérophores, des chélateurs de fer synthétisés et sécrétés par les bactéries pour capter le fer nécessaire à leur développement, sont utilisés en complexe avec des antibiotiques pour faciliter l'entrée de ces derniers dans la cellule. Depuis plusieurs années, les sidérophores font ainsi l'objet d'études utilisant une stratégie de type « cheval de Troie », de vectorisation des molécules bactériennes. A ce jour, plusieurs conjugués ont été construits avec les sidérophores de *P. aeruginosa* (pyoverdine, pyochéline) (Mislin *et al.*, 2014) ou d'entérobactéries (entérobactine) (Zheng *et al.*, 2014). Parmi les molécules développées par l'industrie pharmaceutique, le céfidérol, un groupement monocathécol greffé sur une céphalosporine, a reçu une autorisation de mise sur le marché américain et européen pour le traitement des infections à bactéries multirésistantes (Lee et Yeo 2020).

A ce jour, la recherche de molécules perméabilisantes pouvant provoquer des altérations membranaires et la déstructuration du LPS, des changements du potentiel électrique transmembranaire, une fuite d'ATP ou la dissipation du gradient de protons, est en plein essor dans le but d'obtenir une synergie avec les antibiotiques. C'est le cas de la ménadione (Andrade *et al.*, 2017), des céragénines (Chin *et al.*, 2007), de certaines polyamines (naphtylacétylspermine, méthoctramine, motuporamine) (Katsu *et al.*, 2002, Borselli *et al.*, 2019) et des dérivés polyaminostéroïdiens (squalamine, claramine) (Salmi *et al.*, 2008, Blanchet *et al.*, 2018). Nombre de ces perméabilisants sont des dérivés hémi-synthétiques de molécules d'origine naturelle animale ou végétale. Parmi elles, celles issues d'huiles essentielles de plantes (cinnamaldéhyde, eugénol, thymol, carvacrol, terpinène-4-ol...) font aujourd'hui l'objet d'un intérêt croissant.

2.4 Les huiles essentielles (HEs)

Les huiles essentielles (HEs) sont des mélanges naturels complexes de métabolites secondaires volatils, isolés des plantes par hydro-distillation ou par expression mécanique. Elles peuvent être obtenues à partir de différentes parties de la plante (feuilles, graines bourgeons, fleurs, tiges, racines, écorce, fruits) mais aussi à partir des gommés qui s'écoulent du tronc des arbres. Les HEs contiennent principalement des molécules issues du métabolisme secondaire de la plante. Leur rôle physiologique dans le règne végétal n'est pas totalement

compris. En effet, ces métabolites ne participent pas directement à la croissance de la plante, mais leur diversité moléculaire leur confère une protection naturelle contre les micro-organismes potentiellement pathogènes et contre les insectes. En thérapeutique, leurs propriétés sont diverses, allant du pouvoir antioxydant de l'origan (Karioti *et al.*, 2006), anti-inflammatoire de la carline à feuilles d'ancanthe (Dordević *et al.*, 2007), anti-tumoral de la mélisse (de Sousa *et al.*, 2004), aux propriétés antimicrobiennes de la cannelle et de la citronnelle (Burt 2004).

2.4.1 Composition

Les huiles essentielles sont des cocktails riches de plusieurs centaines de composés organiques différents (De Groot *et al.*, 2016) (**Tableau 3**). Toutefois, pour chacune d'elle, on trouve de 1 à 3 composé(s) majoritaire(s), représentant plus de 70% de la composition finale, les autres n'étant présents qu'à l'état de traces. De plus, cette composition varie en fonction de différents facteurs incluant la zone géographique de la culture (exemple : cannelle de Chine ou de Ceylan), la période de récolte et les conditions de culture, le stade de développement des plantes et les organes prélevés (Senatore 1996). C'est pourquoi dans ce travail, nous ne travaillerons pas avec les HEs, mais avec leurs composés purifiés : par exemple, le cinnamaldéhyde, extrait de l'huile essentielle de cannelle.

Trois grands groupes de molécules composent les HEs : les terpènes, les terpénoïdes et les phénylpropènes (**Figure 10**).

- Les *terpènes* sont synthétisés dans le cytoplasme des plantes à partir d'isoprène (C₅H₈). Leur chaîne hydrocarbonée peut être cyclisée par des cyclases (Hyldgaard *et al.*, 2012). Les plus courants sont le monoterpène, dit limonène (C₁₀H₁₆) et le sesquiterpène (C₁₅H₂₄).
- Directement dérivés des terpènes, les *terpénoïdes* ont subi une modification enzymatique telle que l'ajout de molécules d'oxygène ou le retrait de groupements méthyles (Hyldgaard *et al.*, 2012). La famille des terpénoïdes est la plus variée sur le plan structural. On y trouve des alcools, esters, aldéhydes, cétones, éthers, phénols et époxydes. Parmi eux, on peut citer le thymol, le carvacrol, le linalool, le linalylacétate, le citronellal, le pipéritone, le menthol ou encore le géraniol. L'activité antimicrobienne de ces molécules est principalement due à ces groupes fonctionnels (Dhifi *et al.*, 2016). Par exemple, les terpènes porteurs d'un groupe alcool présentent l'activité antimicrobienne la plus importante (Nazzaro *et al.*, 2013).
- La dernière grande famille est celle des phénylpropènes, sous-famille des phénylpropanoïdes. Ces molécules sont biosynthétisées à partir des acides aminés aromatiques que sont la phénylalanine et la tyrosine. Elles sont généralement caractérisées par la présence d'un groupement hydroxyle fixé à un cycle phényle. Produites moins fréquemment par les végétaux que les membres des deux autres familles, elles présentent une forte activité bactéricide. Les plus étudiées sont l'eugénol, l'isoeugénol, la vanilline, la safrole, et le cinnamaldéhyde.

Tableau 3 : Tableaux représentant la diversité chimique des huiles essentielles d'après (De Groot et al., 2016). (A) nombre de molécules différentes identifiées dans quelques huiles essentielles. (B) différentes familles chimiques fréquemment retrouvées dans les huiles essentielles.

A. Huiles essentielles	Nombre de composés
Rosemary oil	505
Geranium oil	500
Lavender oil	450
Vetiver oil	445
Rose oil	440
Basil oil, sweet	435
Laurel leaf oil	425
Spike lavender oil	395
Black cumin oil	340
Orange oil, sweet	335
Peppermint oil	335
Valerian oil	330
Thyme oil	325
Carrot seed oil	315
Melissa oil (lemon balm oil)	310
Sage oil, Dalmatian	310
Black pepper oil	305

B. Familles chimiques	Exemples de composés
Acyclic terpenes	Myrcene, (E)-ocimene, (Z)-ocimene
Monocyclic monoterpenes	p-Cymene, α -fenchene, limonene, β -phellandrene, α -terpinene, γ -terpinene, terpinolene
Bicyclic monoterpenes	Camphene, δ 3-carene, α -pinene, β -pinene, sabinene, α -thujene
Tricyclic monoterpenes	Tricyclene
Acyclic sesquiterpenes	α -Farnesene, (E,E)- α -farnesene, (E)- β -farnesene
Monocyclic sesquiterpenes	α -Bisabolene, β -bisabolene, curcumene, β -elemene, α -humulene, α -zingiberene
Bicyclic sesquiterpenes	α -Cadinene, γ -cadinene, δ -cadinene, β -caryophyllene, β -selinene, valencene
Tricyclic sesquiterpenes	Aromadendrene, β -bourbonene, α -cedrene, β -cedrene, α -gurjunene, β -gurjunene, α -patchoulene, β -patchoulene, α -santalene, viridiflorene
Acyclic monoterpene alcohols	Citronellol, geraniol, lavandulol, linalool, nerol
Acyclic monoterpene esters	Citronellyl acetate, geranyl acetate, linalyl acetate, neryl acetate, terpinyl acetate
Acyclic monoterpene aldehydes	Citronellal, geranial, neral
Monocyclic monoterpene alcohols	(Z)-Carveol, menthol, pulegol, terpineol
Monocyclic monoterpene phenols	Carvacrol, eugenol, thymol
Monocyclic monoterpene ketones	Carvone, menthone, piperitone, pulegone
Bicyclic monoterpene alcohols	Borneol, myrtenol, pinocarveol, verbenol (cis - and trans-)
Bicyclic monoterpene aldehydes	Myrtenal
Bicyclic terpene ketones	Camphor (α -camphor, <i>d</i> -camphor, <i>d</i> '-camphor), fenchone
Monocyclic sesquiterpene alcohols	α -Bisabolol, β -bisabolol, γ -bisabolol, elemol, lanceol
Bicyclic sesquiterpene alcohols	α -Cadinol, δ -cadinol, τ -cadinol, chrysanthemol, α -eudesmol, β -eudesmol, γ -eudesmol, 10- <i>epi</i> - γ -eudesmol, α -muurolol, τ -muurolol
Bicyclic sesquiterpene aldehydes	Isovalencenal, zizanal
Bicyclic sesquiterpene ketones	(E,E)-Germacrone, khushimone, nootkatone, valeranone, α -vetivone, β -vetivone
Tricyclic sesquiterpene alcohols	Patchoulol, α -santalol, β -santalol, viridiflorol
Aromatic alcohols	Benzyl alcohol, cinnamyl alcohol, 2-phenethyl alcohol
Aromatic esters	(Z)-Methylcinnamate, methyl salicylate
Aromatic aldehydes	Benzaldehyde, cinnamic aldehyde ((E)-, (Z)-), cuminaldehyde, vanillin
Phenolic ethers	(E)-Anethole, (Z)-anethole, methyl chavicol (estragole), safrole
Oxides	Bisabolol oxide A, bisabolol oxide B, 1,8-cineole (eucalyptol), linalool oxide (cis-, trans-, furanoid, pyranoid), menthofuran
Acids	Geranic acid, isovaleric acid, zizanoic (khusenic) acid

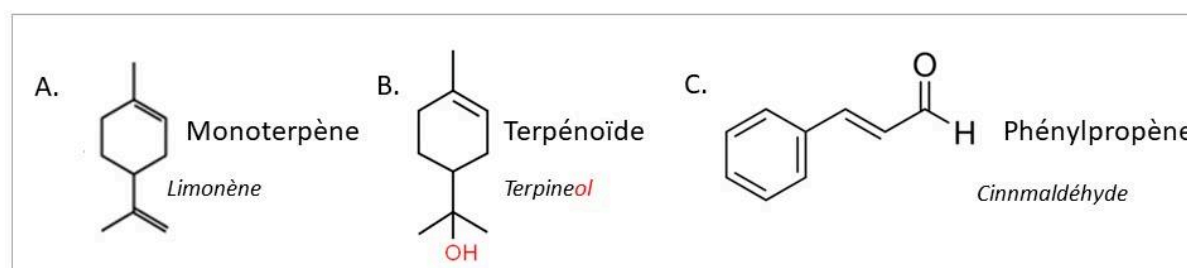


Figure 10 : Structure chimique des trois familles de composés dérivés du phénol extraits d'huiles essentielles. (A) Monoterpènes : le limonène (le plus simple des monoterpènes), (B) Terpénoïdes : le terpinéol (monoterpène porteur d'un groupement alcool), (C) Phénylpropènes : le cinnamaldéhyde.

2.4.2 Mode d'action

L'activité des HEs dépend à la fois du caractère lipophile de leur squelette hydrocarboné et du caractère hydrophile de leurs groupements fonctionnels. Les composés phénoliques, comme le thymol, le carvacrol et l'eugénol sont, du fait du caractère acide de leur substituant hydroxyle, les plus actifs (**Figure 11**).

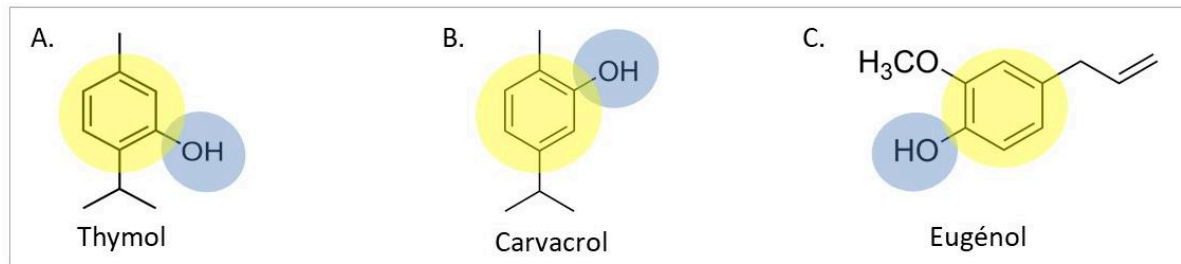


Figure 11 : Structure chimique de quelques molécules bactéricides extraites d'huiles essentielles : (A) thymol, (B) carvacrol, (C) eugénol. Sont indiqués en jaune les groupements phényles et en bleu les substituants hydroxyles.

Ainsi, il n'est pas étonnant de constater que les HEs riches en phénol comme celles du thym, de l'origan ou du clou de girofle, montrent les plus fortes activités antibactériennes (Inouye *et al.*, 2001). Contrairement aux antibiotiques, les HEs n'ont pas une cible cellulaire spécifique. Elles génèrent un stress global qui se manifeste à différents niveaux simultanément. C'est probablement la raison pour laquelle il est difficile de sélectionner des mutants résistants aux HEs, alors que l'opération est plus aisée avec les antibiotiques. Une étude protéomique par MALDI-TOF-MS effectuée sur la bactérie *E. coli* lors d'un traitement par des molécules reconnues pour leur activité bactéricide (cinnamaldéhyde, citral, géraniol, carvacrol, eugénol, carvone, citronellol, carvomethenol, guaiacol et thymol) a révélé la surproduction (1) des protéines de réponse au stress oxydant, (2) de *heat shock* et *cold shock* protéines, et (3) des protéines de stress membranaire (Božik *et al.*, 2018). L'analyse différentielle de bactéries exposées à ces HEs et à un antibiotique (tétracycline) a mis en évidence la surproduction spécifique de 94 protéines (impliquées dans la formation du biofilm, la résistance aux antibiotiques et la fonction ribosomale) montrant ainsi que les fonctions cellulaires activées par les HEs sont différentes de celles activées par les antibiotiques.

2.4.2.1 Perturbations membranaires

C'est surtout la partie hydrophobe des molécules extraites d'HEs qui est responsable de la perturbation membranaire. En effet, noyaux aromatiques phényles et phénols permettent à ces composés de s'insérer entre les lipides des membranes et d'augmenter leur perméabilité (Bajpai *et al.*, 2013). Ces perturbations finissent par provoquer la fuite de composants cytoplasmiques, la dissipation de la force proton-motrice, ainsi qu'une coagulation cytoplasmique (Gustafson *et al.*, 1998, Chouhan *et al.*, 2017). Par conséquent, en raison de l'absence d'une membrane externe protectrice, il n'est pas surprenant de constater que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles aux HEs que les Gram négatives (Liang *et al.*, 2019). Par exemple, la CMI de l'HE de *Cinnamon zeylannicum* est de 0,5 mg/mL chez *Staphylococcus aureus* alors qu'elle atteint 8 mg/mL chez *Acinetobacter baumannii*. De même pour l'HE de

Pimenta dioica, avec respectivement une CMI de 1 et 8 mg/mL pour ces deux mêmes espèces (Chouhan *et al.*, 2017). Parmi les nombreuses protéines membranaires, l'ATPase responsable de la production d'ATP et de la régulation du pH intracellulaire semble être une cible de l'eugénol, du carvacrol et du cinnamaldéhyde chez *E. coli* et *Listeria monocytogenes* (Sikkema *et al.*, 1995).

2.4.2.2 Cibles intracellulaires

Les cibles intracellulaires potentielles des HEs sont bien moins décrites dans la littérature, l'activité de ces mélanges étant principalement allouée à leur action sur les membranes. Néanmoins, on sait que certains composés peuvent avoir une activité intracellulaire tels que ceux porteurs d'un groupement aldéhyde, comme le cinnamaldéhyde. Les aldéhydes sont des composés électrophiles en raison de la différence d'électro-négativité entre les atomes d'oxygène et de carbone. En conséquence, ils peuvent réagir avec les molécules nucléophiles, en captant leurs atomes d'hydrogène. Leur interaction avec les fonctions amines des protéines ou encore avec l'ADN provoque d'importantes perturbations sur le métabolisme intracellulaire (Robert *et al.*, 1954, Voulgaridou *et al.*, 2011). Ainsi, le cinnamaldéhyde inhibe la division de *Bacillus cereus* en séquestrant la protéine FtsZ, normalement impliquée dans la division cellulaire. Le domaine de liaison du cinnamaldéhyde réside du côté C-terminal de la protéine, au niveau de la boucle T7 (Domadia *et al.*, 2007). Ces interactions conduisent également à une coagulation du cytosol (Gustafson *et al.*, 1998, Ultee *et al.*, 2000, 2002).

D'une manière plus générale, il a été montré chez *Salmonella enterica* que des concentrations sub-inhibitrices de thymol (0,01%) provoquent diverses modifications intracellulaires telles qu'un déficit dans les protéines H-NS (*Histone-like Nucleoid-Structuring proteins* qui interviennent dans la structuration du nucléoïde et le contrôle de l'expression génique), les protéines ribosomales 50S L7/L12 (Baucheron *et al.*, 2005) et la thiorédoxine-1 (impliquée dans l'équilibre du potentiel redox). A l'inverse, l'exposition au thymol entraîne la surproduction de GroEl et DnaK, deux protéines chaperonnes essentielles dans la réponse aux chocs thermiques (Di Pasqua *et al.*, 2007).

Chez *E. coli*, l'activité de la protéine YidC, importante dans la translocation des protéines à travers la membrane plasmique, semble être altérée par des molécules comme l'eugénol et le carvacrol (Laan *et al.*, 2003). La voie glycolytique est également modifiée, conduisant à une accumulation de glucose intracellulaire (Cox *et al.*, 1998) et à une diminution de quasiment tous les acides organiques intermédiaires du cycle de Krebs tels que le succinate, suggérant un switch de la respiration vers la fermentation (Picone *et al.*, 2013). De plus, l'exposition au cinnamaldéhyde provoque une augmentation de nombreux métabolites (indoles, alcanes, alcools, acides, esters, diméthylsulfoxyde, etc ...), signature d'un stress important (Hossain *et al.*, 2013).

On rapporte également un effet inhibiteur sur les voies de signalisation du *quorum sensing* (QS). L'effet anti-biofilm serait lié à cette inhibition. Ainsi, 60 μ M de cinnamaldéhyde permet de réduire de 55% la luminescence chez une souche de *Vibrio harveyi* rapportrice de l'activité du QS (Niu *et al.*, 2006).

2.4.3 Utilisation des HEs dans les infections

L'activité des HEs sur les bactéries pathogènes a été largement étudiée. Des revues résument les connaissances sur le sujet (Swamy *et al.*, 2016). Dans le **Tableau 4**, sont indiquées les CMI des HEs les plus actives vis-à-vis de *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*, trois pathogènes opportunistes majeurs de l'Homme.

Tableau 4 : Activité des principaux extraits d'HEs bactéricides.

Huile essentielle (principal composé)	Espèces bactériennes	CMIs	Références
Arbre à thé (terpinène-4-ol)	<i>S. aureus</i>	116 µg/mL	(Carson <i>et al.</i> , 2006)
	<i>E. coli</i>	186 µg/mL	(Carson <i>et al.</i> , 2006)
	<i>P. aeruginosa</i>	744 µg/mL	(Carson <i>et al.</i> , 2006)
Cannelle (cinnamaldéhyde)	<i>S. aureus</i>	250 µg/mL	(Ferro <i>et al.</i> , 2016)
	<i>E. coli</i>	256 µg/mL	(Božik <i>et al.</i> , 2018)
	<i>P. aeruginosa</i>	310 µg/mL	(Mousavi <i>et al.</i> , 2016)
Cajoute (1,8-cinéol)	<i>S. aureus</i>	250-400 µg/mL	(Şimşek <i>et al.</i> , 2017)
	<i>E. coli</i>	125-200 µg/mL	(Şimşek <i>et al.</i> , 2017)
	<i>P. aeruginosa</i>	200-400 µg/mL	(Şimşek <i>et al.</i> , 2017)
Clou de girofle (eugénol)	<i>S. aureus</i>	256 µg/mL	(Qiu <i>et al.</i> , 2010)
	<i>E. coli</i>	512 µg/mL	(Božik <i>et al.</i> , 2018)
	<i>P. aeruginosa</i>	256 µg/mL	(Lou <i>et al.</i> , 2019)
Eucalyptus (1,8-cinéol)	<i>S. aureus</i>	250-400 µg/mL	(Şimşek <i>et al.</i> , 2017)
	<i>E. coli</i>	125-200 µg/mL	(Şimşek <i>et al.</i> , 2017)
	<i>P. aeruginosa</i>	200-400 µg/mL	(Şimşek <i>et al.</i> , 2017)
Lavande (linalol, acétate de linalyl)	<i>S. aureus</i>	150 µg/mL	(El-Baky <i>et al.</i> , 2016)
	<i>E. coli</i>	75 µg/mL	(El-Baky <i>et al.</i> , 2016)
	<i>P. aeruginosa</i>	75 µg/mL	(El-Baky <i>et al.</i> , 2016)
Menthe (menthol)	<i>S. aureus</i>	> 600 µg/mL	(Singh <i>et al.</i> , 2015)
	<i>E. coli</i>	> 600 µg/mL	(Singh <i>et al.</i> , 2015)
	<i>P. aeruginosa</i>	445 µg/mL	(Singh <i>et al.</i> , 2015)
Sauge (acétate de linalyl)	<i>S. aureus</i>	1250 µg/mL	(Trombetta <i>et al.</i> , 2005)
	<i>E. coli</i>	5000 µg/mL	(Trombetta <i>et al.</i> , 2005)
	<i>P. aeruginosa</i>	Non renseigné	
Thym (thymol)	<i>S. aureus</i>	256 µg/mL	(Zhou <i>et al.</i> , 2019)
	<i>E. coli</i>	1024 µg/mL	(Božik <i>et al.</i> , 2018)
	<i>P. aeruginosa</i>	512 µg/mL	(Walsh <i>et al.</i> , 2019)
Origan (carvacrol)	<i>S. aureus</i>	375 µg/mL	(Walsh <i>et al.</i> , 2019)
	<i>E. coli</i>	256 µg/mL	(Božik <i>et al.</i> , 2018)
	<i>P. aeruginosa</i>	512 µg/mL	(Walsh <i>et al.</i> , 2019)

2.4.4 Action combinée des HEs avec les antibiotiques

Comme annoncé dans l'introduction, la recherche de nouvelles solutions thérapeutiques anti-infectieuses ne cherche pas à faire l'impasse sur les antibiotiques, mais envisage des traitements d'appoint. C'est dans cet esprit que de nombreuses combinaisons antibiotique/huile essentielle ont été testées *in vitro* sur différentes espèces bactériennes à Gram positif et à Gram négatif (**Tableau 5**). Même s'il apparaît que dans la majorité des cas, les effets reportés sont synergiques, il faut tout de même noter que dans près d'un tiers des études, sont mentionnés des effets antagonistes dont la cause est inconnue.

Tableau 5 : Vue d'ensemble des effets antagonistes ou synergiques entre différentes HEs et antibiotiques sur différentes espèces bactériennes (S= Synergie ; A= Antagonisme)

Plantes orginaires	Antibiotiques	Souches	Effets	Sources
<i>Cinnamomum burmanni</i>	GMN	<i>S. epidermidis</i>	S	(Nuryastuti <i>et al.</i> , 2009)
<i>Chrysentemum coronarium</i>	TIC	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. enteriditis</i>	S	(Moussaoui <i>et al.</i> , 2016)
	IMP	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. putida</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. enteriditis</i>	S	
	TOB	<i>E. coli</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. putida</i>	S	
	GMN	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. aerogenes</i>	S	
	TIC	<i>P. putida</i> , <i>P. aeruginosa</i>	A	
	IMP	<i>E. coli</i> , <i>E. aerogenes</i>	A	
	TOB	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. enteriditis</i>	A	
	GMN	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. enteriditis</i>	A	
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	AMK, GMN	<i>A. baumannii</i>	S	(Guerra <i>et al.</i> , 2012)
	COL	<i>P. aeruginosa</i>	S	(Topa <i>et al.</i> , 2020)
<i>Citrus limon</i>	AMK, GMN	<i>A. baumannii</i>	S	(Guerra <i>et al.</i> , 2012)
<i>Coriandrum sativum</i>	CHL, CIP, GMN, TET	<i>A. baumannii</i>	S	(Duarte <i>et al.</i> , 2012)
<i>Cymbopogon citratus</i>	KMN, STP	<i>S. typhimurium</i>	S	(Shin 2006)
	AMK, CTX	<i>A. baumanii</i>	S	(Selvaraj <i>et al.</i> , 2020)
	CIP, GMN	<i>A. baumanii</i>	A	
<i>Dalea versicolor</i>	BER, ERY, TET	<i>S. aureus</i>	S	(Belofsky <i>et al.</i> , 2004)
<i>Helichrysum italicum</i>	CHL	<i>A. baumannii</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i>	S	(Lorenzi <i>et al.</i> , 2009)
<i>Lippia sidoides</i>	AMK, GMN	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	S	(Veras <i>et al.</i> , 2012)
<i>Meluca alternifolia</i>	CIP	<i>S. aureus</i> , <i>K. pneumoniae</i>	A	(van Vuuren <i>et al.</i> , 2009)
	GMN	<i>A. baumannii</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Y. enterocolitica</i>	S	(LaPlante 2007, Rosato <i>et al.</i> , 2010)
	TOB	<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	S	(D'Arrigo <i>et al.</i> , 2010)
<i>Mentha piperita</i>	Oxy-TET	<i>E. coli</i>	S	(Schelz <i>et al.</i> , 2006)
	NEO	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i>	S	(van Vuuren <i>et al.</i> , 2009)
<i>Origanum vulgare</i>	DOX, FLO, SAR, MAQ, LEVX	<i>E. coli</i>	S	(Si <i>et al.</i> , 2008)
	GMN	<i>A. baumannii</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Y. enterocolitica</i>	S	(Rosato <i>et al.</i> , 2010)
<i>Pelargonium graveolens</i>	CIP	<i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. aureus</i>	S	(Rosato <i>et al.</i> , 2007)

	NOR	<i>S. aureus, E. coli, B. cereus et B. subtilis</i>	S	(Rosato <i>et al.</i> , 2007)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	CIP	<i>S. aureus, K. pneumoniae</i>	S	(de Rapper <i>et al.</i> , 2016)
<i>Syzygium aromaticum</i>	AMP, GMN	<i>S. mutans, S. sanguinis, S. sobrinus, S. rattle, S. criceti, S. anginosus, S. gordonii, A. actinomycetemcomitans, F. nucleatum, P. intermedia, P. gingivalis</i>	S	(Moon <i>et al.</i> , 2011)
<i>Thymus broussonetii</i>	CIP	<i>V. cholerae, E. coli</i>	S	(Fadli <i>et al.</i> , 2012)
<i>Thymus magnus</i>	CFM	<i>P. aeruginosa, B. cereus, S. aureus, E. coli, Salmonella, B. subtilis</i>	S	(Fadli <i>et al.</i> , 2012)
<i>Thymus willdenowii</i>	TIC	<i>E. coli, E. aerogenes, P. putida, P. aeruginosa</i>	S	(Moussaoui <i>et al.</i> , 2016)
	IMP	<i>E. coli, P. putida, P. aeruginosa, S. enteriditis</i>	S	
	TOB	<i>K. pneumoniae, E. aerogenes, P. putida, S. enteriditis</i>	S	
	GMN	<i>P. putida, S. enteriditis</i>	S	
	TIC	<i>K. pneumoniae, S. enteriditis</i>	A	
	IMP	<i>K. pneumoniae, E. aerogenes, P. mirabilis</i>	A	
	TOB	<i>E. coli, S. aureus, P. aeruginosa</i>	A	
	GMN	<i>E. coli, K. pneumoniae, E. aerogenes, S. aureus, P. mirabilis, P. aeruginosa</i>	A	
<i>Zataria multiflora</i>	VAN	SAMR et SAMS	S	(Mahboubi <i>et al.</i> , 2010)

AMK amikacine, AMP ampicilline, BER berbérine, CFM céfixime, CHL chloramphénicol, CIP ciprofloxacine, COL colistine, CTX céfotaxime, DOX doxycycline, ERY érythromycine, FLO florfénicol, GMN gentamicine, IMP imipénème, KMN kanamycine, LEVX lévofloxacine, MAQ maquinox, NEO néomycine, NOR norfloxacine, Oxy-TET oxytétracycline, TET tétracycline, SAR sarafloxacine, TIC ticacilline, VA vancomycine.

SAMR, SAMS : *Staphylococcus aureus* méthicilline-résistant, -sensible.

2.4.5 Mécanismes de défense bactérienne contre les HEs

Les composés volatils produits par les plantes leur ont permis, au cours de l'évolution, d'assurer des fonctions très différentes telles que l'attraction de pollinisateurs (Butnariu *et al.*, 2018), la protection contre les ultra-violets comme par exemple avec l'huile essentielle de *Commiphora myrrha* (Auffray 2007), ou la défense vis-à-vis de micro-organismes phytopathogènes. Il n'est donc pas surprenant qu'au cours de l'évolution, les micro-organismes se soient eux aussi adaptés à ces composés pour y faire face, avec la mise en place de différents mécanismes de résistance (co-évolution).

En premier lieu, la membrane externe des bactéries à Gram négatif constitue une véritable barrière semi-perméable qui freine l'entrée des HEs dans la cellule. Toutefois, en ciblant la membrane externe, certaines HEs perturbent les enzymes impliquées dans la synthèse des acides gras entraînant un déséquilibre dans le ratio acides gras saturés/insaturés, provoquant une diminution de la fluidité membranaire. C'est ce que l'on observe avec le cinnamaldéhyde qui, utilisé à une concentration située entre le 8^{ème} et le 3/8^{ème} de la CMI (déterminée à 310 µg/mL) provoque une baisse du nombre des acides gras insaturés de 40% à 20%, et l'augmentation des acides gras saturés de 50% à 67% chez *E. coli*. Les auteurs de l'étude suggèrent que la rigidification membranaire permet à la bactérie de réduire les effets du cinnamaldéhyde (CNA) en limitant sa pénétration (He *et al.*, 2018).

Globalement, la réponse des bactéries aux HEs diffère de celle aux antibiotiques. Chez *E. coli*, l'analyse de la réponse au stress électrophile provoqué par du cinnamaldéhyde, de l'eugénol ou du carvacrol, montre la production de protéines impliquées dans la protection de l'ADN (par exemple la protéine de liaison à l'ADN HU- α), mais aussi de protéines de protection de la membrane (comme la lipoprotéine RzoR, également mobilisée lors de perturbations membranaires d'origine phagique) (Božik *et al.*, 2018). D'autres protéines (YthA et Yoaj) sont également produites telles que celles impliquées dans la réponse aux variations de température, au stress de l'enveloppe, au stress oxydant, au stress acide et à celui provoqué par le soufre.

En fait, la réponse des bactéries à l'action des HEs comprend deux phases. Une première étape transitoire et adaptative permet à la bactérie de tolérer le produit si le stress est modéré et ponctuel, notamment plus si les composés contenus dans ces HEs sont rapidement dégradés par les bactéries. Puis, si le stress est plus long et intense (car pas ou peu de dégradation), les bactéries mettent en place une réponse plus durable *via* des mutations. Nous verrons que cette deuxième phase intervient plus tardivement que lors d'une exposition aux antibiotiques.

2.4.6 Adaptation transitoire : l'efflux actif

En 2007, on constate que l'ajout d'un agent découplant comme le CCCP (carbonyl cyanide *m*-chloro-phényl hydrazone) sensibilise les cultures de *P. aeruginosa* au carvacrol, eugénol, citral, géraniol et terpinéol, suggérant que la tolérance à ces composés est médiée par un système d'efflux actif (Cox *et al.*, 2007). Dans le même temps, les acides phénoliques (dont l'acide cinnamique dérivé du cinnamaldéhyde) sont reconnus comme des inducteurs des systèmes AcrAB-TolC et EmrAB chez *Erwinia chrysanthemi* (Ravirala *et al.*, 2007). Par ailleurs il a été

montré que le thymol, un monoterpène phénolique, induit la surproduction de la protéine de membrane externe TolC chez *Salmonella enterica* (Baucheron *et al.*, 2005). Suite à ces travaux, le lien entre la tolérance aux composés d'HEs et la surproduction des pompes d'efflux a pu être confirmé, en particulier pour MexAB-OprM chez *P. aeruginosa* et son homologue AcrAB-TolC chez *E. coli*. Ainsi, les mutants ayant une pompe MexAB-OprM inactive sont plus sensibles aux monoterpènes naturels tels que le terpinèn-4-ol, le 1,8-cinéole et l' α -terpinéol, contenus dans l'HE de l'arbre à thé (Papadopoulos *et al.*, 2008). De plus, des résultats indiquent que les terpènes, les alcaloïdes, et les molécules phénoliques naturelles sont des substrats de MexAB-OprM et AcrAB-TolC car l'utilisation d'un inhibiteur d'efflux (PA β N) rend *P. aeruginosa* et *E. coli* plus sensibles à ces composés (Kuetze *et al.*, 2011). Ces mécanismes de protection sont inductibles et sont surproduits dans les minutes qui suivent l'exposition. Par exemple, l'HE du thym du Maroc active la synthèse de AcrAB-TolC chez *E. coli* (Fadli *et al.*, 2014). Enfin, très récemment, des travaux ont montré que la surproduction de MexAB-OprM permettait de protéger *P. aeruginosa* de l'action toxique du carvacrol (Pesingi *et al.*, 2019).

L'un des modes d'action des HEs étant d'entraîner des perturbations membranaires (Chouhan *et al.*, 2017), il est légitime de se poser la question du rôle protecteur potentiel de MexCD-OprJ, une pompe qui répond au stress membranaire (Fraud *et al.*, 2008). Toutefois, avant ce travail, aucune étude n'avait montré l'induction de cette pompe.

Enfin, les HEs contenant pour la plupart des molécules électrophiles, des travaux menés au laboratoire ont montré que la pompe MexEF-OprN était régulée à la hausse de manière transitoire lors d'un stress électrophile. Le cinnamaldéhyde, composé électrophile extrait de l'HE de cannelle, active transitoirement MexEF-OprN par une voie impliquant les activateurs transcriptionnels CmrA et MexT (Juarez *et al.*, 2017).

L'ensemble de ces points montre l'importance de l'efflux dans la réponse aux stress provoqués par les HEs.

2.4.7 Résistance aux HEs et mutations

Une autre façon pour la bactérie de s'assurer une meilleure résistance aux HEs passe par la sélection de mutants dans les gènes cibles. Il est important de préciser que les rares publications disponibles s'accordent à dire que les HEs ou leurs composés n'ont pas de pouvoir mutagène avéré. C'est le cas du thymol et du carvacrol dont les propriétés mutagènes potentielles ont été étudiées chez la drosophile par *Somatic Mutation and Recombination Test* (SMART) (Mezzoug *et al.*, 2007). Dans une autre étude, il est apparu que le cinnamaldéhyde, le citral et le thymol n'induisaient pas l'expression des gènes de réparation de l'ADN tel que *recA* chez des souches de *E. coli* portant l'opéron rapporteur *lux* cloné en aval du promoteur de *recA*. Ces données tendent à montrer que ces composés n'altèrent pas suffisamment l'ADN pour déclencher un mécanisme de réparation du génome (Chan *et al.*, 2013).

De façon artificielle, des mutants de *E. coli* résistants au thymol ont été obtenus par insertion aléatoire de transposons. Divers gènes ont pu être identifiés tels que (1) *lon*, impliqué dans la dégradation des protéines anormalement repliées, (2) *menA*, un gène de la synthèse de la

ménaquinone, (3) *cadB*, qui code une pompe exportant la cadavérine et la lysine, (4) *yagG*, dont le rôle est inconnu et (5) la région intergénique *yiiE-yiiF* (Shapira *et al.*, 2007). Toutefois, la contribution de chacun de ces gènes au phénotype des mutants reste à vérifier.

Plusieurs tentatives infructueuses ont été réalisées pour obtenir des mutants de *S. aureus* (Ferro *et al.*, 2016) ou de *P. aeruginosa* (Topa *et al.*, 2020) résistants au cinnamaldéhyde. Même après 20 passages, l'exposition de *S. aureus* à du carvacrol utilisé à une concentration équivalente à 2/3 de la MIC n'a pas permis de sélectionner des mutants résistants (Lu *et al.*, 2018). Dans la littérature, seule une étude récente rapporte l'émergence de mutants de *S. aureus* résistants au citral, au limonène ou au carvacrol (Berdejo *et al.*, 2019) en utilisant une concentration équivalente à 1/2 CMI. Néanmoins, la fréquence d'apparition des mutants reste 3 fois inférieure à celle du contrôle positif (la norfloxacin) et les niveaux de résistance sont entre 1,5 et 2 fois supérieurs à ceux de la souche parentale. Ont été détectées les mutations suivantes : (1) une délétion d'une grande région de 65 gènes codant des régulateurs transcriptionnels et des enzymes métaboliques chez un mutant résistant au carvacrol, (2) une substitution (N₁₈₈K) dans le gène *aroC*, codant une chorismate synthase chez un mutant résistant au citral, et (3) une mutation (A₈₆₂V) dans le gène *rpoB* codant la sous-unité β de l'ARN polymérase chez un mutant résistant au limonène (Berdejo *et al.*, 2019).

Dans ce travail, l'impact des extraits de plantes sur le potentiel adaptatif et mutagène de *P. aeruginosa* sera étudié à travers deux composés purifiés extraits d'HEs, le cinnamaldéhyde et le citral. Ces deux composés ont été choisis en raison de leur caractère commun électrophile (dû à un aldéhyde), mais aussi parce qu'ils diffèrent par la présence ou l'absence d'un noyau aromatique (**Figure 12 ; Figure 15**).

2.5 Le cinnamaldéhyde

2.5.1 Chimie

Le cinnamaldéhyde (CNA) est un composé organique de formule brute C₉H₈O appartenant à la famille des phénylpropanoïdes. Composant majoritaire de l'HE de cannelle, il lui donne son odeur et son goût (Li, Kong, et Wu 2013). Il est principalement extrait de la cannelle de Ceylan (*Cinnamomum verum* ou *zeylanicum*) et de la cannelle de Chine (*C. cassia*), deux espèces de la famille des *Lauraceae*. On peut le trouver également chez d'autres plantes du genre *Cinnamomum*. La fonction aldéhyde du cinnamaldéhyde est le groupement le plus réactif : il peut être oxydé ou réduit, donnant respectivement l'acide cinnamique ou l'alcool cinnamique (**Figure 12**).

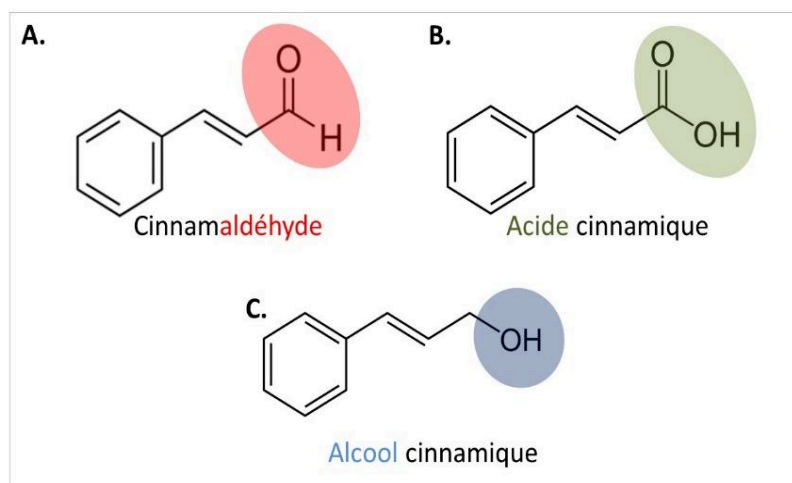


Figure 12 : Structure chimique du **(A)** Cinnamaldéhyde (en rouge la fonction aldéhyde), **(B)** Acide cinnamique (en vert, la fonction acide) et **(C)** Alcool cinnamique (en bleu la fonction alcool).

2.5.2 Spectre d'action

L'intérêt thérapeutique du CNA réside dans son action à large spectre, antibactérienne, antifongique et antivirale (Zaika 1988). L'activité antibactérienne du CNA a été explorée aussi bien chez des bactéries Gram positives telles que *S. aureus* et *E. faecalis* (CMI = 0,25 mg/mL) (Ferro *et al.*, 2016), que chez les bactéries Gram négatives, *A. baumannii* (CMI = 0,31 mg/mL) (Montagu *et al.*, 2016), *E. coli* (CMI = 0,31 mg/mL) (He *et al.*, 2018 ; Mousavi *et al.*, 2016) et *P. aeruginosa* (CMI = 0,6 -1,2 mg/mL) (Pereira *et al.*, 2019).

Les HEs étant très volatiles, leur activité peut être évaluée en phase gazeuse, sans avoir besoin d'être incorporées dans le milieu de culture dans lequel croissent les bactéries. L'activité du CNA a été évaluée dans ces conditions sur différentes souches de *Salmonella* sp. et sur la souche *E. coli* O157:H7 se développant sur des tomates. A une concentration de à 41,5 μL /litre d'air, le nombre de bactéries était divisé par deux au bout de 4 jours de traitement (Obaidat *et al.*, 2009). Sur *Pseudomonas syringae*, l'activité du produit était moindre avec une CMI en phase gazeuse estimée à 2500 ppm (équivalent à 2500 μL /litre d'air) (Song *et al.*, 2016).

Si le mode d'action du CNA commence à être connu, son devenir dans les cellules bactériennes l'est moins. En utilisant la souche *E. coli* O157:H7, il a été montré par HPLC qu'après 4 h d'exposition au CNA, le milieu de culture renferme de l'alcool cinnamique, une molécule moins toxique (Visvalingam *et al.*, 2013). Cette conversion est due à la surproduction de l'alcool déshydrogenase YqhD et de l'aldéhyde réductase DkgA, deux enzymes dont les gènes (*yqhD* et *dkgA*) sont positivement régulés par l'activateur transcriptionnel YqhC en présence de CNA (Turner *et al.*, 2011) (**Figure 13**). Chez la bactérie à Gram positif *Bacillus stearothermophilus*, la même conversion est réalisée là encore, grâce à une alcool déshydrogénase (Pennacchio *et al.*, 2013). A notre connaissance, aucune étude n'a été faite sur la métabolisation du CNA chez *P. aeruginosa* ni sur le devenir de l'alcool cinnamique dans les cellules bactériennes.

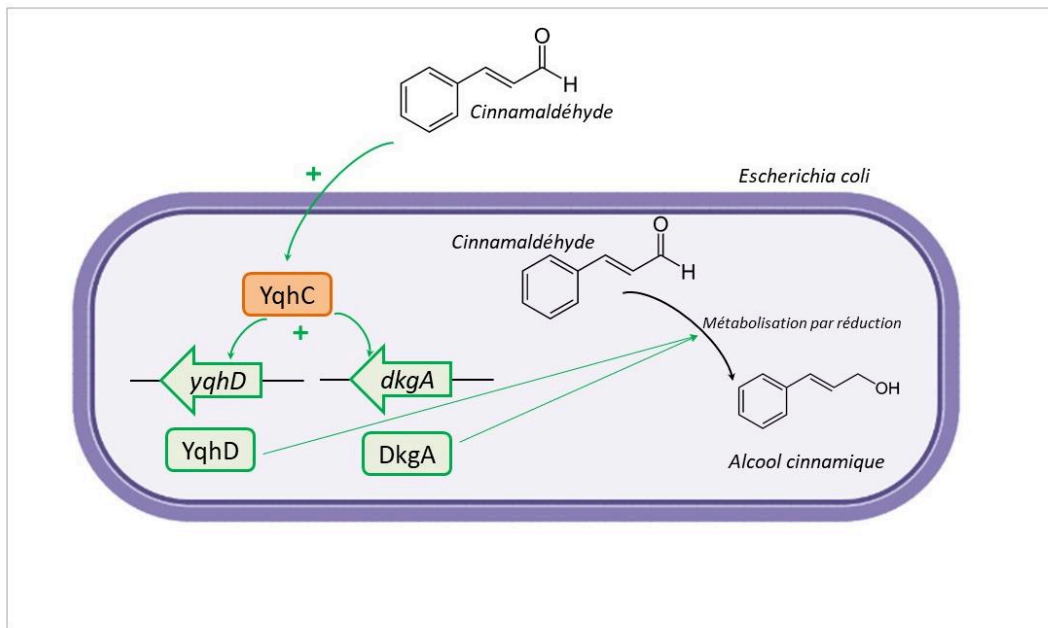


Figure 13 : Chez *E. coli* la présence de CNA (cinnamaldéhyde) induit l'activation des gènes *yqhD* et *dkgA* via *yqhC*. Les deux enzymes *YqhD* et *DkgA* (respectivement une alcool déshydrogénase et une aldéhyde réductase) réduisent le CNA en alcool cinnamique, moins toxique. Inspiré de (Visvalingam *et al.*, 2013).

2.5.3 Mode d'action

Malgré son utilisation très ancienne en médecine traditionnelle chinoise, le CNA possède un mode d'action encore mal compris. Contrairement aux antibiotiques, il n'agit pas sur des cibles cellulaires spécifiques, mais sa nature lipophile lui permet de traverser les membranes bactériennes et son groupement aldéhyde électrophile favorise les interactions avec les atomes nucléophiles de l'ADN et des protéines, perturbant ainsi de nombreuses fonctions physiologiques (Weibel *et al.*, 1989). A faible concentration, le CNA pourrait inhiber les enzymes impliquées dans la division cellulaire. A plus forte dose, il agit au niveau du périplasma en inhibant l'activité des ATPases transmembranaires (Hylgaard *et al.*, 2012), bien qu'il ne soit pas décrit comme un protonophore (Gill *et al.*, 2004). Enfin, à dose létale, son caractère hydrophobe lui permet de se solubiliser dans les membranes déclenchant ainsi un changement du profil lipidique des bicouches biologiques, avec une augmentation de la part des acides gras saturés qui rigidifie et déstructure les membranes (Di Pasqua *et al.*, 2007). Dans une autre étude, le CNA a été décrit comme capable de perméabiliser la membrane cytoplasmique et de dissiper le gradient de cations transmembranaires (K^+), conduisant à la mort cellulaire (Bouhdid *et al.*, 2010). Des observations en microscopie électronique à balayage réalisées sur *Bacillus cereus* montrent que le CNA empêche la formation complète des *septa* de division et entraîne une modification de la morphologie cellulaire, avec des bactéries qui apparaissent plus allongées que les cellules non traitées (Kwon *et al.*, 2003). Au final, par ses effets pléiotropiques, le CNA induit un stress important chez les bactéries sensibles (Figure 14).

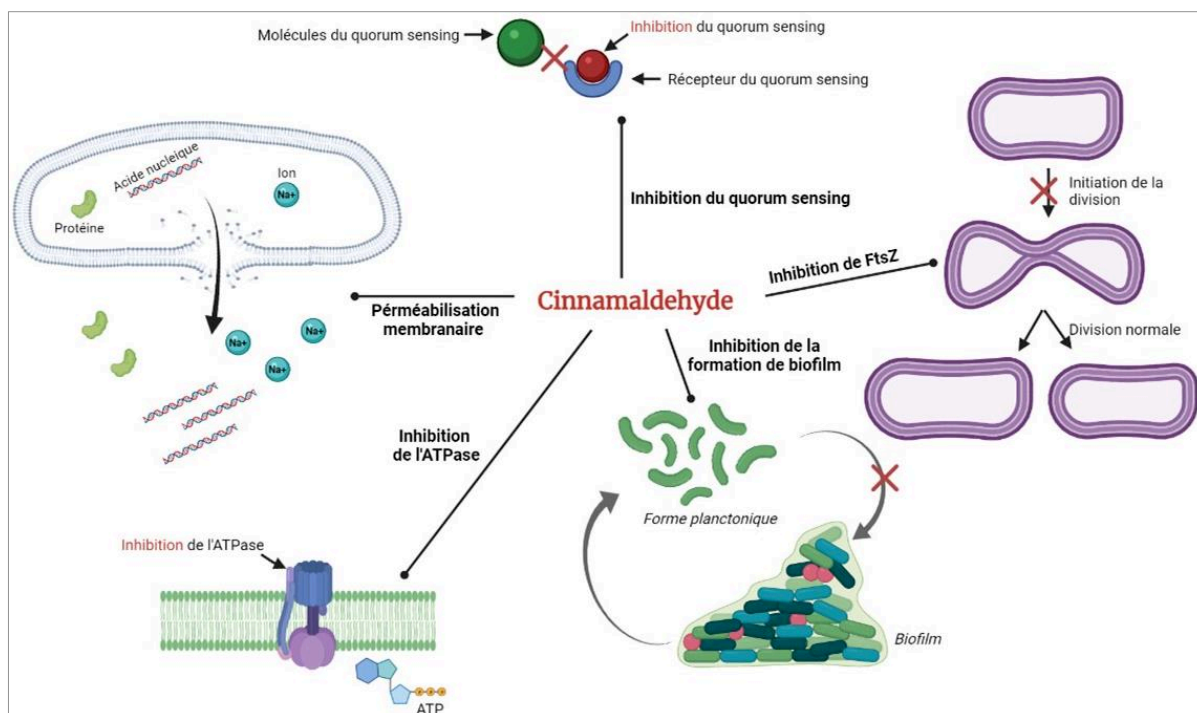


Figure 14 : Effets cellulaires du cinnamaldéhyde (CNA) chez les bactéries. Le CNA provoque la rigidification et la perméabilisation de la membrane, entraînant la fuite de composés intracellulaires ; en perturbant le gradient de protons, il altère le fonctionnement de l'ATPase membranaire. Il interagit également avec les molécules du quorum sensing, diminuant la formation de biofilm. Enfin l'inhibition de la protéine FtsZ empêche le déroulement normal de la division cellulaire. Image créée avec Biorender d'après (Doyle et al., 2019).

L'utilisation du CNA comme une alternative thérapeutique aux antibiotiques peut également s'avérer intéressante en raison des propriétés anti-virulence de cette molécule. En effet, chez *P. aeruginosa* la production des facteurs de virulence intervenant dans la colonisation et l'invasion des tissus de l'hôte est en partie régulée par les molécules du *quorum sensing* avec lesquelles le CNA interfère. En effet des concentrations sub-inhibitrices de CNA (5%, v/v), utilisées en association avec la DNase dont l'activité anti-biofilm est reconnue, diminuent d'environ 70% la production de biofilm, d'alginate et de l'enzyme staphylolytique LasA (Farisa Banu et al., 2017). En utilisant deux souches bioluminescentes de *Vibrio harveyi*, dont la transcription des gènes *lux* est induite par les molécules du *quorum sensing*, 3-oxo-C6-homosérine lactone (HSL) ou 3-hydroxy-C4-HSL, il apparaît que l'exposition à 200 $\mu\text{mol/L}$ de CNA réduit la bioluminescence de respectivement 70% et 55% après 80 min d'exposition (Niu et al., 2006). Toujours chez *Vibrio*, l'équipe de Brackman a exploré l'activité anti-virulence du CNA en caractérisant son effet sur le régulateur transcriptionnel LuxR (Brackman et al., 2008). Par retard sur gel, ils ont montré qu'à partir de 1900 $\mu\text{mol/L}$ de CNA, la protéine LuxR ne se fixe plus sur l'ADN, sans que les auteurs en expliquent la raison. En interférant avec LuxR, le CNA modifie les voies de signalisation du QS et inhibe certains mécanismes de virulence tels que la production de biofilm, celle de protéases et de pigments (Ren et al., 2004). Plus récemment, à l'aide d'une construction rapportrice codant la GFP, l'expression des gènes du QS *lasB*, *rhlA* et *pqsA* s'est avérée réduite de 70% en présence de CNA (400 $\mu\text{g/mL}$) chez *P. aeruginosa* (Topa et al., 2020).

En 2016, l'analyse du métabolome de *E. coli* cultivée en présence de CNA a donné une vue d'ensemble des effets de la molécule. Parmi les changements, ont été remarquées : la

modification du profil membranaire en protéines, une augmentation du nombre de peptides et d'acides aminés (probablement en raison de la dénaturation des protéines provoquée par le CNA), une diminution de l'activité du métabolisme énergétique et enfin, une diminution de l'expression des protéines du QS (Mousavi *et al.*, 2016).

A notre connaissance, même si le CNA fait partie des composés naturels les plus bactéricides, son mode d'action global sur la bactérie *P. aeruginosa* n'as pas été publié à ce jour.

2.5.4 Impact du CNA sur la résistance aux antibiotiques

Le CNA est une molécule bactéricide dont l'utilisation intéresse l'industrie agro-alimentaire pour éviter la contamination par des pathogènes. Utilisée à 0,3 % (soit 3 mg/mL), la molécule a montré *in vitro* une action bactéricide sur des souches de *S. enterica* sensibles ou résistantes aux antibiotiques. Sur des aliments (céleri, huîtres) inoculés avec les mêmes souches et placés à 4°C, le CNA utilisé à 1% (10 mg/mL) réduit la charge bactérienne de 2 à 5 Log (Ravishankar *et al.*, 2010).

En association avec des antibiotiques, le CNA a démontré une action synergique chez certaines bactéries. Par exemple, chez *Clostridium difficile*, à 20µg/ml, il réduit la CMI de la clindamycine 16 fois (de 4 µg/mL à 0,25 µg/mL) (Shahverdi *et al.*, 2007). Chez *A. baumannii*, une diminution de la résistance à sept β-lactamines a été obtenue en présence d'une concentration de CNA équivalente à celle de la CMI (environ 145 µg/mL). La mesure, par RT-qPCR, du niveau d'expression des gènes codant le système d'efflux AdeABC a montré que la sensibilisation observée était corrélée à une baisse de l'expression de ces gènes (Karumathil *et al.*, 2018). Chez *E. coli*, une étude a constaté une synergie entre le CNA et plusieurs antibiotiques (novobiocine, érythromycine avec des FICs ≤ 0,5), sans que les auteurs ne l'expliquent (Visvalingam *et al.*, 2017). Enfin, très récemment, il a été rapporté chez *P. aeruginosa* que le CNA utilisé à 3mM (équivalent 400 µg/mL), faisait chuter d'un facteur 4 la CMI de la colistine et d'un facteur 2 celle de la carbénicilline, de la tobramycine et de l'érythromycine (Topa *et al.*, 2020).

Avant cette étude, aucun travail n'avait rapporté d'antagonisme entre le CNA et les antibiotiques.

2.6 Le citral

2.6.1 Chimie

Le citral (ou lémonal) est une molécule de formule brute C₁₀H₁₆O. Elle existe sous la forme de deux stéréo-isomères : l'isomère *cis*-, le néral ou citral A, et l'isomère *trans*-, le géranial ou citral B (**Figure 15**). Le citral est l'un des composants majeurs de l'HE de citronnelle (*Cymbopogon citratus*), appelée également verveine des Indes ou *lemongrass*. On le trouve plus généralement chez les espèces du genre *Cymbopogon* mais également dans les HEs d'orange et de citron.

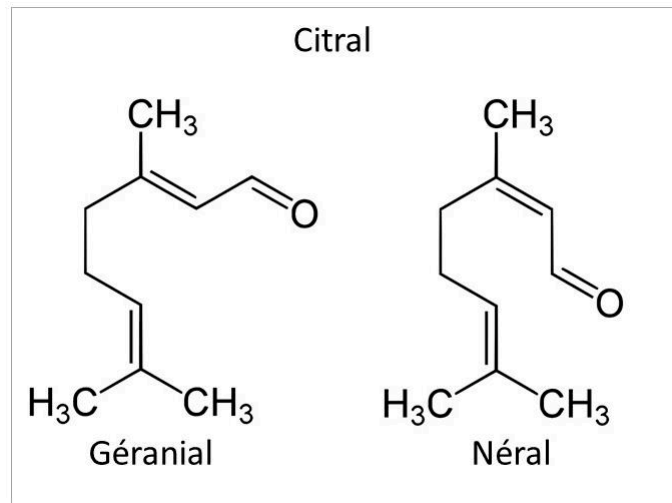


Figure 15 : Structure chimique du citral sous ses deux formes isomériques : le géraniol (trans-citral ou citral A) et le néral (cis-citral ou citral B).

2.6.2 Spectre d'action

De façon générale, le citral présente une activité toxique à l'encontre des bactéries Gram positives telles que *S. aureus* et *B. cereus* (CMI = 500 µg/mL) et de façon plus faible chez les bactéries Gram négatives (CMI = 1000 µg/mL chez *E. coli*) (Mokarizadeh *et al.*, 2017). Comparé au CNA, le citral est également un aldéhyde, mais l'absence de noyau aromatique nous a permis d'évaluer l'impact de cette structure sur la réponse bactérienne.

Des essais comparatifs portant sur des HEs contenant une forte concentration de citral (citron, orange ou bergamote) ont conclu que l'huile est toujours plus efficace que la forme gazeuse avec des CMI de 0,3% (vol/vol) pour *L. monocytogenes* et 0,6% pour *B. cereus* et *S. aureus*. Dans cette étude, la CMI n'a pas pu être déterminée pour les bactéries à Gram négatif testées (*C. jejuni*, *E. coli* O:157) en raison de leur plus grande résistance et des limites de solubilité de ces HEs (Fisher *et al.*, 2006).

Vis-à-vis des *Pseudomonas*, les études publiées indiquent que le citral est sans effet (Pereira *et al.*, 2019) probablement car ces bactéries environnementales sont capables de le dégrader ainsi que des molécules proches (géraniol, citronellol...) pour les utiliser comme sources de carbone et d'énergie. Cela a été confirmé en particulier chez *P. mendocina* (Tozoni *et al.*, 2010) et *P. aeruginosa* (Hocquet *et al.*, 2016). D'ailleurs, l'existence d'une espèce s'appelant *Pseudomonas citronellolis* rappelle les propriétés cataboliques de ce genre bactérien. D'après les voies de dégradation du géraniol décrites dans la base *KEGG PATHWAY*, les gènes de l'opéron *geo* (*geoA*, *geoB* et *geoC*) seraient les premiers intervenant dans le catabolisme du citral. Toutefois, cet opéron identifié chez *Castellaniella defragans* n'a pas d'homologue chez *P. aeruginosa*, à l'exception de *PA3629*, qui montre 46% d'homologie avec la séquence nucléotidique de *geoA* (*The Pseudomonas Genome database*, *Pseudomonas.com*). En revanche, les opérons *atuABCDEFGH* et *liuABCDE* qui codent des enzymes plus tardives de l'utilisation du citral, sont présents chez *P. aeruginosa* (**Figure 16**). De façon intéressante, l'opéron *liuABCDE* se situe entre l'opéron d'efflux *mexXY* et le gène *hmgA* codant l'homogentisate-1,2-dioxygénase. Or, certaines souches cliniques de *P. aeruginosa* affichent de larges délétions chromosomiques dans cette région, se traduisant par la production de pyomélanine ($\Delta hmgR$), une hypersensibilité aux aminosides ($\Delta mexXY$) et une incapacité à utiliser le géraniol comme source de carbone ($\Delta liuABCDE$) (Hocquet *et al.*, 2016).

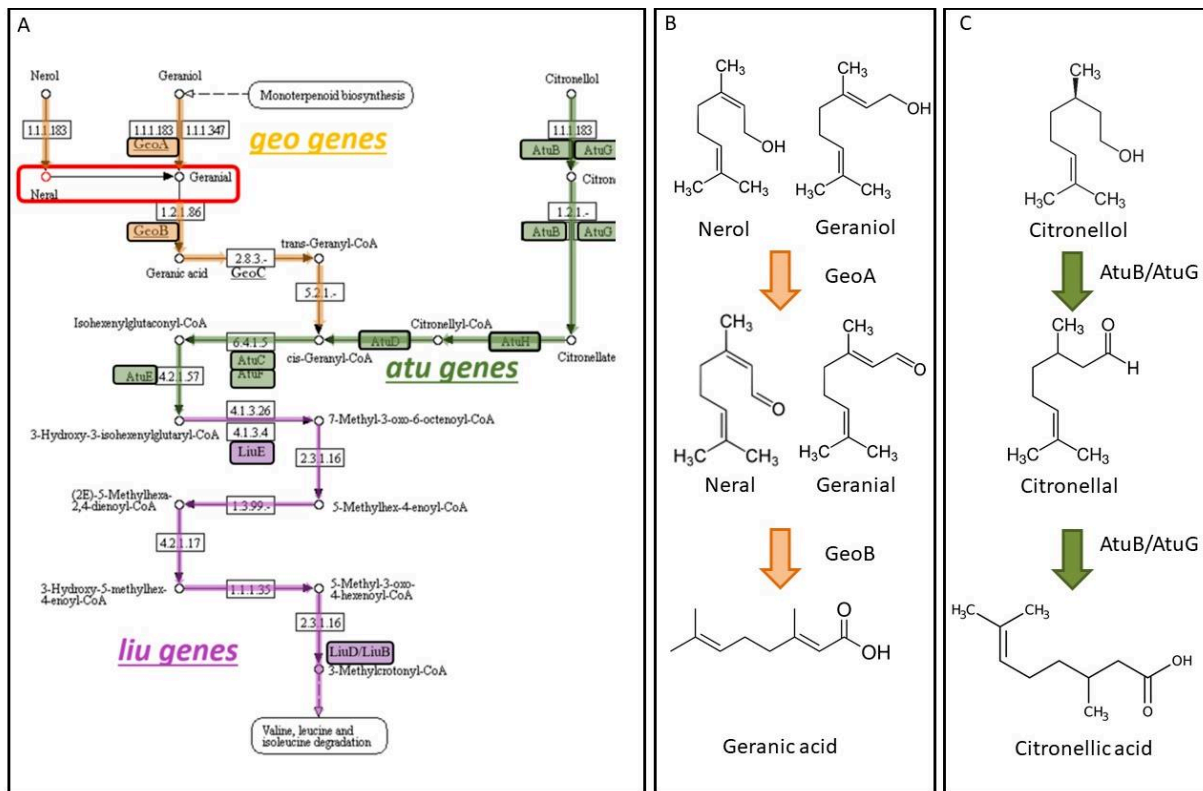


Figure 16 : Voie de dégradation du citral (isomères : néral, géranial) (A). Les gènes de la famille *geo* (en jaune) ont été identifiés chez *Castellaniella defragans* (Lüddecke et al., 2012), alors que l'opéron *atu* (en vert) (Förster-Fromme et al., 2006) et l'opéron *liu* (en rose) (Hocquet et al., 2016) existent chez *P. aeruginosa*. Focus sur la voie de dégradation du Geraniol/Nerol (B), du citronellol (C) (d'après KEGG PATHWAY Database).

2.6.3 Mode d'action

Des travaux effectués sur la bactérie à Gram négatif, *Cronobacter sakazakii*, suggèrent que le citral perturbe la membrane externe et diminue les concentrations d'ATP ainsi que le pH intracellulaire. L'utilisation du DiBAC₄, un marqueur fluorescent se fixant sur les groupements électro-négatifs de la membrane, montre que le citral à la CMI (0,54 mg/mL) provoque une hyperpolarisation membranaire (Gupta et al., 2017; Shi et al., 2016). D'autres travaux utilisant le DiSC3 (3,3'-dipropylthiadicarbocyanine), un fluorochrome qui s'internalise dans les bactéries sans émettre de fluorescence et qui, en cas de dépolarisation membranaire s'externalise et fluoresce (Wang et al., 2011; Wu et al., 1999), indiquent que l'ajout d'une CMI de citral dans le milieu de culture entraîne une augmentation de la fluorescence pouvant aller jusqu'à 2,3 fois.

Tout comme le CNA, le citral possède à des concentrations sub-inhibitrices (1/16^{ème} et 1/8^{ème} de la CMI) des propriétés anti-virulence chez la bactérie pathogène *Vibrio parahaemolyticus*. Il réduit la mobilité par *swarming* et par *swimming*, et empêche la formation de biofilm. Ces observations sont confirmées par des analyses transcriptomiques objectivant une baisse de la transcription des gènes impliqués dans la régulation du QS (*luxS*, *aphA*), la formation du biofilm (*ompW*, *vp0950*, *vp0952*, *vp0962*), la production du flagelle (*flaA*, *flgM*, *flgL*) et celle de toxines (*toxR*). Ces effets sont associés à une réduction de 50% de la quantité de l'autoinducer-2 (Sun et al., 2019). De plus, des tests effectués avec le modèle d'infection expérimentale *Galleria mellonella* montrent que les larves infectées par des souches de *S. aureus* préalablement adaptées à des concentrations subinhibitrices de citral (0,05 mg/mL) pendant 3 jours, résistent mieux (survie de 50% après 4 jours) que celles infectées avec les

bactéries contrôles (même taux de survie après 1 jour) (Apolónio *et al.*, 2014).

Très récemment, une approche protéomique globale effectuée chez la bactérie *A. baumannii* a révélé que le citral à 200 µg/mL induisait une baisse drastique (90%) de la formation du biofilm, principalement due à une réduction de 47% de la production des EPS (*Extracellular Polymeric Substances*). A la même concentration, le citral atténue également la production d'autres facteurs de virulence tels que les lipases (moins 60% par rapport au contrôle), les protéases (moins 70%) et la capacité hémolytique des bactéries (moins 65%) (**Figure 17**). La mobilité par *swimming* mesurée sur gélose passe de 40 mm à 25 mm (Selvaraj *et al.*, 2020).

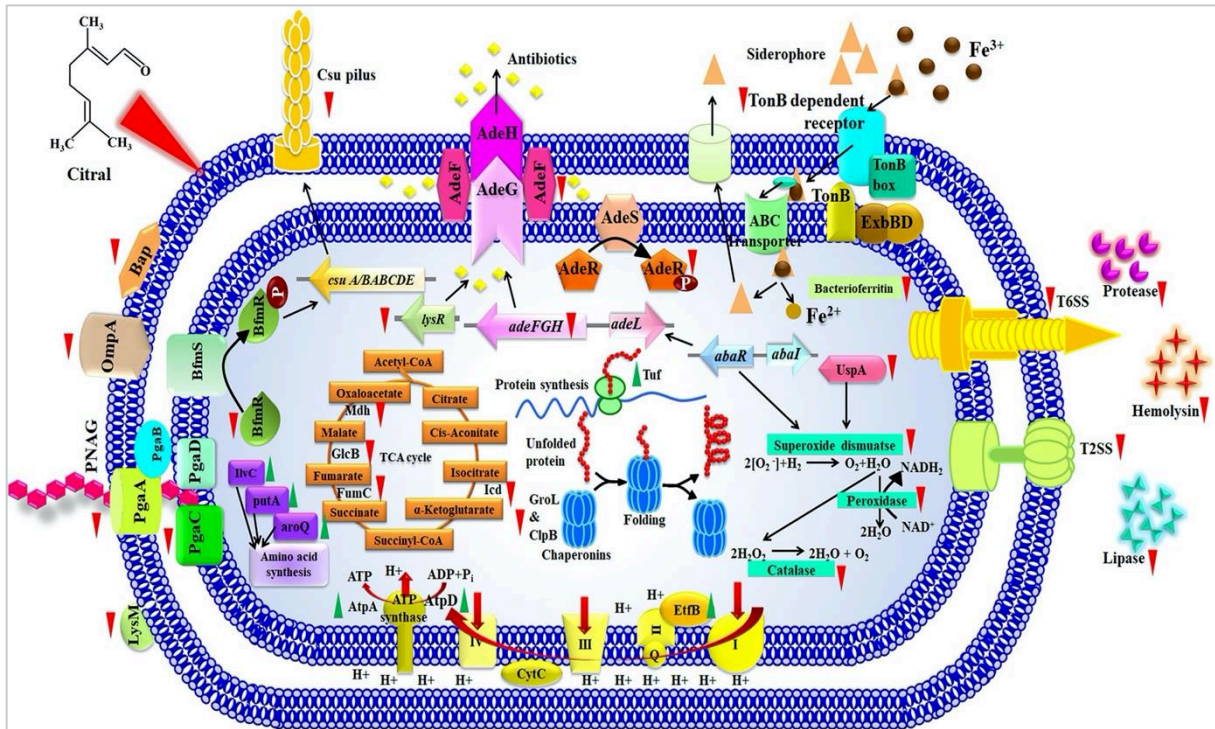


Figure 17 : Représentation schématique des effets globaux du citral sur la bactérie *Acinetobacter baumannii*. T2SS et T6SS : systèmes de sécrétion de type II et de type VI ; les flèches montantes vertes et descendantes rouges indiquent respectivement une augmentation et une diminution des fonctions cellulaires. On observe surtout une baisse de la concentration de molécules du cycle de Krebs indiquant un ralentissement métabolique, une diminution de la virulence (baisse de la production d'hémolysine, de protéases et de lipases) consécutive à l'inhibition des T2SS et T6SS, dérégulation de l'homéostasie du fer, et une diminution des gènes liés à l'initiation du biofilm (Selvaraj *et al.*, 2020).

2.6.4 Impact du citral sur la résistance aux antibiotiques

Il y a peu d'informations disponibles quant à l'impact du citral sur la résistance aux antibiotiques. Son activité a été testée sur des souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (SARM). A des concentrations comprises entre 75 et 150 µg/mL, le citral réduit la CMI de la norfloxacine, de l'érythromycine, de la pénicilline et de la streptomycine de 4 à 32 fois. Même si le mécanisme de cette synergie n'est pas identifié, les auteurs de l'étude suggèrent que c'est la perturbation membranaire provoquée par le citral qui améliore l'entrée et donc l'activité des antibiotiques (Gupta *et al.*, 2017). Dans une autre étude sur *V. parahaemolyticus*, il est apparu que le citral diminuait significativement l'expression des gènes de résistance aux peptides antimicrobiens (*tolC*, *nusA*, *atpA*, *dld* et *fla*) à partir de

6 µg/mL, soit 1/16^{ème} de la CMI (Sun *et al.*, 2019). Chez *A. baumannii*, le citral utilisé à une concentration de 200 µg/mL s'est montré capable de potentialiser le cefotaxime et l'amikacine, mais pas la ciprofloxacine ni la gentamicine (Selvaraj *et al.*, 2020). Chez *S. aureus*, le citral semble bloquer l'activité de systèmes d'efflux comme l'indiquent les mesures d'accumulation de bromure d'éthidium (BET). On observe une augmentation de la concentration de BET jusqu'à 2,6-fois lorsque le citral est utilisé à 150 µg/mL (Gupta *et al.*, 2017).

Enfin, confirmant le faible pouvoir mutagène des HEs (Chan *et al.*, 2013, Ferro *et al.*, 2016, Lu *et al.*, 2018), les souches de *L. monocytogenes* et de SARM ne semblent pas développer de résistance aux antibiotiques ni au citral lui-même après une exposition prolongée (72h) à 0,05 mg/mL de citral (Apolónio *et al.*, 2014).

2.7 Electrophiles endogènes produits par l'hôte

En dehors des molécules extraites des HEs telles que le CNA ou le citral, d'autres électrophiles peuvent avoir également un effet sur la résistance aux antibiotiques. Certaines de ces molécules ont des sources endogènes et sont produites par notre organisme en situation normale ou au cours de certaines pathologies.

Par exemple, les composés électrophiles peuvent avoir pour origine la flore intestinale. Leur présence peut changer temporairement le métabolisme bactérien, voire l'inhiber. C'est le cas de l'acroléine et du 3-hydroxypropionaldéhyde (3-HPA), deux produits de dégradation du glycérol qui participent à la formation de reutérine, un composé antibactérien (Zhang *et al.*, 2018).

Certains électrophiles, produits normalement par le métabolisme du corps humain, voient leur concentration s'élever dans certains contextes pathologiques. C'est le cas par exemple du glyoxal et du méthylglyoxal, deux molécules normalement issues de la peroxydation des lipides et la dégradation des sucres (**Figure 18**) (Lange *et al.*, 2012). Leur présence est plus élevée chez les personnes âgées et celles souffrant de maladies telles que le diabète, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson (Brownlee 1995, Lüth *et al.*, 2005). La présence de ces RES (*Reactive Oxygen Species*) active chez les bactéries (pathogènes ou non) de l'Homme des systèmes de détoxification tels que les glyoxalases (Lee *et al.*, 2017). Les travaux effectués précédemment au laboratoire ont montré que le stress provoqué par ces deux molécules induisait le système d'efflux MexEF-OprN de *P. aeruginosa* et consécutivement, une augmentation de la résistance aux antibiotiques substrats de cette pompe (Juarez *et al.*, 2017).

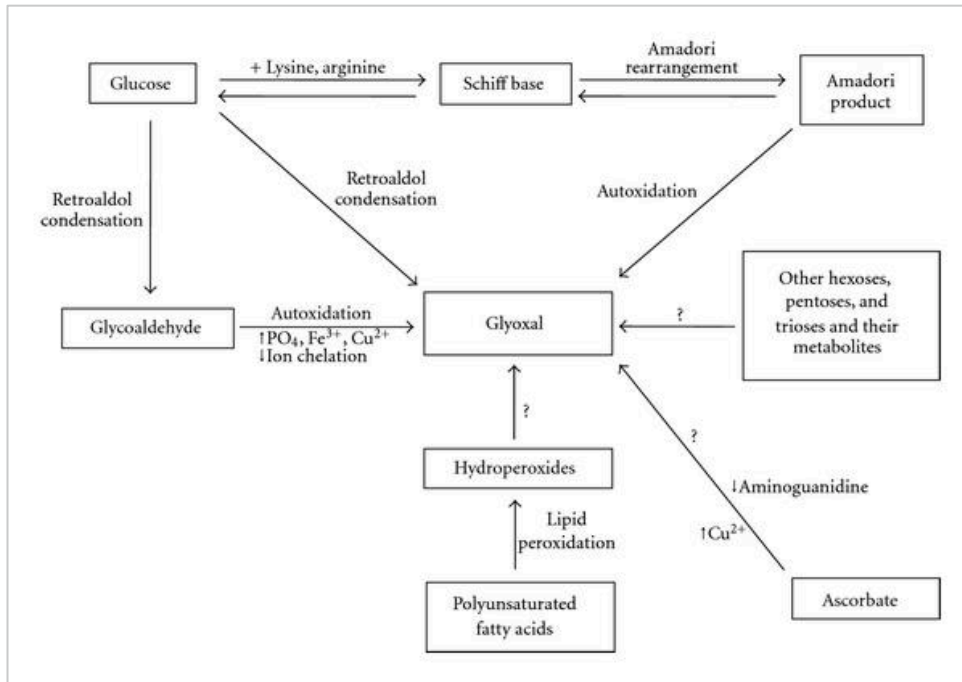


Figure 18 : Différentes sources de production du glyoxal chez l'Homme (Lange et al., 2012).

De la même façon, il apparaît que les acides gras nitrés sont des électrophiles dont la production est favorisée par l'inflammation chez les personnes souffrant de maladies cardiovasculaires (Koenitzer *et al.*, 2010). Enfin, le malondialdéhyde (MDA) est un bon marqueur de la peroxydation des lipides dans différentes pathologies respiratoires (asthme, bronchiectasie, broncho-pneumopathie chronique obstructive...) (Bartoli *et al.*, 2011). En 2015, une équipe a étudié les concentrations de MDA dans les condensats de l'air expiré, les expectorations et le plasma de 40 patients atteints de mucoviscidose (CF) et les a comparées à celles de 25 contrôles sains (Antus *et al.*, 2015). Il est apparu que (i) les concentrations de cet électrophile étaient 3 fois plus importantes dans les expectorations des patients CF (280 nmol/L vs. 92 nmol/L) et que (ii) cet écart augmentait avec la sévérité de la maladie. Enfin, en 2008, une autre équipe a constaté que la surexpression du gène *yqhD* (codant une aldéhyde réductase) permettait à *E. coli* de mieux résister aux ROS et aux aldéhydes issus de la peroxydation des lipides, dont le MDA (Pérez *et al.*, 2008). Dans ce travail, nous étudierons l'impact du malondialdéhyde sur la résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*.

3. Résultats

3.1 Rôle du cinnamaldéhyde (CNA) dans l'induction transitoire de la résistance aux antibiotiques

3.1.1 Contexte et résumé

Dans cette étude, nous avons étudié l'impact du cinnamaldéhyde (CNA) sur la résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa*. Des travaux préalables avaient montré que des molécules électrophiles (glyoxal, méthylglyoxal) étaient capables d'induire la surproduction du système d'efflux MexEF-OprN chez cette bactérie (Juarez *et al.*, 2017). En cherchant d'autres électrophiles naturels, nous avons identifié le CNA, un composé extrait de la cannelle dont l'activité sur de nombreux germes Gram négatifs et positifs est reconnue, et qui peut donc être envisagé comme une alternative potentiellement intéressante aux antibiotiques. Notre démarche était donc de rechercher si le stress électrophile induit par le CNA pouvait avoir des effets antagonistes avec les antibiotiques lors d'une utilisation combinée sur la bactérie *P. aeruginosa*.

Nous avons donc déterminé l'activité du CNA sur la souche de référence *P. aeruginosa* PA14 et recherché si cette molécule pouvait être dégradée par la bactérie. Ensuite, par la mesure des transcrits, nous avons mesuré le niveau d'expression des gènes codant les systèmes d'efflux RND importants en clinique (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN et MexXY/OprM) chez les bactéries mises en présence de concentrations sub-létales de CNA. En parallèle, nous avons déterminé si les changements d'expression observés se traduisaient par des modifications de la résistance aux antibiotiques substrats des pompes.

Les résultats obtenus montrent que le CNA, dont la CMI est égale à 700µg/mL chez PA14, induit simultanément, à des concentrations comprises entre 128 et 512 µg/mL, les 4 systèmes d'efflux étudiés. Cette induction transitoire commence dès les 30 premières minutes de contact et se prolonge environ 2h (correspondant au temps nécessaire pour que la bactérie dégrade le CNA). Toutefois, cette induction est suffisante pour augmenter de 2 à 8 fois le niveau de résistance aux antibiotiques substrats des pompes (β-lactamines, aminosides et fluoroquinolones). Par une stratégie d'inactivation de gènes, nous montrons que sur les 4 pompes d'efflux RND, seule MexAB-OprM est essentielle à la résistance de la bactérie au CNA, suggérant que ce composé pourrait être un substrat naturel, comme c'est le cas pour d'autres composés phénoliques. Parmi les différents régulateurs connus de l'opéron *mexAB-oprM*, il apparaît que l'anti-répresseur ArmR (lui-même sous la dépendance du répresseur NalC), est nécessaire à l'induction de MexAB-OprM lors de l'exposition au CNA. Enfin, le CNA étant rapidement converti par la bactérie en alcool cinnamique (CN-OH) moins toxique (CMI égale à 1024 µg/mL), nous montrons que la substitution de la fonction aldéhyde par la fonction alcool n'induit plus ni MexXY/OprM, ni MexEF-OprN.

Au final, nos résultats montrent que la fonction aldéhyde du CNA active la production des pompes d'efflux MexEF-OprN et MexXY/OprM, le groupement phényle de MexAB-OprM et enfin que des voies de dégradation transforment le CNA en métabolites moins toxiques. Ces résultats sont schématisés dans la **Figure 19**.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Andy Zedet et Corine Girard (PEPITE, EA4267 - UFR Santé, Besançon) qui nous ont donné accès à leur plateforme d'extraction et de séparation (TLC) des composés naturels issus de plantes.

Huiles essentielles : effets du cinnamaldéhyde (CNA) sur la résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*

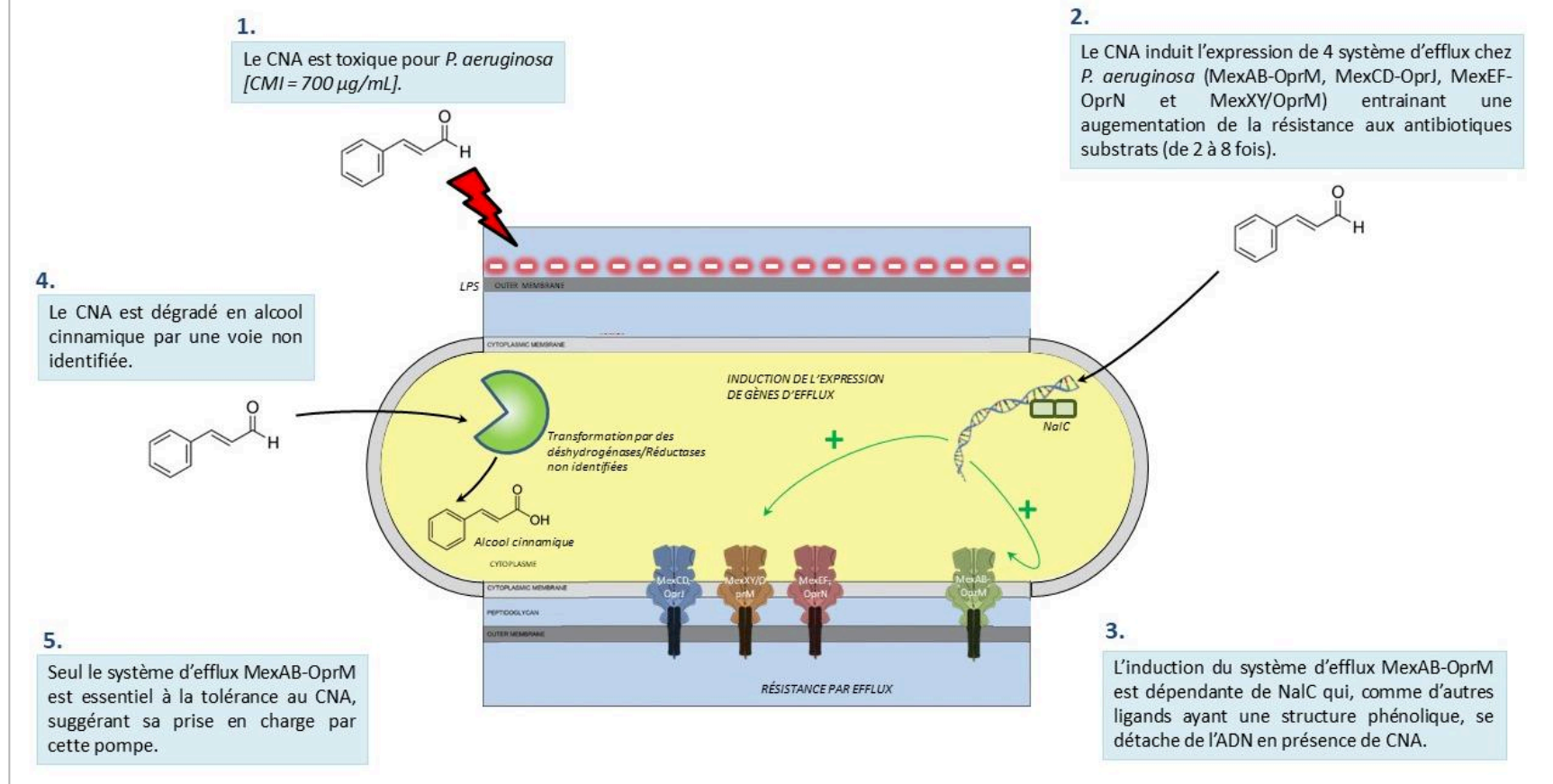
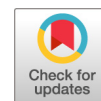


Figure 19 : Schéma récapitulatif de l'effet du cinnamaldéhyde sur la bactérie *P. aeruginosa*.

3.1.2 Article



Cinnamaldehyde Induces Expression of Efflux Pumps and Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*

 Alexandre Tetard,^a Andy Zedet,^b Corine Girard,^b  Patrick Plésiat,^{a,c} Catherine Llanes^a

^aLaboratoire de Bactériologie, UMR CNRS 6249 Chrono-Environnement, Faculté de Médecine-Pharmacie, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

^bPEPITE EA4267, Faculté de Médecine-Pharmacie, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

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

ABSTRACT Essential oils or their components are increasingly used to fight bacterial infections. Cinnamaldehyde (CNA), the main constituent of cinnamon bark oil, has demonstrated interesting properties *in vitro* against various pathogens, including *Pseudomonas aeruginosa*. In the present study, we investigated the mechanisms and possible therapeutic consequences of *P. aeruginosa* adaptation to CNA. Exposure of *P. aeruginosa* PA14 to subinhibitory concentrations of CNA caused a strong albeit transient increase in the expression of operons that encode the efflux systems MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, and MexXY/OprM. This multipump activation enhanced from 2- to 8-fold the resistance (MIC) of PA14 to various antipseudomonal antibiotics, including meropenem, ceftazidime, tobramycin, and ciprofloxacin. CNA-induced production of pump MexAB-OprM was found to play a major role in the adaption of *P. aeruginosa* to the electrophilic biocide, through the NalC regulatory pathway. CNA was progressively transformed by bacteria into the less toxic metabolite cinnamic alcohol (CN-OH), via yet undetermined detoxifying mechanisms. In conclusion, the use of cinnamon bark oil or cinnamaldehyde as adjunctive therapy to treat *P. aeruginosa* infections may potentially have antagonistic effects if combined with antibiotics because of Mex pump activation.

KEYWORDS *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotic resistance, cinnamaldehyde, drug efflux, efflux pumps, essential oils

Pseudomonas aeruginosa is a major opportunistic pathogen involved in a wide range of acute and chronic infections (1). This versatile microorganism is notoriously known for its capacity to thrive in challenging environments thanks to a plethora of adaptive mechanisms (2, 3). Accounting for its relatively high intrinsic resistance to toxic molecules, *P. aeruginosa* is surrounded by a poorly permeable outer membrane that allows extrusion mechanisms, such as efflux systems, to operate efficiently (4). Some of these transmembrane nanomachineries are able to export antibiotics and, thus, to impair the interaction of drugs with their cellular targets (5). At least four efflux pumps of the resistance-nodulation-cell division (RND) family can significantly increase the resistance of *P. aeruginosa* to antibiotics when overproduced upon mutations, namely, MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, and MexXY/OprM (5). These poly-specific transporters accommodate a wide range of structurally unrelated antimicrobials, including quinolones, macrolides, tetracyclines, and phenicols, but efflux of aminoglycosides and β -lactams (except cefepime) is specific to MexXY/OprM and MexAB-OprM, respectively (6).

Over the last years, the sustained emergence and spread of multiresistant strains of *P. aeruginosa* in hospitals have resulted in hard-to-treat infections (7, 8). When therapeutic options are limited, or to avoid the use of antibiotics, essential oils from aromatic plants are sometimes viewed as alternatives to treat non-severely ill patients. Essential

Citation Tetard A, Zedet A, Girard C, Plésiat P, Llanes C. 2019. Cinnamaldehyde induces expression of efflux pumps and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e01081-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01081-19>.

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

Address correspondence to Patrick Plésiat, patrick.plesiat@univ-fcomte.fr.

Received 24 May 2019

Returned for modification 21 June 2019

Accepted 27 July 2019

Accepted manuscript posted online 5 August 2019

Published 23 September 2019

oils containing an aldehyde group (e.g., citral), a phenyl group (e.g., thymol, eugenol, carvacrol, and terpineol), or both (e.g., cinnamaldehyde) indeed exhibit antimicrobial properties *in vitro* against various Gram-negative and Gram-positive species when used alone (9–11) or in combination (12). However, the fact that some of these oils activate bacterial efflux systems might potentially compromise the clinical efficacy of antibiotic treatments. For instance, the tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil increases expression of MexAB-OprM in *P. aeruginosa* (13), while the thyme (*Thymus maroccanus*) and pine (*Pinus* sp.) oils activate AcrAB-TolC in *Escherichia coli* (14, 15). The *S*-phenyl-L-cysteine sulfoxide from the tropical plant *Petiveria alliacea* reduces the virulence of *P. aeruginosa* by inhibiting kynureninase KynU, but it stimulates MexEF-OprN expression (16).

The observation that RND pumps can transiently be upregulated by environmental signals is not really surprising *per se* since efflux systems are a major component of adaptive responses in bacteria (17). For example, MexAB-OprM (18) and MexXY/OprM (19) are both activated by oxidative stress, MexCD-OprJ by membrane damages (20), and MexEF-OprN by nitrosative (21) or disulfide (22) stress. While it has become clear that *mex* genes are overexpressed under such harsh conditions (18–22), the impact of this increased efflux activity on antibiotic resistance has remained unexplored. Recently, we found that MexEF-OprN production is strongly augmented when *P. aeruginosa* is submitted to electrophilic stress by aldehydes, such as glyoxal, methylglyoxal, and cinnamaldehyde (CNA) (23). However, the intrinsic resistance of the microorganism to CNA appeared to be only partially dependent upon MexEF-OprN, thereby suggesting that other efflux systems also contribute to the protection against this compound (23).

In the present work, we demonstrate that CNA, the major component of cinnamon bark oil, triggers the expression of four major RND efflux pumps (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, and MexXY/OprM) and incidentally reinforces the resistance of *P. aeruginosa* to several antipseudomonal antibiotics. Results of time-kill experiments also show that MexAB-OprM is an essential mechanism in the defense of *P. aeruginosa* against CNA.

RESULTS

CNA induces pumps expression in *P. aeruginosa*. To assess the impact of CNA on efflux systems in *P. aeruginosa*, wild-type reference strain PA14 was challenged with 0.25× and 0.5× MIC of CNA (256 and 512 μg/ml, respectively) in Mueller-Hinton broth. At a concentration of 256 μg/ml, the agent reduced the growth rate of PA14 for approximately 1 h, while at 512 μg/ml a transient bacteriostasis occurred that was followed by bacterial regrowth (see Fig. S1 in the supplemental material). The expression levels of genes *mexB*, *mexC*, *mexE*, and *mexY* were determined by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) at different time points (t): t_0 , $t_{15\text{min}}$, $t_{30\text{min}}$, and $t_{1\text{h}}$ postexposure. As shown in Fig. 1, all these genes were activated in response to CNA, although with some differences in their temporal expression. While *mexB* and *mexE* were strongly and rapidly ($t_{15\text{min}}$) upregulated in the presence of 0.25× MIC CNA, their transcripts dropped to finally return to their uninduced baselines at $t_{1\text{h}}$. This gene activation was lower in bacteria exposed to 0.5× MIC, possibly as a result of an inverse correlation with pump MexCD-OprJ expression. Indeed, gene *mexC* displayed similar activation kinetics as *mexB* and *mexE* upon treatment with 0.5× MIC CNA, but the 0.25× MIC dose failed to induce its transcription. Finally, gene *mexY* expression gradually increased in bacteria challenged with the highest concentration of CNA, to reach a maximum at $t_{1\text{h}}$. As for *mexC*, no induction of *mexY* was visible under the 0.25× MIC condition. Compared with previously established thresholds (24–26), all the *mex* genes studied were found to be significantly upregulated (Fig. 1, red dotted-line) at levels close to those of *in vitro* mutants of PA14 overproducing MexAB-OprM (named PA14*mexAB*⁺), MexCD-OprJ (PA14*mexCD*⁺), MexEF-OprN (PA14*mexEF*⁺), or MexXY/OprM (PA14*mexXY*) (Fig. 1, solid red line). Overall, these results demonstrated that CNA has dramatic, although unequal, effects on the expression of these four pumps in *P. aeruginosa*.

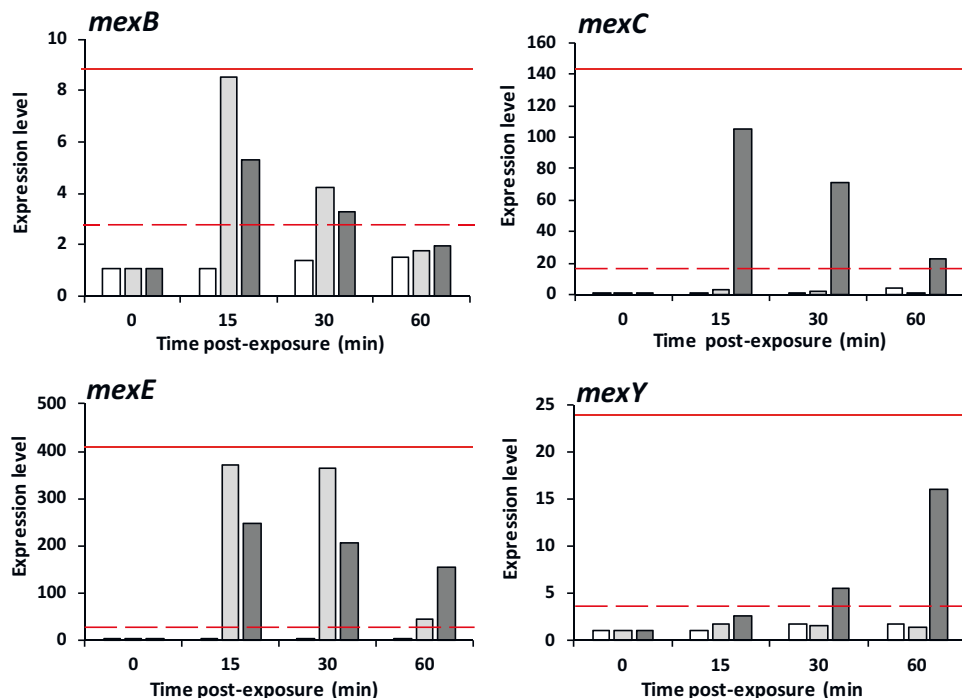


FIG 1 Expression levels of genes *mexB*, *mexC*, *mexE*, and *mexY*. Gene transcripts were measured over time by RT-qPCR in strain PA14 exposed to 1% DMSO (negative control, in white) and to 256 and 512 $\mu\text{g/ml}$ CNA (in light and dark grey, respectively). The genes were considered activated (indicated by dotted red lines) when their expression was ≥ 3 -fold (*mexB*), ≥ 5 -fold (*mexY*), and ≥ 20 -fold (*mexE* and *mexC*) that of unexposed PA14 at t_0 . Indicated by solid red lines are the mRNA amounts of PA14-derived mutants PA14*mexAB*⁺ (*mexB*, 9.5-fold that of PA14), PA14*mexCD*⁺ (*mexC*, 151-fold), PA14*mexEF*⁺ (*mexE*, 411-fold), and PA14*mexXY*⁺ (*mexY*, 24-fold) that individually overexpress a different efflux pump, in the absence of CNA.

CNA induces antibiotic resistance. Because these efflux pumps mediate antibiotic resistance when overproduced, we determined the susceptibility of CNA-challenged strain PA14 to some of their substrates, by the dilution method in Mueller-Hinton agar medium (Table 1). In concordance with CNA-induced expression of MexAB-OprM, MICs of ticarcillin, aztreonam, and ceftazidime increased up to 4-fold in the presence of 128 to 512 $\mu\text{g/ml}$ biocide. In contrast, the MICs remained unchanged in bacteria lacking the *mexAB* genes (PA14 Δ AB) or in mutant PA14*mexAB*⁺ that constitutively overexpresses operon *mexAB-oprM* as a result of repressor MexR alteration (Table 1). CNA-promoted resistance to meropenem, another substrate of MexAB-OprM, was not totally suppressed in PA14 Δ AB because of MexT-dependent downregulation of the gene encoding the carbapenem-specific porin OprD (from 5- to 7-fold with respect to nonexposed PA14 Δ AB). As demonstrated elsewhere, the LysR-type regulator MexT positively controls the expression of operon *mexEF-oprN* and conversely represses gene *oprD* activity (27).

Seemingly concordant with CNA activating the efflux system MexXY/OprM, MICs of two of the pump substrates, namely, gentamicin and tobramycin, were increased 2- and 4-fold, respectively, in response to CNA exposure (≥ 256 $\mu\text{g/ml}$). However, this effect was no longer observed in the *mexXY*-overexpressing mutant PA14*mexXY*⁺ and was not abolished in *mexXY* deletion mutant PA14 Δ XY either, thereby clearly indicating intervention of a mechanism different from MexXY/OprM in CNA-promoted resistance to aminoglycosides (Table 1).

Finally, strain PA14 susceptibility to ciprofloxacin, a fluoroquinolone actively exported by MexEF-OprN (28), and to a lesser extent by MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY/OprM (29), was reduced up to 8-fold upon CNA challenge. This enhanced resistance could not be cancelled by single or double pump deletions but was suppressed in the quadruple mutant PA14 Δ AB/XY/EFN/CDJ (Table 1). Interestingly, this

TABLE 1 Influence of CNA on MICs of antibiotics

Antibiotic ^a	CNA ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ^b ($\mu\text{g/ml}$) of antibiotics for strain:									
		PA14	PA14 Δ AB	PA14 Δ armR	PA14mexAB+	PA14 Δ XY	PA14mexXY+	PA14 Δ EFN	PA14mexEFN+	PA14 Δ AB/ EFN	PA14 Δ AB/ XY/EFN/CDJ
Ticarcillin	0	16	8	16	128						
	128	32	8	16	128						
	256	64	8	16	128						
	512	64	c	c	128						
Aztreonam	0	4	0.25	4	32						
	128	8	0.25	4	32						
	256	16	0.25	4	32						
	512	16	c	c	32						
Meropenem	0	0.5	0.125	0.5	2						
	128	2	0.25	0.5	2						
	256	4	0.25	1	2						
	512	2	c	1	2						
Ceftazidime	0	1	0.25	1	4						
	128	1	0.25	1	4						
	256	2	0.25	1	4						
	512	2	c	1	4						
Gentamicin	0	1		1		0.25	4				
	128	1		1		0.25	4				
	256	2		2		0.25	4				
	512	2		2		0.5	4				
Tobramycin	0	0.5		0.5		0.25	2				
	128	0.5		0.5		0.25	2				
	256	1		1		0.5	2				
	512	2		2		1	2				
Ciprofloxacin	0	0.125	0.125	0.125	0.5	0.125	0.5	0.125	4	0.06	≤ 0.03
	128	0.5	0.5	0.5	1	0.5	0.5	0.5	4	0.25	≤ 0.03
	256	1	1	1	1	1	1	0.5	4	c	c
	512	1	c	1	1	1	1	0.5	4	c	c

^aTicarcillin, aztreonam, meropenem, and ceftazidime are substrates of MexAB-OprM; gentamicin and tobramycin are substrates of MexXY/OprM; and ciprofloxacin is a substrate of the 4 efflux pumps.

^bMIC values in boldface indicate an increase in bacterial resistance due to the presence of CNA.

^cBacterial growth was inhibited by 256 or 512 $\mu\text{g/ml}$ CNA.

highly efflux-deficient mutant was more susceptible to CNA than its wild-type parent PA14 and could not grow in the presence of CNA concentrations higher than 128 $\mu\text{g/ml}$. Furthermore, strongly suggesting a contribution of efflux systems MexAB-OprM and MexEF-OprN to the intrinsic resistance of *P. aeruginosa* to CNA, the double mutant PA14 Δ AB/EF was unable to develop on 256 $\mu\text{g/ml}$ either.

To check whether or not the antagonistic interactions observed between CNA and efflux substrates were specific to the PA14 genetic background, double-disk antagonism tests were performed with ciprofloxacin on clinical (PAO1 and LESB58) and environmental (1393, 1349, and 1429) strains (listed in Table S1 in the supplemental material). In agreement with our previous results, CNA induced a resistance to ciprofloxacin in all the five strains tested (see Fig. S2 in the supplemental material).

Efflux systems provide a protection against CNA. The susceptibility of deficient and overproducing efflux pump mutants to CNA was first assessed by the dilution method in Mueller-Hinton agar. MexAB-OprM was the only system studied whose inactivation resulted in a modest but reproducible decrease in resistance to CNA (MIC equal to 512 $\mu\text{g/ml}$ versus 1,024 $\mu\text{g/ml}$ for its wild-type parent PA14) (see Table S2 in the supplemental material). Suppression of operon *mexEF-oprN* in the Δ *mexAB* background (mutant PA14 Δ AB/EFN) further lowered CNA MIC from 512 to 256 $\mu\text{g/ml}$, thus confirming a role for MexEF-OprN in the intrinsic resistance to this compound only when MexAB-OprM is inactive. In contrast, deletion of *mexCD-oprJ* or *mexXY* had virtually no impact on the susceptibility of *P. aeruginosa* to CNA when single (PA14 Δ CDJ

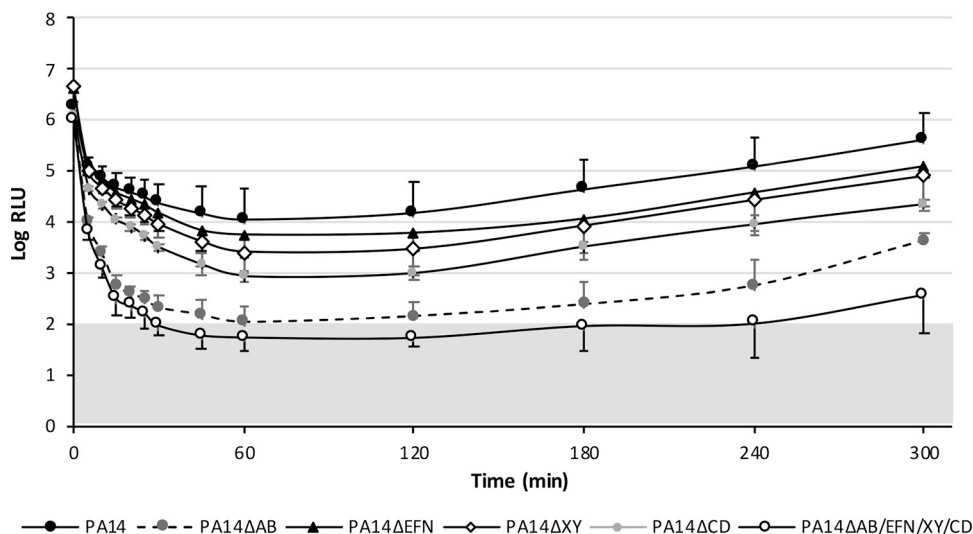


FIG 2 Bactericidal activity of CNA on *P. aeruginosa*. Bioluminescent strain PA14-*lux* and its derived mutants PA14ΔAB-*lux*, PA14ΔEFN-*lux*, PA14ΔXY-*lux*, PA14ΔCDJ-*lux*, and PA14ΔAB/EFN/XY/CDJ-*lux* were cultured to mid-log phase and then challenged with 700 μg/ml CNA. Bioluminescence (Log RLU), used as an indicator of cell survival, was recorded in triplicate during 5 h. RLU values are mean values ± standard deviations. A bioluminescence threshold was established with sterile MHB (shaded zone).

and PA14ΔXY), double (PA14ΔXY/CDJ and PA14ΔEFN/XY), and triple mutants (PA14ΔAB/EFN/XY) were compared with their *mexCD-oprJ* and *mexXY* proficient counterparts (Table S2). Finally, the quadruple mutant PA14ΔAB/XY/EFN/CDJ showed the highest susceptibility to the electrophile (MIC equal to 128 μg/ml).

To confirm these results, we carried out time-kill experiments on bioluminescent strain PA14-*lux* and various efflux-deficient derivatives. CNA was added to bacterial cultures in Mueller-Hinton broth at 700 μg/ml since a concentration of 1,024 μg/ml appeared to be too bactericidal and 512 μg/ml was unable to kill PA14-*lux* significantly (see Fig. S3 in the supplemental material). Compared with wild-type strain PA14, inactivation of pump MexEF-OprN (mutant PA14ΔEFN), MexCD-OprJ (PA14ΔCDJ), or MexXY/OprM (PA14ΔXY) had only a modest impact on bacterial killing (Fig. 2). Two hours postexposure, a regrowth of all the mutants occurred as for PA14. The bactericidal activity of CNA was much stronger on *mexAB*-deleted mutants PA14ΔAB, PA14ΔAB/EFN (not shown), and PA14ΔAB/EFN/CDJ/XY, with a shift in bioluminescence of ≥ 4 log₁₀ relative light units (RLUs) within the first 60 min of treatment (Fig. 2). Drug-free Mueller-Hinton agar (MHA) plates inoculated with culture samples of the quadruple mutant collected 18 h after CNA addition remained sterile, thus demonstrating a complete killing of these efflux-deficient bacteria. Altogether, these data highlighted the predominant role played by MexAB-OprM in CNA tolerance, compared with the other efflux systems investigated. However, contrasting with these observations, none of the efflux pump-overproducing mutants, including PA14*mexAB*⁺, appeared to be more resistant to this toxic agent than PA14 (Table S2). As mentioned previously (Fig. 1), *mexB* expression levels were quite similar in the CNA-exposed PA14 strain ($t_{15\text{min}}$) and in PA14*mexAB*⁺, which supports the notion that MexAB-OprM contributes similarly to the bacterial resistance against the biocide, whether its dysregulation is induced or mutational. Of note, MICs of CNA were lower for PA14*mexCD*⁺ than for wild type PA14 (512 μg/ml versus 1,024 μg/ml) likely because of the impaired activity of MexAB-OprM in this *nfxB* mutant (26).

CNA induces *mexAB-oprM* expression via the ArmR regulatory pathway. In order to determine which regulatory circuitry activates MexAB-OprM production upon CNA stress, we measured the mRNA levels of genes known to control either positively (*cpxR* and *armR*) or negatively (*mexR*, *ampR*, *nalC*, *nalD*, *mexT*, and *mdrR1*) the *mexAB-oprM* operon (Table 2). Among this set of genes, only those of the NalC regulatory

TABLE 2 Expression of operon *mexAB-oprM* regulatory genes after exposure of strain PA14 to 256 or 512 $\mu\text{g/ml}$ of CNA

Regulatory genes by type ^a	Transcript levels after: ^b			Target of the regulator	Reference
	15 min	30 min	1 h		
Repressor					
<i>mexR</i>	25 (40)	2.9 (8.4)	2.3 (5.6)	Distal promoter of <i>mexAB-oprM</i>	50
<i>nalC</i>	21 (14.7)	1.1 (3.5)	1.1 (1.2)	Promoter of <i>PA3720-armR</i>	51
<i>nalD</i>	2.2 (2.4)	0.9 (1.2)	0.9 (0.7)	Proximal promoter of <i>mexAB-oprM</i>	52
<i>ampR</i>	3 (2.7)	1 (0.6)	1 (0.5)	Promoter of <i>mexAB-oprM</i>	53
<i>mexT</i>	7.7 (1.8)	4.3 (0.4)	1 (0.6)	Promoter of <i>mexAB-oprM</i>	54
<i>mdrR1</i>	1.8 (0.8)	2 (1.2)	0.6 (1.1)	Proximal promoter of <i>mexAB-oprM</i>	55
Activator					
<i>cpxR</i>	1.7 (1.1)	1 (0.6)	1 (0.8)	Distal promoter of <i>mexAB-oprM</i>	56
Antirepressor					
<i>armR</i>	61 (95)	1.9 (43)	1.2 (7.5)	MexR protein	30
<i>PA3720</i>	206 (255)	46 (218)	20 (144)	Unknown function (in operon with <i>armR</i>)	

^aRegulatory genes implicated in modulation of MexAB-OprM under biofilm conditions (5) were not evaluated here (*rocS2-A2* and *brlR*). Repressors MdrR1 and MdrR2 are both required in strain PAO1 for binding to the promoter region of *mexAB-oprM* (55). However, only *mdrR1* expression could be measured because gene *mdrR2* is absent from the genome of PA14.

^bMean value expressed as a ratio to that of PA14 when grown in MHB broth containing 1% DMSO. Values in bold face highlight the increased expression of regulatory pathway *nalC-PA3720/armR-mexR*. Values outside and within the parentheses correspond to 256 and 512 $\mu\text{g/ml}$ of CNA, respectively.

pathway increased rapidly and strongly when strain PA14 was submitted to 256 or 512 $\mu\text{g/ml}$ of biocide, namely, *mexR*, *nalC*, *armR*, and *PA3720*. Fully consistent with our previous results (Fig. 1), this burst in efflux-related gene expression was transient and no longer visible at t_{1h} except for *PA3720*, a gene of unknown function. Genes *PA3720* and *armR* form an operon whose transcription is repressed by the product of divergently oriented gene *nalC* (see Fig. S4 in the supplemental material) (30). Confirming the role of the ArmR/NalC pathway in the adaptive response of *P. aeruginosa* to CNA, gene *mexB* expression remained unchanged in mutant PA14 Δ *armR* exposed to a concentration of 256 $\mu\text{g/ml}$ (1.3-fold versus 8-fold in PA14), as were the MICs of MexAB-OprM substrates ticarcillin, aztreonam, and ceftazidime (Table 1). As expected, deletion of *armR* had no impact on bacterial resistance to gentamicin, tobramycin, and ciprofloxacin which are preferred substrates of pumps MexCD-OprJ, MexEF-OprN, and/or MexXY-OprM and had only a partial influence on meropenem MICs because of MexT-dependent negative control of porin OprD-encoding gene (27) (Table 1).

CNA is degraded by *P. aeruginosa*. The observation that several Mex systems were transiently activated upon CNA exposure suggested that the biocide might be transformed into less toxic metabolites by non-efflux-based detoxifying mechanisms. The CNA molecule has two electrophilic reactive sites, namely, a conjugated double bond and an aldehyde group, that can react with nucleophilic molecules (e.g., proteins, reduced glutathione, and DNA) to form cinnamic alcohol (CN-OH), cinnamic acid, and adducts (31). Visvalingam et al. found that *E. coli* is able to enzymatically convert CNA into cinnamic alcohol through dehydrogenases/reductases YqhD and DkgA (32). To determine if a similar inactivation process exists in *P. aeruginosa*, we analyzed the composition of culture supernatants of CNA-exposed strain PA14 by thin-layer chromatography (TLC). Fig. 3 shows that CNA started to quantitatively decrease after 1 h of incubation and was no longer detectable after 3 h, while the amounts of cinnamic alcohol (CN-OH) increased. After 24 h, this metabolite could not be detected in the supernatants either (Fig. 3).

As an indication that CN-OH is somewhat less toxic than CNA toward *P. aeruginosa*, the MIC of this compound was 2-fold higher than that of CNA (Table S2). Induction of *mexB*, *mexC*, *mexE*, and *mexY* expressions by 256 (0.125 \times MIC) or 512 $\mu\text{g/ml}$ (0.25 \times MIC) CN-OH was assessed by RT-qPCR after 15 min of contact with bacteria. Only gene *mexB* was activated by CN-OH (up to 9.5-fold at 512 $\mu\text{g/ml}$) with respect to an unexposed control, which is a result that suggests that the aldehyde group of CNA (lacking in CN-OH) partially supports the toxic and efflux-inducing activities of the

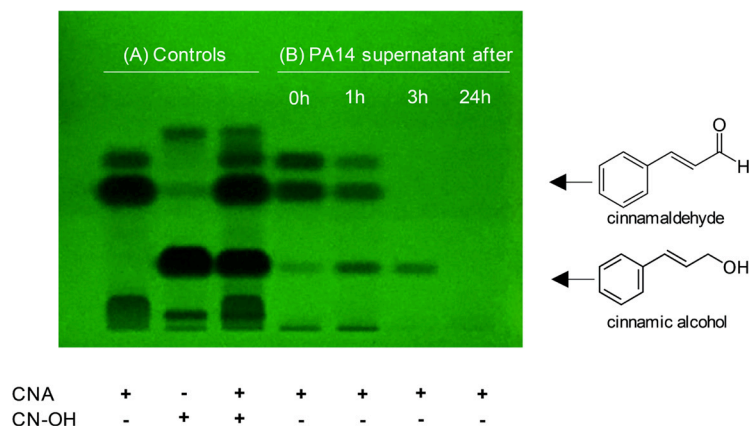


FIG 3 TLC of cinnamaldehyde metabolites. Samples were chromatographed on thin-layer plates (Alu-gram Xtra SIL G UV254), developed with cyclohexane:ethyl acetate (7:2, vol:vol). (A) Separation and detection of standards (10 μ g CNA, 10 μ g cinnamic alcohol [CN-OH], and a mixture of 10 μ g CNA + 10 μ g CN-OH), and (B) detection of CNA metabolites in the supernatant of PA14 growing medium 0, 1, 3, and 24 h postexposure to CNA at 512 μ g/ml.

biocide. Upregulation of MexAB-OprM by CN-OH at 256 or 512 μ g/ml was correlated with a significant augmentation (2- to 4-fold) of PA14 resistance to the pump substrates (see Table S3 in the supplemental material).

DISCUSSION

Cinnamon bark oil is traditionally used in anti-infective tropical medicine and tends to be a substitute for antibiotics to fight mild infections in nontropical areas. Its main component, CNA, displays a quite strong inhibitory activity against a variety of bacterial pathogens, including *Listeria monocytogenes* (33), *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (33, 34), and *P. aeruginosa* (35). Because of its highly bioreactive aldehyde group, CNA interacts with multiple cellular components and functions, including membrane lipids, ATPases, and cell division (36, 37). Furthermore, by antagonizing the quorum sensing regulatory systems of *P. aeruginosa*, CNA has potentially interesting properties to treat biofilm-associated infections (38). However, a previous study showed that its bactericidal activity against the microorganism is not potentiated by antibiotics, except colistin in a minority of clinical isolates (39).

Reminiscent of the action of some other essential oils (13, 14), we found that *P. aeruginosa* adapts to relatively elevated CNA concentrations by upregulating several Mex pumps, of which MexAB-OprM is essential for its survival. Such a multipump activation likely results from a global response to the stress generated by CNA (23). The energy cost of such a high efflux activity might explain the transient growth arrest observed during the first hour of CNA exposure. In agreement with this, the decline in expression of genes *mexB*, *mexC*, and *mexE* was concomitant with the recovery of bacterial multiplication (Fig. 1 and Fig. S1). However, the respective contribution of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, and MexXY/OprM to the extremely fast adaptation process to CNA remains to be clarified, as the kinetics and degree of upregulation of these systems were somewhat different. Compensation of one pump with another at a certain time point of CNA treatment cannot be excluded, as an inverse correlation between the activity of several Mex systems has been noted in single pump deletion mutants (40). Since the expression of operons *mexCD-oprJ*, *mexEF-oprN*, and *mexXY* was unaffected in bacteria challenged with the CNA metabolite CN-OH, one can assume that their transient activation in CNA-treated cells is due to CNA and not CN-OH. This working hypothesis would not hold for *mexAB-oprM*, the transcription of which was still induced by CN-OH exposure.

E. coli encodes several dehydrogenases/reductases, some of them (YqhD, DkgA, and

YahK) being implicated in the biotransformation of CNA into CN-OH (32, 41). YahK, a cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD family), shares 67% amino acid sequence identity with a predicted protein, PA2275, from *P. aeruginosa*. Since the PA2275-encoding gene was highly overexpressed in bacteria exposed to CNA (23), we constructed a deletion mutant (PA14Δ2275) to better assess its physiological function. The deletion had virtually no impact on the formation of CN-OH (observed by thin-layer chromatography at t_{1h} postexposure; data not shown), indicating that one or several PA2275-independent pathways operate in CNA degradation.

An interesting issue is to understand how CNA can trigger the activation of so many efflux pumps in *P. aeruginosa*. As depicted in Fig. 3, the CNA molecule contains both an electrophilic aldehyde group and a lipophilic aromatic ring. The effectiveness of some lipophilic antimicrobial agents relies on their ability to readily dissolve into and/or to interact with bacterial membranes (42). For example, membrane-damaging agents, such as chlorhexidine (20) and benzalkonium chloride (43), are known inducers of operon *mexCD-oprJ* expression. As demonstrated previously in our laboratory, the aldehyde group of glyoxal or methylglyoxal strongly activates the production of MexEF-OprN and MexXY/OprM in treated bacteria (23). In agreement with these data, the present study shows that the conversion of the aldehyde group to a hydroxyl group abolishes the capacity of CNA to upregulate MexCD-OprJ, MexEF-OprN, and/or MexXY/OprM. Cinnamic acid and hydrocinnamic acid which are closely related to CNA but possess a carboxylic group in place of the aldehyde group also failed to induce the expression of these 3 pumps (data not shown).

The phenyl ring, which is shared by CNA and CN-OH molecules, likely plays a major role in the MexAB-OprM dysregulation. Indeed, phenolic acids have the capacity to induce the expression of operon *acrAB-toIC* (encoding a MexAB-OprM homolog) in *Erwinia chrysanthemi* (44) and pentachlorophenol triggers that of operon *mexAB-oprM* in *P. aeruginosa* (45). In line with the latter example, the aromatic ring of CNA and CN-OH would interact with repressor NalC, allowing antirepressor ArmR to be produced, with subsequent *mexAB-oprM* overexpression (45). However, it remains unclear why gene *mexB* expression dropped rapidly (t_{1h}), while CNA and CN-OH were still quantitatively present in the culture medium of challenged bacteria (i.e., the persistence of the phenyl moiety of CNA should have still stimulated *mexAB-oprM* transcription).

CNA-exposed bacteria were more resistant (up to 4-fold) to major antipseudomonal β -lactams, in part because of the higher efflux activity of MexAB-OprM. On the other hand, the mechanisms involved in CNA-dependent induction of resistance to aminoglycosides (up to 4-fold) remain to be fully elucidated. Thus, despite notable anti-infective properties, the major component of cinnamon bark oil may potentially cause therapeutic problems if used in combination with antibiotics to fight *P. aeruginosa* infections. Its bactericidal effects on the pathogen are transient because of defense mechanisms involving several efflux systems and a still unknown degradation pathway. Clearly, MexAB-OprM is a key element of the adaptive response to CNA in *P. aeruginosa*. Whether this system is able to efflux CNA or some of its metabolites warrants further investigations. The possibility that CNA selects MexAB-OprM-overproducing mutants *in vivo* should also be addressed to avoid the emergence of multiple resistance to antibiotics, especially in cystic fibrosis patients who use quite high doses of essential oils to control or prevent lung colonization by *P. aeruginosa*. From a more general perspective, a better knowledge of *in vivo* concentrations of the major components of essential oils would certainly be useful to establish whether these concentrations can be therapeutically relevant or, in contrast, would antagonize the efficacy of antibiotics.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions. The reference strains, mutants, and plasmids used in this study are listed in Table S1. All the bacterial cultures were incubated at 37°C in Mueller-Hinton broth (MHB) with adjusted concentrations of Ca^{2+} (from 20 to 25 $\mu\text{g/ml}$) and Mg^{2+} (from 10 to 12.5 $\mu\text{g/ml}$) (Becton, Dickinson and Company, Cockeysville, MD) or on Mueller-Hinton agar (MHA)

(Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) supplemented with antibiotics when required. Cinnamaldehyde (CNA), cinnamic alcohol (CN-OH), and dimethylsulfoxide (DMSO) were obtained from Sigma-Aldrich.

Construction of PA14 efflux-defective mutants. In order to study the role of active efflux in bacterial tolerance to CNA, overproducing and defective efflux mutants were constructed from wild-type strain PA14. Spontaneous efflux-overexpressing mutants were selected on MHA plates containing 64 $\mu\text{g/ml}$ ticarcillin (MexAB-OprM overproducers), 2 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin (MexXY/OprM), and 2 $\mu\text{g/ml}$ ciprofloxacin (MexCD-OprJ or MexEF-OprN). After confirmation of gene *mexB*, *mexY*, *mexC*, or *mexE* overexpression by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and appropriate primers (see Table S4 in the supplemental material), a clone of each selection panel was randomly chosen to identify its mutation. Sequencing experiments with primers listed in Table S4 revealed that all of the tested clones exhibited nonsynonymous mutations in known regulatory genes (5), including $\Delta 3$ -bp in *mexR* (mutant PA14*mexAB*⁺), $\Delta 620$ -bp in *mexZ* (PA14*mexXY*⁺), Q₁₁₆Stop in *nfxB* (PA14*mexCD*⁺), and +1-bp in *mexS* (PA14*mexEF*⁺).

Single *mexAB*, *mexXY*, and *mexCD-oprJ* deletion mutants were constructed from PA14 (PA14 Δ AB, PA14 Δ XY, and PA14 Δ CDJ, respectively) using overlapping PCRs and recombination events, according to the protocol of Kaniga et al. (46) modified by Richardot et al. (25). The allelic exchanges were checked by PCR. Sequencing experiments confirmed the deletion of 5,238 bp in gene *mexAB*, 3,750 bp in gene *mexXY*, and 5,705 bp in operon *mexCD-oprJ*. A mutant lacking the entire operon *mexEF-oprN* (PA14 Δ EFN) was already available in the laboratory (23). Double (PA14 Δ AB/EFN, PA14 Δ EFN/XY, and PA14 Δ XY/CDJ), triple (PA14 Δ AB/EFN/XY), and quadruple (PA14 Δ AB/EFN/XY/CDJ) mutants defective in several Mex pumps were successively obtained by using the same approach as described above (Table S1). Likewise, a fragment of 289 bp was deleted from regulatory gene *armR* in wild-type strain PA14 (PA14 Δ armR).

Drug susceptibility testing. The MICs of selected antibiotics were determined by the standard serial 2-fold dilution method in MHA with inoculums of 10⁴ CFU per spot, as recommended by the CLSI (47). Bacterial growth was visually assessed after 18 h of incubation at 37°C. To confirm the results, MIC experiments were performed in triplicate. To evaluate the impact of main cinnamon oil components on antibiotic resistance, drug MICs were determined by using a MHA medium supplemented with subinhibitory concentrations of CNA or CN-OH (128, 256, or 512 $\mu\text{g/ml}$ in 1% DMSO). A negative control with 1% DMSO only was made in parallel. CNA-induced resistance to antibiotics was also investigated by a double-disk antagonism test on MHA, with PA14 and efflux-defective mutants. Disks loaded with 10 mg CNA were deposited onto the surface of seeded MHA plates at an appropriate distance from antibiotic disks (Bio-Rad). The flattening of inhibition zone in the direction of CNA disk was interpreted as CNA-induced resistance to the tested antibiotic.

RT-qPCR experiments. Specific gene expression levels were measured by real-time quantitative PCR (RT-qPCR), as previously described (25). RNA was reverse transcribed with ImProm-II reverse transcriptase as specified by the manufacturer (Promega, Madison, WI). The amounts of specific cDNA were quantified on a Rotor Gene RG6000 instrument (Qiagen, Courtaboeuf, France) by using the QuantiFast SYBR green PCR kit (Qiagen) and primers annealing to the target genes (Table S4). For each strain, the mRNA levels of target genes were normalized to that of housekeeping gene *rpsL* and were expressed as a ratio to the transcript levels of strain PA14. Mean gene expression values were calculated from two independent bacterial cultures and each assayed in duplicate. As shown previously, transcript levels of *mexB* of ≥ 3 -fold, *mexY* of ≥ 5 -fold, and *mexC* and *mexE* of ≥ 20 -fold those of PA14 were considered significantly increased because they were associated with a ≥ 2 -fold higher resistance to the substrates of their respective pumps (25, 48).

Killing experiments with CNA. Strain PA14 and its deletion mutants were rendered bioluminescent by using plasmid pUC18T-MiniTn7-P1-*lux* propagated in *Escherichia coli* strain XL1-Blue, as described by Damron et al. (49). Chromosomal integration of pUC18T-MiniTn7-P1-*lux* (Table S1) was obtained after quadripartite mating as it first requires the mobilization genes of plasmid pRK2013 (from *E. coli* HB101) for transfer and then a transposase encoded by plasmid pTNS3 (from *E. coli* DH5 α) for its insertion into the *P. aeruginosa* genome. Overnight cultures of PA14-*lux* derivatives were diluted into fresh MHB up to an $A_{600\text{nm}}$ of 0.1. The bacteria were cultured aerobically at 37°C for 2.5 h ($A_{600\text{nm}}$ 0.8) prior to the addition of CNA at a final concentration of 700 $\mu\text{g/ml}$. The bioluminescence of strains was monitored over a 5-h time course, in white 96-well assay plates (Corning, NY, USA), with a Synergy H1 microplate reader (Biotek Instruments, Winooski, USA) set at a gain value of 150, read height of 7 mm, and integration time of 1 s. The killing curves presented are based on 3 independent experiments. Previous experiments demonstrated a linear relationship between bioluminescence (log of RLU) and the number of cultivable bacteria between 4 and 9 log₁₀ CFU/ml, with the equation log₁₀ (CFU) = 1.202 \times log₁₀ (RLU) + 1.7843 and with R² of 0.9897.

Metabolite extraction and detection using thin-layer chromatography. Standard working solutions of CNA, cinnamic alcohol, and cinnamic acid were prepared by diluting aliquots of >98% stock solutions in methanol. Overnight bacterial cultures were diluted into 25 ml of fresh MHB and incubated with shaking (250 rpm) at 37°C. When the cultures reached an absorbance of $A_{600\text{nm}}$ of 0.8, CNA was added to a final concentration of 512 $\mu\text{g/ml}$. Aliquots were removed at $t_{0\text{hr}}$, $t_{1\text{hr}}$, $t_{3\text{hr}}$, and $t_{24\text{h}}$ postexposure, and the growth medium was collected by centrifugation and filtration through two filters of 0.45- and 0.2- μm pore size. An organic extraction was repeated 5 times using 0.5 ml dichloromethane (for a total volume of 2.5 ml). The organic fractions were pooled and dried overnight in a chemical hood and were finally redissolved in 50 μl of methanol.

TLC. Organic fractions and standards were diluted (1:1,000) in methanol and filtered on PHENEX PTFE syringe 0.2- μm -pore-size filters (Phenomenex, Le Pecq, France). A fraction of 10 μl was sprayed as 8-mm bands on a TLC plate (Alugram Xtra SIL G UV254; Macherey-Nagel) using an automatic sampler

(ATS4; Camag, Moirans, France) connected to visionCATS Camag TLC software v2.4. The TLC plate was developed in an automatic developing chamber (ADC 2; Camag) with a mobile phase containing cyclohexane:ethyl acetate (7:2) over a 70-mm developing distance. Spots were observed using UV light at 254 nm (CV-415.LS; Uvitech, England).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/AAC.01081-19>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 1.8 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Camil Hadjar and Paulo Juarez for constructing mutant PA14 Δ mexAB, Katy Jeannot for her gift of mutant PA14mexXY+, and Gaetan Mislin (Illkirch, France) for helpful discussions on chemical structures of CNA and CN-OH. We also thank Thilo Köhler (Geneva, Switzerland) for providing reference strain LESB58.

This work was supported by grants from the Region "Bourgogne Franche-Comté" and from the French cystic fibrosis associations "Vaincre la Mucoviscidose" and "Grégory Lemarchal."

REFERENCES

- Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, Van Laethem Y, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A, Tulkens PM, Van Bambeke F. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* 13:560–578. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01681.x>.
- Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson MV. 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:8487–8492. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602138103>.
- Frimmersdorf E, Horatzek S, Pelnikovich A, Wiehlmann L, Schomburg D. 2010. How *Pseudomonas aeruginosa* adapts to various environments: a metabolomic approach. *Environ Microbiol* 12:1734–1747. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02253.x>.
- Breidenstein EBM, de la Fuente-Núñez C, Hancock REW. 2011. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. *Trends Microbiol* 19:419–426. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005>.
- Li XZ, Plésiat P, Nikaido H. 2015. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* 28:337–418. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>.
- Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsumimoto H, Nishino T. 2000. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:3322–3327. <https://doi.org/10.1128/aac.44.12.3322-3327.2000>.
- McCarthy K. 2015. *Pseudomonas aeruginosa*: evolution of antimicrobial resistance and implications for therapy. *Semin Respir Crit Care Med* 36:44–55. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1396907>.
- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outtersen K, Patel J, Cavalieri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N, WHO Pathogens Priority List Working Group. 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 18:318–327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3).
- Mousavi F, Bojko B, Bessonneau V, Pawliszyn J. 2016. Cinnamaldehyde characterization as an antibacterial agent toward *E. coli* metabolic profile using 96-blade solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry. *J Proteome Res* 15:963–975. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00992>.
- Hyldgaard M, Mygind T, Piotrowska R, Foss M, Meyer RL. 2015. Isoeugenol has a non-disruptive detergent-like mechanism of action. *Front Microbiol* 6:754. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00754>.
- Lu M, Dai T, Murray CK, Wu MX. 2018. Bactericidal property of oregano oil against multidrug-resistant clinical isolates. *Front Microbiol* 9:2329. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02329>.
- Bassole IH, Juliani HR. 2012. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 17:3989–4006. <https://doi.org/10.3390/molecules17043989>.
- Papadopoulos CJ, Carson CF, Chang BJ, Riley TV. 2008. Role of the MexAB-OprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* in tolerance to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its monoterpene components terpinen-4-ol, 1,8-cineole, and α -terpineol. *Appl Environ Microbiol* 74:1932–1935. <https://doi.org/10.1128/AEM.02334-07>.
- Fadli M, Chevalier J, Hassani L, Mezrioui NE, Pages JM. 2014. Natural extracts stimulate membrane-associated mechanisms of resistance in Gram-negative bacteria. *Lett Appl Microbiol* 58:472–477. <https://doi.org/10.1111/lam.12216>.
- Moken MC, McMurry LM, Levy SB. 1997. Selection of multiple-antibiotic-resistant (*mar*) mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pine oil: roles of the *mar* and *acrAB* loci. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2770–2772. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.12.2770>.
- Kasper SH, Bonocora RP, Wade JT, Musah RA, Cady NC. 2016. Chemical inhibition of kynureninase reduces *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing and virulence factor expression. *ACS Chem Biol* 11:1106–1117. <https://doi.org/10.1021/acschembio.5b01082>.
- Poole K. 2014. Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: multidrug efflux and more. *Can J Microbiol* 60:783–791. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0666>.
- Chen H, Hu J, Chen PR, Lan L, Li Z, Hicks LM, Dinner AR, He C. 2008. The *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux regulator MexR uses an oxidation-sensing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:13586–13591. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803391105>.
- Fraud S, 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. <https://doi.org/10.1128/AAC.01495-10>.
- Fraud S, Campigotto AJ, Chen Z, 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. <https://doi.org/10.1128/AAC.01072-08>.
- Fetar H, Gilmour C, Klinoski R, Daigle DM, Dean CR, 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. <https://doi.org/10.1128/AAC.00830-10>.
- Fargier E, Mac Aogain M, Mooij MJ, Woods DF, Morrissey JP, Dobson ADW, Adams C, O'Gara F. 2012. MexT functions as a redox-responsive regulator modulating disulfide stress resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 194:3502–3511. <https://doi.org/10.1128/JB.06632-11>.
- Juarez P, Jeannot K, Plésiat P, Llanes C. 2017. Toxic electrophiles induce expression of the multidrug efflux pump MexEF-OprN in *Pseudomonas aeruginosa* through a novel transcriptional regulator, CmrA. *Antimi-*

- rob Agents Chemother 61:e00585-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00585-17>.
24. Hocquet D, Roussel-Delvallez M, Cavallo JD, 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. <https://doi.org/10.1128/AAC.01334-06>.
 25. Richardot C, Juarez P, Jeannot K, Patry I, Plésiat P, Llanes C. 2016. Amino acid substitutions account for most MexS alterations in clinical *nfxC* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 60:2302–2310. <https://doi.org/10.1128/AAC.02622-15>.
 26. Jeannot K, Elsen S, Kohler T, Attrée I, van Delden C, Plésiat P. 2008. Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2455–2462. <https://doi.org/10.1128/AAC.01107-07>.
 27. Köhler T, Epp SF, Curty RK, Pechère JC. 1999. Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 181:6300–6305.
 28. Llanes C, Köhler T, Patry I, Dehecq B, van Delden C, Plésiat P. 2011. Role of the efflux system MexEF-OprN in low level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 55:5676–5684. <https://doi.org/10.1128/AAC.00101-11>.
 29. Poole K. 2000. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2233–2241. <https://doi.org/10.1128/aac.44.9.2233-2241.2000>.
 30. Daigle DM, Cao L, Fraud S, Wilke MS, Pacey A, Klinoski R, Strynadka NC, Dean CR, Poole K. 2007. Protein modulator of multidrug efflux gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189:5441–5451. <https://doi.org/10.1128/JB.00543-07>.
 31. Friedman M. 2017. Chemistry, antimicrobial mechanisms, and antibiotic activities of cinnamaldehyde against pathogenic bacteria in animal feeds and human foods. *J Agric Food Chem* 65:10406–10423. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04344>.
 32. Visvalingam J, Hernandez-Doria JD, Holley RA. 2013. Examination of the genome-wide transcriptional response of *Escherichia coli* O157:H7 to cinnamaldehyde exposure. *Appl Environ Microbiol* 79:942–950. <https://doi.org/10.1128/AEM.02767-12>.
 33. Gill AO, Holley RA. 2004. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Appl Environ Microbiol* 70:5750–5755. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5750-5755.2004>.
 34. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol* 3:12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>.
 35. Cox SD, Markham JL. 2007. Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds. *J Appl Microbiol* 103:930–936. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03353.x>.
 36. Vasconcelos NG, Croda J, Simionatto S. 2018. Antibacterial mechanisms of cinnamon and its constituents: a review. *Microb Pathog* 120:198–203. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.036>.
 37. He TF, Zhang ZH, Zeng XA, Wang LH, Brennan CS. 2018. Determination of membrane disruption and genomic DNA binding of cinnamaldehyde to *Escherichia coli* by use of microbiological and spectroscopic techniques. *J Photochem Photobiol B* 178:623–630. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.11.015>.
 38. Farisa Banu S, Rubini D, Rakshitaa S, Chandrasekar K, Murugan R, Wilson A, Gowrishankar S, Pandian SK, Nithyanand P. 2017. Antivirulent properties of underexplored *Cinnamomum tamala* essential oil and its synergistic effects with DNase against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms—an *in vitro* study. *Front Microbiol* 8:1144. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01144>.
 39. Utchariyakiat I, Surasmo S, Jaturanpinyo M, Khuntayaporn P, Chomnawang MT. 2016. Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. *BMC Complement Altern Med* 16:158. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1134-9>.
 40. Li XZ, Barre N, Poole K. 2000. Influence of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-OprJ and MexE-MexF-OprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 46:885–893. <https://doi.org/10.1093/jac/46.6.885>.
 41. Zhou W, Bi H, Zhuang Y, He Q, Yin H, Liu T, Ma Y. 2017. Production of cinnamyl alcohol glucoside from glucose in *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem* 65:2129–2135. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00076>.
 42. Radulovic NS, Blagojevic PD, Stojanovic-Radic ZZ, Stojanovic NM. 2013. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Curr Med Chem* 20:932–952. <https://doi.org/10.2174/0929867311320070008>.
 43. Morita Y, Murata T, Mima T, Shiota S, Kuroda T, Mizushima T, Gotoh N, Nishino T, Tsuchiya T. 2003. Induction of *mexCD-oprJ* operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Antimicrob Chemother* 51:991–994. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg173>.
 44. Ravirala RS, Barabote RD, Wheeler DM, Reverchon S, Tatum O, Malouf J, Liu H, Pritchard L, Hedley PE, Birch PR, Toth IK, Payton P, San Francisco MJ. 2007. Efflux pump gene expression in *Erwinia chrysanthemi* is induced by exposure to phenolic acids. *Mol Plant Microbe Interact* 20:313–320. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-3-0313>.
 45. Starr LM, Fruci M, Poole K. 2012. Pentachlorophenol induction of the *Pseudomonas aeruginosa mexAB-oprM* efflux operon: involvement of repressors NalC and MexR and the antirepressor ArmR. *PLoS One* 7:e32684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032684>.
 46. Kaniga K, Delor I, Cornelis GR. 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. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(91\)90599-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(91)90599-7).
 47. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2015. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 10th ed, vol M07-A10. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne PA.
 48. Llanes C, Pourcel C, Richardot C, Plésiat P, Fichant G, Cavallo J-D, Merens A, GERPA Study Group. 2013. Diversity of beta-lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 68:1763–1771. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt115>.
 49. Damron FH, McKenney ES, Barbier M, Liechti GW, Schweizer HP, Goldberg JB. 2013. Construction of mobilizable mini-Tn7 vectors for bioluminescent detection of gram-negative bacteria and single-copy promoter *lux* reporter analysis. *Appl Environ Microbiol* 79:4149–4153. <https://doi.org/10.1128/AEM.00640-13>.
 50. Poole K, Tetro K, Zhao Q, Neshat S, Heinrichs DE, Bianco N. 1996. Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob Agents Chemother* 40:2021–2028. <https://doi.org/10.1128/AAC.40.9.2021>.
 51. Cao L, Srikumar R, Poole K. 2004. MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of the *nalC* gene encoding a repressor of PA3720-PA3719. *Mol Microbiol* 53:1423–1436. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04210.x>.
 52. Morita Y, Cao L, Gould VC, Avison MB, Poole K. 2006. *nalD* encodes a second repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 188:8649–8654. <https://doi.org/10.1128/JB.01342-06>.
 53. Balasubramanian D, Schnepfer L, Merighi M, Smith R, Narasimhan G, Lory S, Mathee K. 2012. The regulatory repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -lactamase regulator AmpR includes virulence genes. *PLoS One* 7:e34067. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034067>.
 54. Maseda H, Sawada I, Saito K, Uchiyama H, Nakae T, Nomura N. 2004. Enhancement of the *mexAB-oprM* efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the *mexEF-oprN* efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1320–1328. <https://doi.org/10.1128/aac.48.4.1320-1328.2004>.
 55. Heacock-Kang Y, Sun Z, Zarzycki-Siek J, Poonsuk K, McMillan IA, Chuanhuen R, Hoang TT. 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:e01459-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01459-18>.
 56. Tian ZX, Yi XX, Cho A, O'Gara F, Wang YP. 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005932>.

TABLE S1 Strains and plasmids used in the study

Strains	Description	References
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PA14	Wild type reference strain, susceptible to antibiotics	(1)
PA14ΔAB	PA14-derived <i>mexAB</i> deletion mutant	This study
PA14ΔEFN	PA14-derived <i>mexEF-oprN</i> deletion mutant	(2)
PA14ΔXY	PA14-derived <i>mexXY</i> deletion mutant	This study
PA14ΔCDJ	PA14-derived <i>mexCD-oprJ</i> deletion mutant	This study
PA14ΔAB/EFN	PA14-derived <i>mexAB</i> and <i>mexEF-oprN</i> deletion mutant	This study
PA14ΔEFN/XY	PA14-derived <i>mexEF-oprN</i> and <i>mexXY</i> deletion mutant	This study
PA14ΔXY/CDJ	PA14-derived <i>mexXY</i> and <i>mexCD-oprJ</i> deletion mutant	This study
PA14ΔAB/EFN/XY	PA14-derived <i>mexAB</i> , <i>mexEF-oprN</i> and <i>mexXY</i> deletion mutant	This study
PA14ΔAB/EFN/XY/CDJ	PA14-derived <i>mexAB</i> , <i>mexEF-oprN</i> , <i>mexXY</i> and <i>mexCD-oprJ</i> deletion mutant	This study
PA14- <i>lux</i>	Bioluminescent strain PA14	This study
PA14ΔAB- <i>lux</i>	Bioluminescent strain PA14ΔAB	This study
PA14ΔEFN- <i>lux</i>	Bioluminescent strain PA14ΔEFN	This study
PA14ΔXY- <i>lux</i>	Bioluminescent strain PA14ΔXY	This study
PA14ΔCDJ- <i>lux</i>	Bioluminescent strain PA14ΔCDJ	This study
PA14ΔAB/EFN- <i>lux</i>	Bioluminescent strain PA14ΔAB/EFN	This study
PA14ΔEFN/XY- <i>lux</i>	Bioluminescent strain PA14ΔEFN/XY	This study
PA14ΔAB/EFN/XY/CDJ- <i>lux</i>	Bioluminescent strain PA14ΔAB/EFN/XY/CDJ	This study
PA14 <i>mexAB</i> +	PA14-derived mutant overproducing MexAB-OprM	This study
PA14 <i>mexEF</i> +	PA14-derived mutant overproducing MexEF-OprN	(3)
PA14 <i>mexXY</i> +	PA14-derived mutant overproducing MexXY-OprM	This study
PA14 <i>mexCD</i> +	PA14-derived mutant overproducing MexCD-OprJ	This study
PAO1	Clinical strain isolated from a wound (Melbourne)	B. Holloway
LESB58	Clinical strain isolated from cystic fibrosis patient (Liverpool)	C. Winstanley
1393	Environmental strain isolated from surface water (France)	This study
1349	Environmental strain isolated from surface water (France)	This study
1429	Environmental strain isolated from surface water (France)	This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ</i>	Invitrogen
CC118λ <i>pir</i>	CC118 lysogenic for phage λ <i>pir</i>	(4)
HB101	<i>subE44 subF58 hsdS3(r_B⁻ m_B⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galk2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	(5)
DH5α(pTNS3)	Strain DH5α containing helper plasmid pTNS3 for chromosomal insertions (encoding the Tn7 site-specific transposition pathway, Amp ^R)	(6)
HB101(pRK2013)	Strain HB101 containing helper plasmid pRK2013 for conjugation (<i>mob1, tra1, colE1, Kan^R</i>)	(7)
CC118λ <i>pir</i> (pKNG101)	Strain CC118λ <i>pir</i> containing suicide vector pKNG101 (<i>oriR6K, sacB, Str^R</i>)	(8)
XL1-Blue(pUC18T-MiniTn7-P1- <i>lux</i>)	Strain XL1-Blue containing self-proficient integration vector pUC18T-MiniTn7- <i>luxCDABE</i> (viral promoter P1, Amp ^R , Gen ^R)	(9)

Amp^R, Kan^R, Str^R, Gen^R: selective plasmid markers conferring resistance to ampicillin, kanamycin, streptomycin and gentamicin, respectively.

TABLE S2 Susceptibility of PA14 derived mutants to CNA (cinnamaldehyde) and CN-OH (cinnamic alcohol)

Stains	MIC of CNA ($\mu\text{g/ml}$)	MIC of CN-OH ($\mu\text{g/ml}$)
PA14	1,024	2,048
Efflux-deficient mutants of PA14		
PA14 Δ AB	<i>512</i>	<i>1,024</i>
PA14 Δ EFN	1,024	2,048
PA14 Δ XY	1,024	2,048
PA14 Δ CDJ	1,024	2,048
PA14 Δ EFN/XY	1,024	2,048
PA14 Δ AB/EFN	<i>256</i>	<i>1,024</i>
PA14 Δ XY/CDJ	1,024	2,048
PA14 Δ AB/EFN/XY	<i>256</i>	<i>1,024</i>
PA14 Δ AB/EFN/XY/CDJ	<i>256</i>	<i>1,024</i>
Mex pump overproducing mutants of PA14		
PA14 <i>mexAB+</i>	1,024	2,048
PA14 <i>mexEF+</i>	1,024	2,048
PA14 <i>mexXY+</i>	1,024	2,048
PA14 <i>mexCD+</i>	<i>512</i>	<i>512</i>

MICs lower than that for reference strain PA14 are indicated in *italic* to highlight the role of efflux in CNA or CN-OH tolerance.

TABLE S3 Impact of cinnamic alcohol (CN-OH) on antibiotic resistance and efflux gene transcription in strain PA14

CN-OH ($\mu\text{g/ml}$)	Minimal Inhibitory Concentrations ($\mu\text{g/ml}$) ^a					Efflux genes expression levels 15 min after treatment ^b			
	TIC	CAZ	MEM	CIP	GEN	<i>mexB</i>	<i>mexC</i>	<i>mexE</i>	<i>mexY</i>
0	16	1	0.5	0.125	1	1.0	1.2	0.9	0.9
256	64	1	0.5	0.125	1	6.4	0.5	3.5	1.6
512	64	2	1	0.25	1	9.4	0.7	9.4	1.9

^a TIC: ticarcillin, CAZ: ceftazidime, MEM: meropenem, CIP: ciprofloxacin are substrates of MexAB-OprM. GEN: gentamicin is a substrate of MexXY/OprM.

^b expressed at a ratio to the expression level at t_0 .

Values in bold face highlight a significant increase compared with the negative control not exposed to CN-OH.

TABLE S4 Primers used for gene inactivation, RT-qPCR and sequencing experiments

Primer	Sequence (5' → 3')	T _m (°C)	Source
Genes inactivation (complementary regions are in red and green colors)			
<i>mexAB</i>			
iPA14 <i>mexAB</i> -1	GGCGTTTTTCATTGTGCTTC	59	Smaltis
iPA14 <i>mexAB</i> -2	ACCGATCGTTGCATAGCGTTGTCCTCA	72	
iPA14 <i>mexAB</i> -3	ATGCAACGATCGGTACCGGCGTGAT	73	Smaltis
iPA14 <i>mexAB</i> -4	GTAGCTGCGCTGGGTACG	59	
<i>mexXY</i>			
iPA14 <i>mexXY</i> -1	CCAGCAAGAGGTAGGGAGAA	62	This study
iPA14 <i>mexXY</i> -2	AGGGATAGCCGGCGGACAGTAGCATATAA	59	
iPA14 <i>mexXY</i> -3	TGTCGCGCCGGCTATCCCTCGTTCAACCT	62	This study
iPA14 <i>mexXY</i> -4	AACAGCGGTACCAGGAACAC	62	
<i>mexCD-oprJ</i>			
iPA14 <i>mexCDJ</i> -1	ACCAGGAATACCAGCAGCTC	60	This study
iPA14 <i>mexCDJ</i> -2	GCTCCGTTCTATTGCACGCAAATCA	60	
iPA14 <i>mexCDJ</i> -3	ATAGGAAACGGAGCCTGGTGGTACAT	60	This study
iPA14 <i>mexCDJ</i> -4	CAACCCTGAACCGTCATTG	60	
<i>armR</i>			
iPA14 <i>armR</i> -1	CTGTTTTGGCAAGCACTTCC	60	This study
iPA14 <i>armR</i> -2	TCTGATAGCGTACCAGTTCATCCCCGTC	59	
iPA14 <i>armR</i> -3	ACTGGTGACGCTATCAGAAATCCGCGCAGA	60	This study
iPA14 <i>armR</i> -4	GATTCCGCCTGCCATGAAG	60	
RT-qPCR			
<i>mexR</i> -F	GAACTACCCCGTGAATCCCG	60	This study
<i>mexR</i> -R	CGGACCAGGTTTCTTCCCTC	60	
<i>cpxR</i> -F	TTGAGCAGTTCAGGCGC	60	This study
<i>cpxR</i> -R	GCTGTTGATCGACGATGACC	60	
<i>ampR</i> -F	CTGTGTGACTCCTTCGACCG	60	This study
<i>ampR</i> -R	GGTTGTTGTGGGTGGACAGG	60	
<i>nalD</i> -F	AGATGCTCAACCAGGTACGC	60	This study
<i>nalD</i> -R	GTTCTCGGTGAATTCGCAAC	60	
<i>nalC</i> -F	CTTCCTCACCAGCCTGCTC	60	This study
<i>nalC</i> -R	ATCTCGAGAACTGGCAGGC	60	
PA3720-F	GATGCCTTTCCCTGGTCC	60	This study
PA3720-R	GCTGGCGATTTTCCTTGAGC	60	
<i>armR</i> -F	CAACAAACCGTCCCGCACCGA	60	This study
<i>armR</i> -R	TCAGTAGAAGTGCTCGCCGTAGAGG	60	
<i>mexB1</i>	ATCCGCCAGACCATCGCCA	60	(11)
<i>mexB2</i>	CATCACCAGGAACACGAGGAGG	60	
<i>mexY1A</i>	TTACCTCCTCCAGCGGC	60	(12)
<i>mexY1B</i>	GTGAGGCGCGGTTGTG	60	
<i>mexC1</i>	TGCGGATTTACCCAGACC	60	(13)
<i>mexC2</i>	GGCCAAGGTGCCTTTCTTCA	60	
<i>mexE4</i>	CCAGGACCAGCACGAACT	60	(13)
<i>mexE5</i>	CGACAACGCCAAGGGCGAGTTCACC	60	
<i>oprD1</i>	ACCAACCTCGAAGCCAAGTA	60	(14)
<i>oprD2</i>	ACAGGATCGACAGCGGATAG	60	
<i>rpsL3</i>	GCAACTATCAACCAGCTGGTG	60	(13)
<i>rpsL5</i>	GCTGTGCTCTTGCAGGTTGTG	60	
Sanger sequencing			
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC	60	Eurogentech
M13-F	CTGGCCGTCGTTTTA	60	
<i>mexZ1</i> -PA14	CAAGGTAGGCGGAGAAAACG	62	This study

<i>mexZ2</i> -PA14	CATTGGATGTGCATGGGTGT	60	
<i>nfxB1</i> -PA14	CAAATCAGCCATGACACACC	60	This study
<i>nfxB2</i> -PA14	CATCAACAGGACCAGCAACA	60	
MexSch1	GAACAGGATCAGCAGGTTCA	55	
MexSch2	CCACCGGGGTGAGTACCT	58	
MexSch3	GTCTCGGCTTCGAACTGG	56	(15)
MexSch4	GGTGAAATCCATCAGGCAGT	55	
MexSch5	GCAAGCTGGTGCTGTATGG	57	
MexSch6	GAAGGCGACTTCGTCTGG	56	

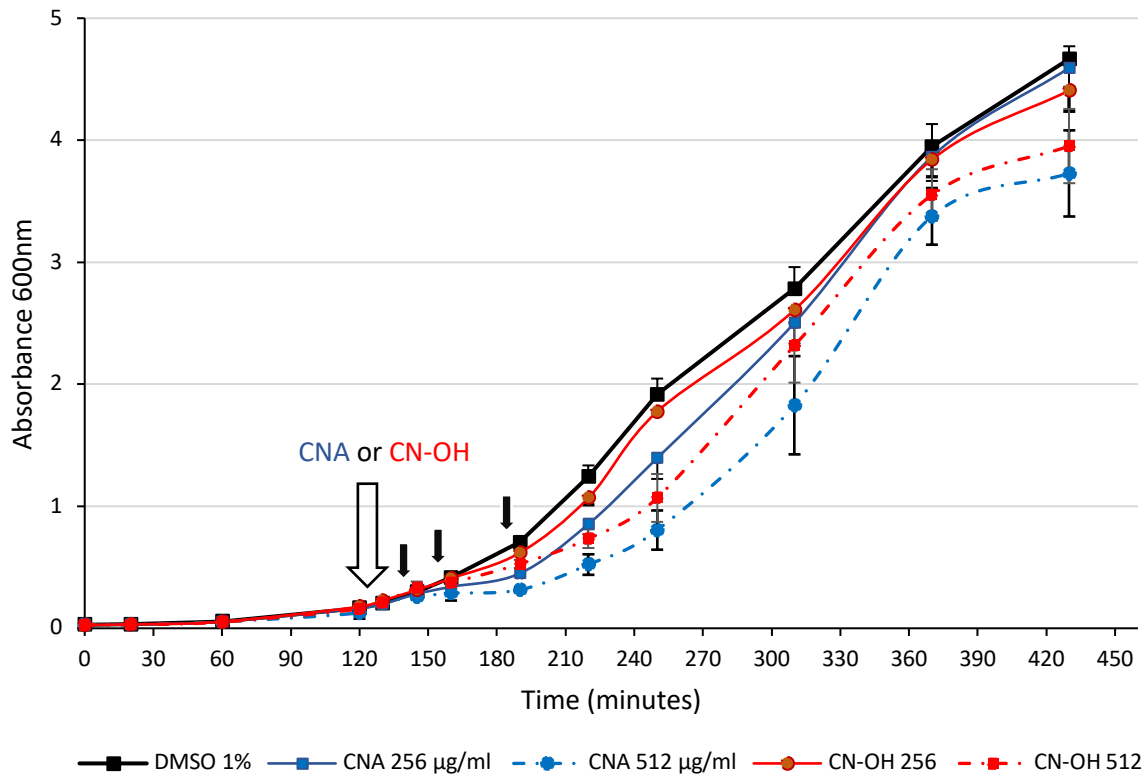


FIG S1 Growth of strain PA14 under the conditions used for RT-qPCR experiments. An initial inoculum of $A_{600nm} = 0.02$ was cultured until $A_{600nm} = 0.2$. After addition of CNA or CN-OH (256 or 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$; white arrow), the culture was monitored during 5h in parallel with a negative control containing 1% DMSO. Samples were collected at 15-, 30- and 60-min post-exposure (black arrows) for RNA extraction.

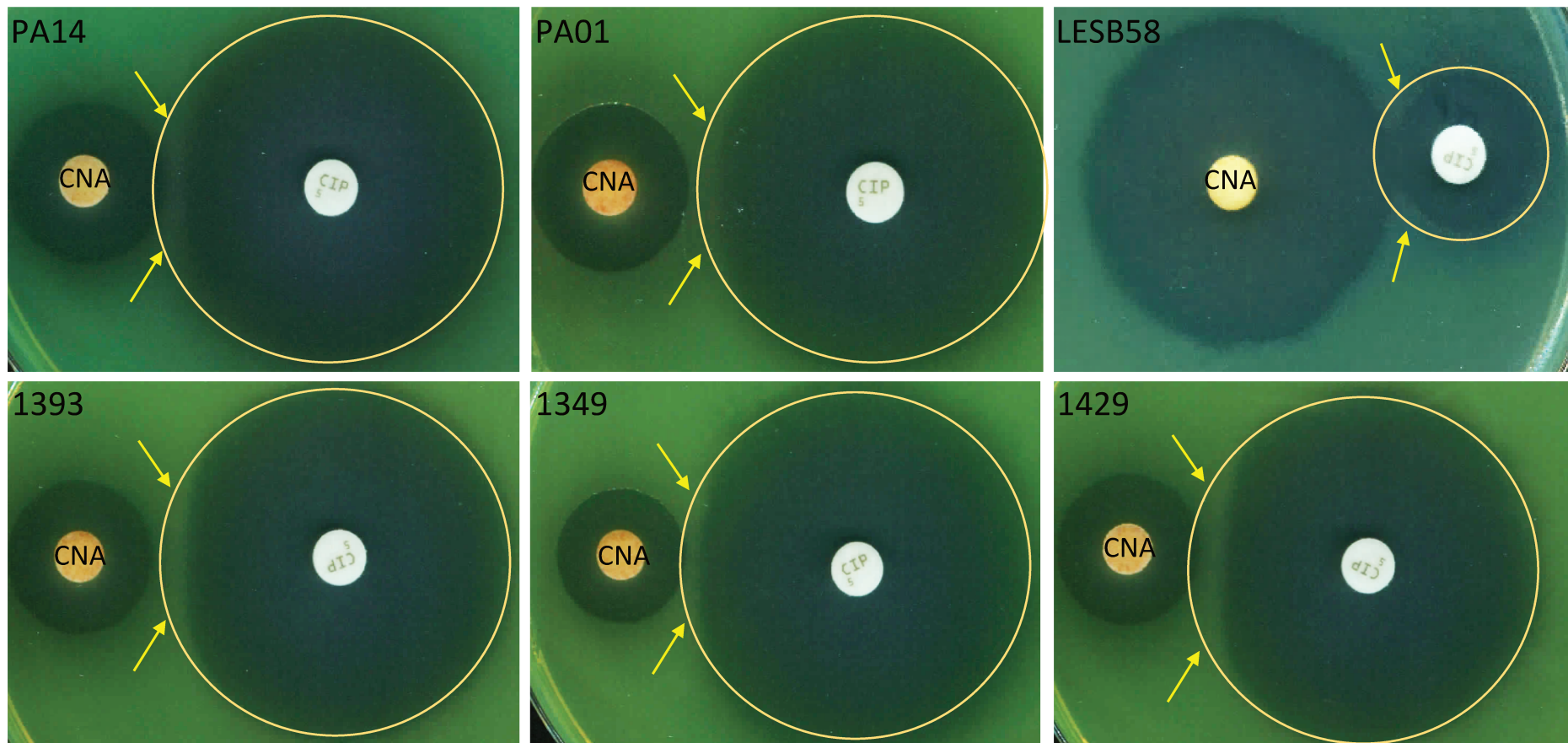


FIG S2 Induction of ciprofloxacin resistance by CNA assessed on three clinical reference strains (PA14, PA01 and LESB58), and three environmental strains (1393, 1349 and 1429). A double-disk antagonism test using paper disks loaded with 10 mg CNA and 5 µg ciprofloxacin (a substrate of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN and MexXY/OprM), respectively shows a flattening of the inhibition zone around the ciprofloxacin disk facing the CNA disk (arrows). The high susceptibility of LESB58 to CNA is possibly due to its inability to produce (i) the MexAB-OprM pump because of a mutation in the Ribosome Binding Site, 8-bp ahead of the ATG of *mexA* (AGGG instead of AGGA) and (ii) the MexEF-OprN pump due to inactivation of gene *mexF* by a E₂₄₆Stop mutation; resistance to ciprofloxacin is due to a T83I substitution in GyrA (www.pseudomonas.com).

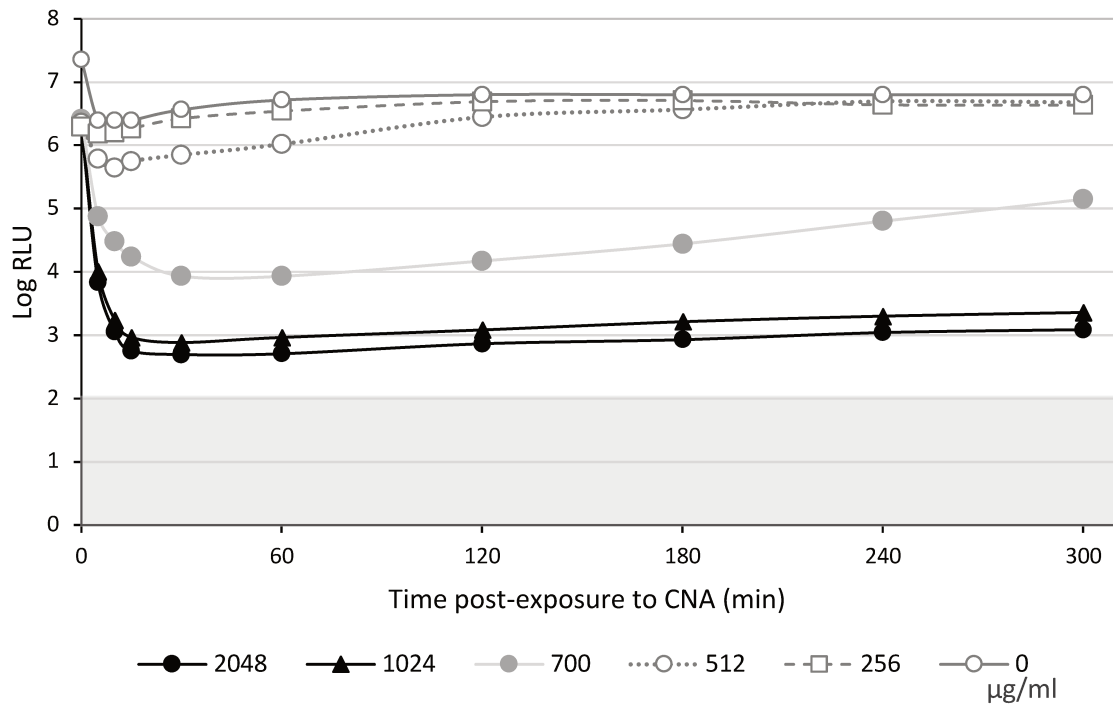


FIG S3 Bactericidal effect of CNA on PA14. Bioluminescent strain PA14-*lux* was cultured to mid-log phase and then challenged with 0, 256, 512, 700, 1,024 or 2,048 µg/ml of CNA. Bioluminescence (Log RLU), used as an indicator of cell survival, was recorded during 5 h. A bioluminescence threshold was established with sterile MHB (shaded zone).

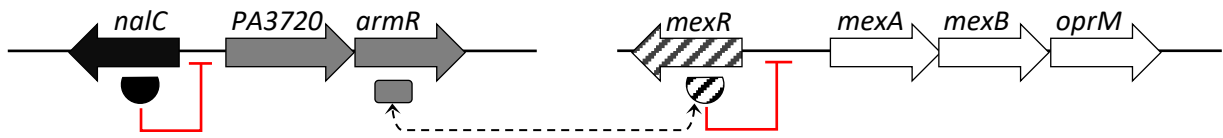


FIG S4 In the absence of inducer (e.g., CNA), repressor NalC prevents production of anti-repressor ArmR, thus allowing MexR to negatively control operon *mexAB-oprM* expression (16).

REFERENCES

1. Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, Lee DG, Drenkard E, Wu G, Villanueva J, Wei T, Ausubel FM. 2006. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:2833-8.
2. Juarez P, Jeannot K, Plésiat P, 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(8). pii: e00585-17. doi: 10.1128/AAC.00585-17.
3. Llanes C, Köhler T, Patry I, Dehecq B, van Delden C, Plésiat P. 2011. Role of the efflux system MexEF-OprN in low level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 55:5676-84.
4. Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 172:6557-67.
5. Lacks S, Greenberg B. 1977. Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *J Mol Biol* 114:153-68.
6. Choi KH, Mima T, Casart Y, Rholi D, Kumar A, Beacham IR, Schweizer HP. 2008. Genetic tools for select-agent-compliant manipulation of *Burkholderia pseudomallei*. *Appl Environ Microbiol* 74:1064-75.
7. Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR. 1980. Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:7347-51.
8. Kaniga K, Delor I, Cornelis GR. 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 109:137-41.
9. Damron FH, McKenney ES, Barbier M, Liechti GW, Schweizer HP, Goldberg JB. 2013. Construction of mobilizable mini-Tn7 vectors for bioluminescent detection of gram-negative bacteria and single-copy promoter *lux* reporter analysis. *Appl Environ Microbiol* 79:4149-53.
10. Jeannot K, Elsen S, Kohler T, Attree I, van Delden C, Plésiat P. 2008. Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2455-62.
11. Hocquet D, Nordmann P, El Garch F, Cabanne L, Plésiat P. 2006. Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1347-51.
12. Jeannot K, Sobel ML, El Garch F, Poole K, Plésiat P. 2005. Induction of the MexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction. *J Bacteriol* 187:5341-6.
13. Dumas JL, van Delden C, Perron K, Köhler T. 2006. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol Lett* 254:217-25.
14. Fournier D, Richardot C, Muller E, Robert-Nicoud M, Llanes C, Plésiat P, Jeannot K. 2013. Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 68:1772-80.
15. Richardot C, Juarez P, Jeannot K, Patry I, Plésiat P, Llanes C. 2016. Amino acid substitutions account for most MexS alterations in clinical *nfxC* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 60:2302-10.
16. Cao L, Srikumar R, Poole K. 2004. MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of the *nalC* gene encoding a repressor of PA3720-PA3719. *Mol Microbiol* 53:1423-36.

3.1.3 Résultats complémentaires

Le CNA étant un composé parmi d'autres de l'HE de cannelle, sa consommation sous forme de produit purifié est peu probable. Nous avons donc réalisé des tests d'induction avec des HEs de cannelle d'origines différentes et qui contiennent entre 52 et 80% de CNA. L'antagonisme observé entre le CNA et la ticarcilline, substrat de MexAB-OprM, est maintenu avec les différents échantillons (**Figure 20**).

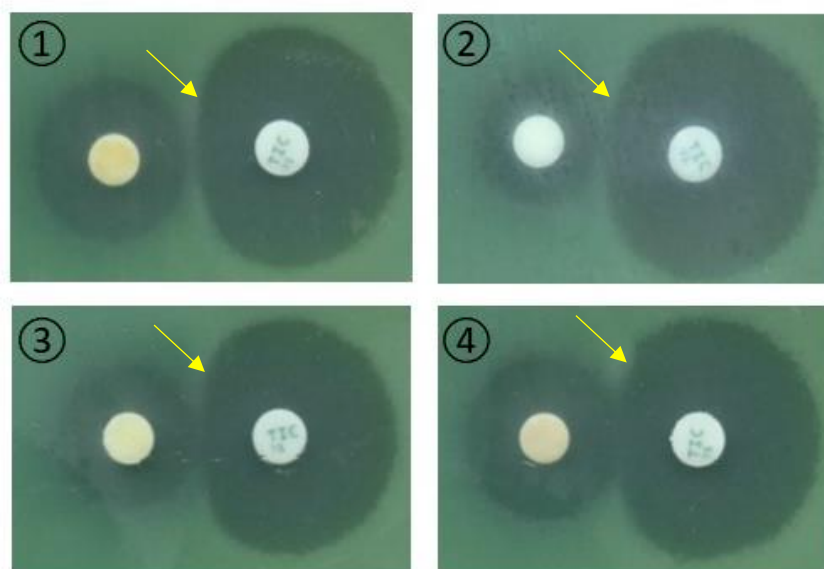


Figure 20 : Induction de la résistance à la ticarcilline (TIC), visible par l'aplatissement du diamètre d'inhibition (flèche jaune), au regard de disques imbibés (5µl, à gauche) de différentes HEs de cannelle : (1) Cannelle de Chine (*Cinnamomum cassia*) de chez Pranarôm [80,98% de CNA], (2) Cannelle de Ceylan (*C. verum* ou *C. zeylanicum*) de chez Pranarôm [64,38% de CNA], (3) Cannelle de Ceylan BIO de chez Golgemma [52,82% de CNA], en comparaison à un disque imbibé de CNA (4). Don de Jean-Marc Bouvier, Pharmacie des Combes, Damprichard (Doubs).

Notre travail sur le CNA a mis en évidence un lien possible entre la structure chimique des molécules inductrices et la réponse qu'elles provoquent chez *P. aeruginosa*. En 2012, Starr avait déjà observé la capacité inductrice des pentachlorophénols sur MexAB-OprM *via* NaIC (Starr *et al.*, 2012). L'année précédente, la même observation avait été faite chez *P. syringae* dont la pompe MexAB-OprM est induite par les flavonoïdes, une réponse médiée par PmeR, un répresseur de la famille TetR (Vargas *et al.*, 2011). Nous avons constaté au laboratoire, que les dérivés du CNA tels que les acides cinnamique et hydrocinnamique ou même l'alcool cinnamique, tous porteurs d'un groupement phényle, provoquent le même antagonisme vis-à-vis des substrats de la pompe MexAB-OprM (résultats non montrés).

Le pouvoir inducteur du cycle phényle ou phénol, présent dans la structure de nombreux composants d'HEs (carvacrol, thymol, créosol, eugénol, vanilline) (Ríos 2016), a d'ailleurs été testé en utilisant des fusions transcriptionnelles luminescentes destinées à objectiver

l'expression de *mexAB-oprM* et de l'opéron *PA3720-armR* (**Figure 21**). Pour cela, nous avons construit deux plasmides recombinants à partir du miniCTX-*lux*. Dans le premier, le gène *mexR* ainsi que la région promotrice de l'opéron *mexAB-oprM* ont été insérés en amont de l'opéron *luxCDABE*. Dans l'autre, la région génomique contenant le gène *nalC* et l'opéron *armR-PA3720* a été clonée en amont de *luxCDABE*. Les deux fusions transcriptionnelles ont été transférées dans PA14, et insérées dans le chromosome en une copie unique. La luminescence des souches recombinantes ainsi obtenues (PA14::*mexABM-lux* et PA14::*PA3720/armR-lux*), permettant respectivement de détecter l'activation de la région promotrice de *mexAB-oprM* ou celle de *armR-PA3720*, a été mesurée en temps réel ou après 18h de contact avec du CNA. Notons que si l'induction passe par NalC, elle sera finalement détectée par les deux constructions, alors que si l'induction passe par la région intergénique *mexR-mexA*, elle ne sera détectée que par PA14::*mexABM-lux*. Ces deux fusions permettent donc d'étudier les voies d'activation de la pompe MexAB-*OprM*.

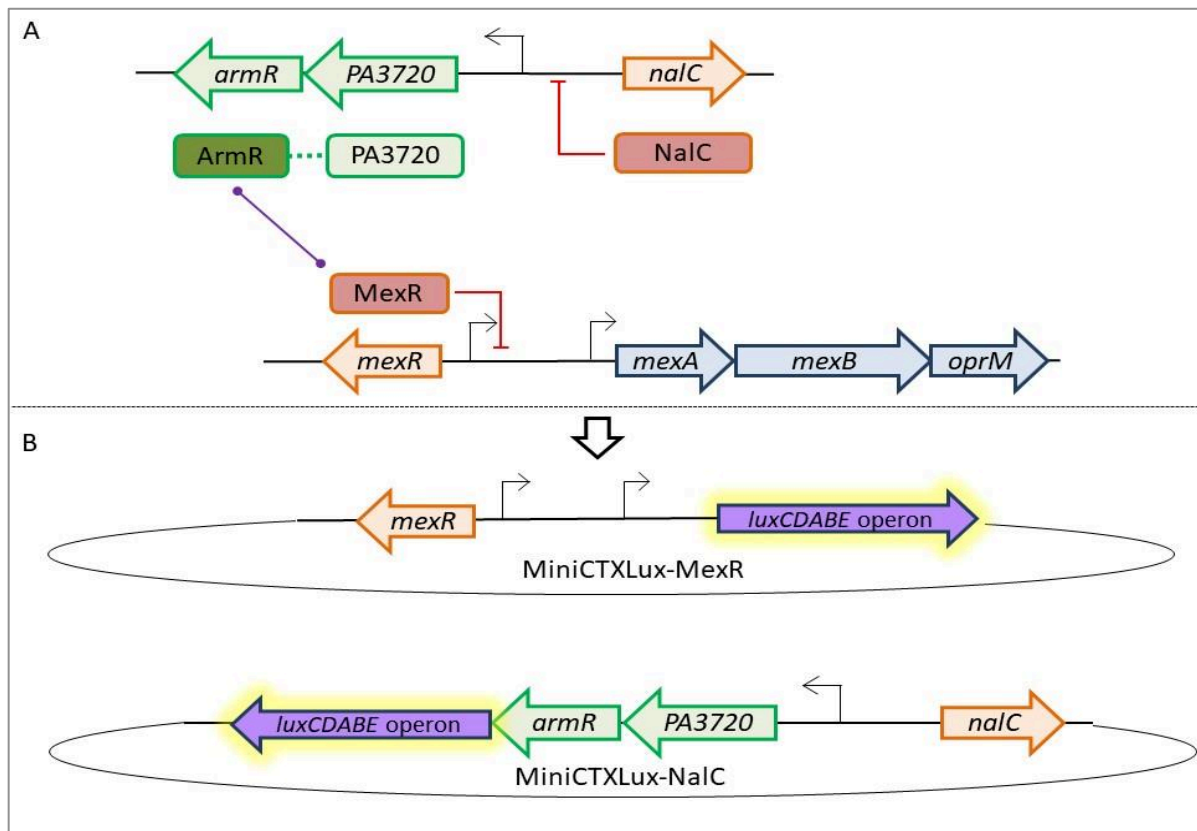


Figure 21 : Outils luminescents rapporteurs de la surexpression de *mexAB-oprM*. (A) : régulation de l'expression de *mexAB-oprM* par les répresseurs *NalC* et *MexR*. (B) : Schéma des deux plasmides rapporteurs permettant de mesurer l'activité du promoteur de *mexAB-oprM* liée à *MexR* et celle du promoteur de *PA3720-armR* liée à *NalC*.

Pour tester la sensibilité des deux outils luminescents, nous avons mesuré le pouvoir inducteur d'une molécule possédant une structure phénolique : la vanilline (**Figure 22**). Comme attendu, l'exposition des souches recombinantes à la vanilline entraîne une augmentation de la luminescence du milieu 3-fois (PA14::*mexABM-lux*) à 5-fois (PA14::*PA3720/armR-lux*)

supérieure à celle des souches non traitées, ceci dès les 15 premières minutes de contact.

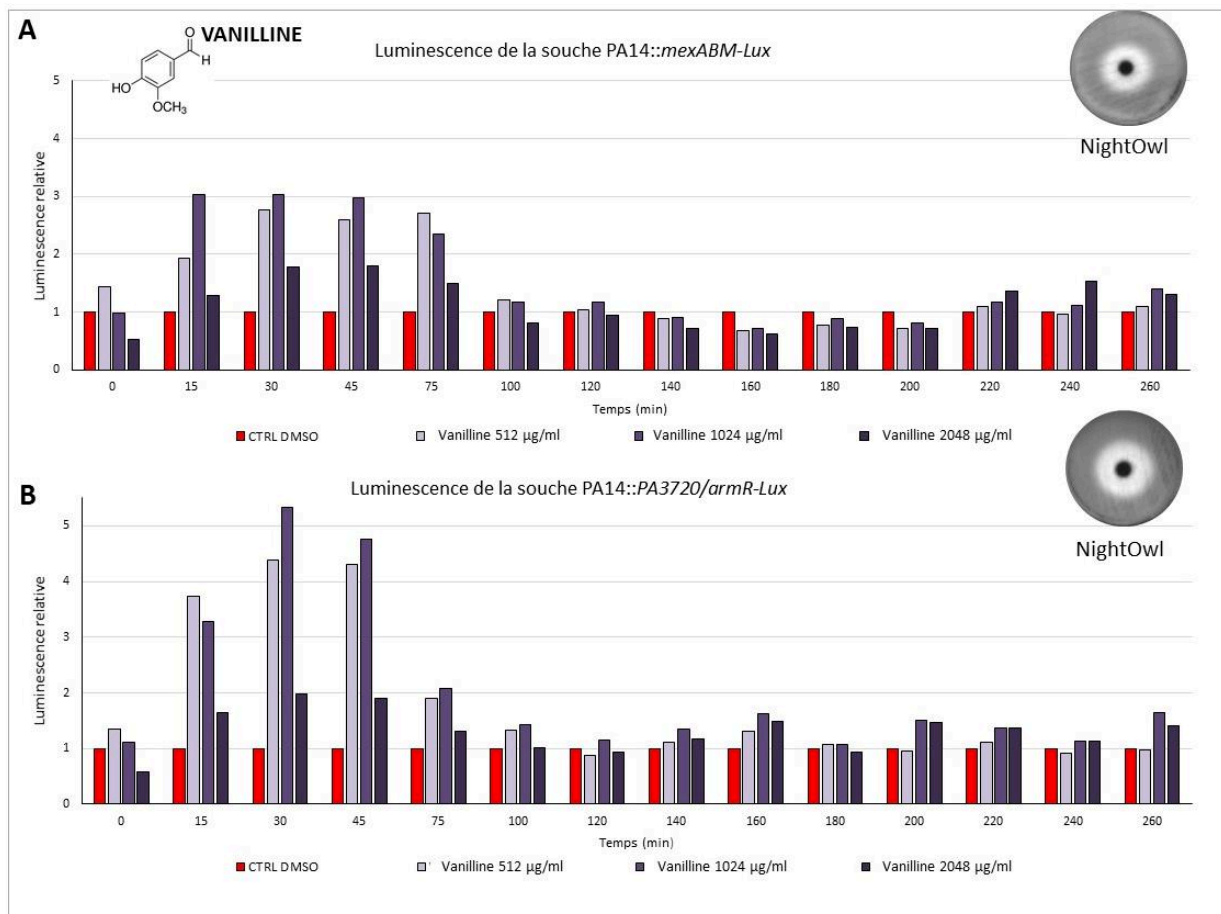


Figure 22 : Mise en évidence du pouvoir inducteur de la vanilline sur MexAB-OprM par les voies (A) MexR (PA14::mexABM-lux) et (B) NalC (PA14::PA3720/armR-lux). Les histogrammes représentent la luminescence émise en temps réel après contact avec la vanilline (t_0), normalisée par rapport au contrôle DMSO (établi à 1). La luminescence a également été établie en point final grâce à une caméra NightOwl sur des boîtes de Petri ensemencées en nappe avec les souches rapportrices contenant un disque de vanilline au centre. La zone blanche correspond à l'émission de luminescence.

Afin de contrôler la spécificité des outils luminescents, nous avons testé le pouvoir inducteur d'une molécule dépourvue de structure phényl ou phénol : le citral (Figure 23). Nous constatons l'absence d'induction de MexAB-OprM avec cette molécule utilisée à des concentrations subinhibitrices, ni dans les premières heures de contact, ni après 18h, un résultat qui sera confirmé dans la suite de ce travail (chapitre 3.3).

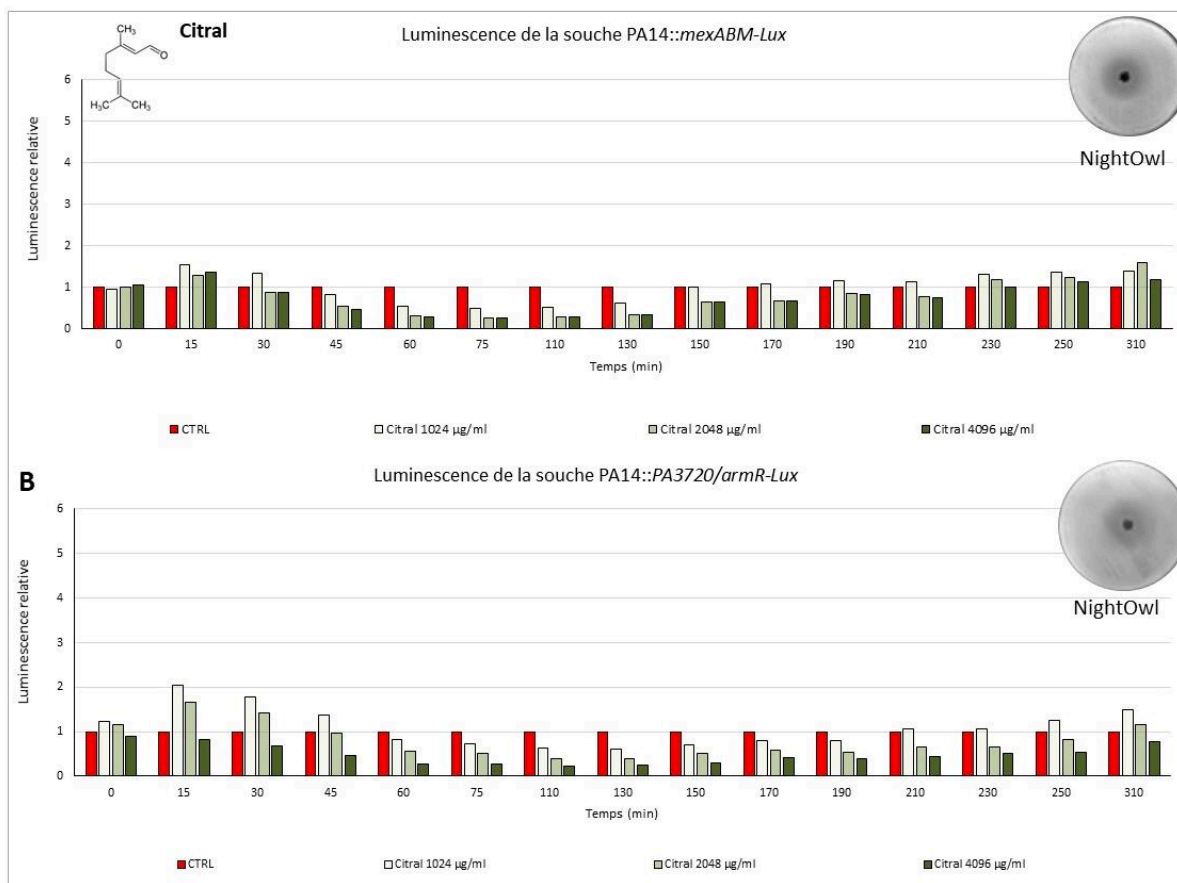


Figure 23 : Contrôle de luminescence des souches rapportrices de l'activité de MexAB-OprM par les voies **(A)** MexR (PA14::mexABM-lux) et **(B)** NalC (PA14::PA3720/armR-lux), en présence de citral. Les histogrammes représentent la luminescence émise en temps réel après contact avec le citral (t_0), normalisée par rapport au contrôle CTRL (établi à 1). La luminescence a également été établie en point final grâce à une caméra NightOwl sur des boîtes de Petri ensemencées en nappe avec les souches rapportrices contenant un disque de citral au centre. L'absence de halo clair sur la boîte indique une absence d'induction.

Ces deux contrôles réalisés, nous avons pu tester une série de composés volatils issus d'HEs de structures différentes. Les résultats obtenus ont été confirmés par la mesure de l'expression du gène *mexB* par RT-qPCR et la détermination des CMI des antibiotiques substrats de la pompe MexAB-OprM, chez des bactéries exposées à ces molécules. Comme l'indique le **tableau 6**, seuls les produits phénoliques testés sont capables de provoquer l'activation de la pompe et d'entraîner l'augmentation de la résistance de la souche PA14 aux substrats de celle-ci (ticarcilline et aztréonam).

Tableau 6 : Impact des molécules extraites d'HEs sur PA14 (utilisées à des concentrations sub-inhibitrices)

Molécules testées	Induction des opérons (RLU/A ₆₀₀ , t=10min)		Expression relative de <i>mexB</i> (t=10min)	CMI (µg/mL)	
	<i>mexABM-lux</i>	<i>armR/PA3720-lux</i>		TIC	ATM
Contrôles					
DMSO 1%	1	1	1	32	4
CNA	2,6	3	5,3	128	128
Citral	1,5	1,7	0,7	32	4
Molécules phénoliques					
Vanilline	3	5,3	5,5	128	16
Eugénol	4,9	4,9	2,6	64	16
CN-OH	2,2	3	1,6	128	8
Créosol	3	3,4	3,3	128	16
Carvacrol	2,1	2,9	2,1	64	8
Molécules non-phénoliques					
Citronellol	1,5	2,1	1	32	4
Citronellal	2	2,7	1	32	4
Géraniol	1,5	1,7	1,4	32	4

En caractère gras, les valeurs significativement augmentées (>2 pour *mexABM-lux* et >3 pour *armR/PA3720-lux*). CNA : cinnamaldéhyde ; CN-OH : alcool cinnamique.

Plus loin, dans le chapitre 3.3, nous verrons que la fonction aldéhyde du CNA et d'autres molécules aldéhydes extraites ou non d'HEs active d'autres systèmes d'efflux (*MexEF-OprN* et *MexXY/OprM*), via le régulateur transcriptionnel *CmrA*.

3.2 Caractérisation de mutants résistants au cinnamaldéhyde

3.2.1 Contexte et résumé

Après avoir montré que les HEs pouvaient avoir une activité antagoniste avec les antibiotiques, nous avons voulu éprouver l'idée largement répandue dans la littérature qu'elles ne sélectionnent pas, contrairement aux antibiotiques, de mutants résistants, ceci probablement en raison de leur action multi-cibles.

Afin de sélectionner des mutants CNA-résistants, nous avons cultivé la souche de référence PA14 (CMI du CNA = 700 µg/mL) pendant 10 jours en présence de concentrations inhibitrices de CNA constantes (900 µg/mL, méthode A) ou croissantes (de 900 à 1400 µg/mL, méthode B). A l'issue de ce traitement, nous avons sélectionné 3 mutants (CNA-A1 à A3) par la méthode A, et 7 mutants (CNA-B1 à B7) par la méthode B. L'analyse du génome de ces mutants a montré que ceux obtenus par la méthode A ne se distinguent de la souche de départ que par une seule SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), alors que ceux obtenus par la méthode B en ont beaucoup plus (de 16 à 39 SNPs) en raison d'une mutation inactivatrice dans *mutL*, un gène codant une protéine de réparation de l'ADN.

La résistance au CNA de ces mutants, bien que modeste (CMI de 800 µg/mL à 1100 µg/mL) s'accompagne d'une diminution de la sensibilité à la ticarcilline, la ciprofloxacine (CMI x16), l'imipenème et la colistine (CMI x4). Dans 8 cas sur 10, c'est la surproduction de la pompe d'efflux MexAB-OprM, consécutive à des mutations dans le gène répresseur *nalC*, qui permet une résistance accrue aux antibiotiques et au CNA.

Toutefois, l'inactivation des gènes d'efflux *mexAB* dans le chromosome des mutants qui présentent les plus hauts niveaux de résistance au CNA, a permis de constater une résistance résiduelle au CNA, suggérant que d'autres mécanismes sont impliqués. Ces mutants ont des mutations supplémentaires dans des gènes impliqués dans la chimiosensibilité (*tlpQ*), dans la réponse au stress oxydatif (*mxtR*), dans la production d'énergie (*atpA*, *atpD*, *atpE*) ou dans la mobilité (*fliE*, *pilJ*). D'ailleurs, la plupart sont affectés dans la mobilité par *swimming*, *swarming* et dans leur capacité à faire du biofilm. La construction d'une souche PA14 inactivée dans le gène *fliE* (codant une protéine du corps basal du flagelle) a permis de confirmer que la perte de mobilité et probablement la préservation du gradient de protons qui en découle, permet à *P. aeruginosa* de mieux tolérer des concentrations toxiques de CNA.

Ce travail a été réalisé avec le soutien de Susie Gaillot étudiante en stage de Master 1 Signalisation Cellulaire et Moléculaire, Besançon.

3.2.2 Projet d'article

In vitro exposure to cinnamaldehyde selects antibiotic resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing the MexAB-OprM pump

Alexandre Tetard^a, Susie Gaillot^a, Soumaya Aarras^a, Benoît Valot^{a,b}, Gilles Phan^c, Patrick Plésiat^{a,d*}, Catherine Llanes^a

^a Laboratoire de Bactériologie, UMR CNRS 6249 Chrono-Environnement, Faculté de Médecine-Pharmacie, Université Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France.

^b Plateforme de Bioinformatique et Big data au Service de la Santé, Faculté de Médecine-Pharmacie, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France.

^c Université de Paris, CNRS UMR 8038, CiTCoM, F-75006, Paris, France.

^d Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques, Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, France.

*Corresponding author

Tel: (33) 3 63 08 23 59

E-mail: patrick.plesiat@univ-fcomte.fr

This study focuses on the ability of *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PA14 to resist toxic concentrations of cinnamaldehyde (CNA), the main component of cinnamon essential oil. Upon constant exposure to CNA from 5 to 10 days, 10 resistant mutants were selected, either with a fixed (900 µg/mL: CNA-A1 to A3) or increasing concentrations of the product (from 900 to 1,400 µg/mL: CNA-B1 to B7). Genome sequencing revealed that mutants CNA-A1 to A3, harboured only 1 SNP of difference with PA14, conferring a slight increase in resistance to CNA (1.15-fold), while the more resistant mutants (CNA-B1 to B7, up to 1.6-fold) had multiple SNPs (from 24 to 39) promoted by a *mutS*-driven hypermutator phenotype. Most of these mutants (8/10) were found mutated in *nalC*, the repressor gene of *mexAB-oprM* efflux operon, with consequent overproduction of the MexAB-OprM pump, a lower susceptibility to CNA, and to β-lactams and fluoroquinolones (up to 16-fold) which are substrates of this export system. Mutants with the highest CNA resistance were no longer motile, as a result of alteration of the *flgJ*, *fliE* and/or *pilJ* genes. Altogether our data show that *P. aeruginosa* is able to marginally increase its resistance to the strong electrophilic compound CNA through derepression of its intrinsic MexAB-OprM system and less-well characterized physiological changes. Whether multidrug resistant mutants can emerge in patients with a self-medication of cinnamon essential oil needs to be assessed.

With the continuous emergence of new bacterial strains resistant to antibiotics in clinic, the efficacy of anti-infectious treatment becomes a more and more compromised (World Health Organization, 2018). To address this global public health issue and fight multi-resistant strains, several strategies are under study, including the reappraisal of natural compounds (1). In this context, the *in vitro* activity of several aromatic plants extracts (namely, essential oils, EOs) was reported when used alone (2), or mixed together (3), or combined with antibiotics (4, 5). The composition of the EOs varies according to the plant species, geographical origin and climatic conditions. However, their main components demonstrate interesting properties such as cinnamaldehyde and cinnamic acid (in cinnamon oil), carvacrol, thymol, α -terpinene and γ -cymene (in oregano and thyme oil), eugenol (in clove oil), terpinen-4-ol, β -pinene and 1,8-cineole (in tea tree oil), or calamenene and leptospermone (in manuka oil) (5).

The mode of action and constituents of EOs have been the subject of many researches these last decades. The bacterial cell wall is often reported as the first damaged structure, with subsequent alteration of membrane proteins, leakage of cellular content, dissipation of the motive proton force, and coagulation of the cytosol. Specific physiological damages have also been described such as the inhibition of efflux pumps by geraniol (6), reduced production of exoproteins by eugenol in *Staphylococcus aureus* (7) and inhibition of amino acid decarboxylases by the carbonyl group of

cinnamaldehyde (8). In general, higher concentrations of EOs are necessary to inhibit the growth of, or kill, Gram-negative as compared with Gram-positives (9), suggesting a protective role for the bacterial outer membrane. The Gram negative opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* is known to be relatively resistant to many EOs that are otherwise active against Enterobacteriales and Gram positive species (10) thanks to its poor outer membrane permeability, and expression of multiple RND efflux pumps, including MexAB-OprM (11, 12). Whether higher levels of resistance may be gained by *P. aeruginosa* when exposed to toxic concentrations of EO components has not been addressed so far. The issue of mutagenic properties of EOs (i.e., their capacity to increase the mutation rates of microorganisms) needs to be explored more deeply as well. Previous investigations failed to select *in vitro* single-step mutants of *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus* resistant to tea tree oil (13), or *Staphylococcus* resistant to rosemary oil (14). Serial passages of *Salmonella* Typhimurium in a culture medium containing sublethal concentrations of oregano oil only yielded a modest twofold increase in resistance to this latter extract (15). Similar experiments with *P. aeruginosa* failed to isolate more resistant mutants (16, 17). A trivial explanation would be that in contrast to antibiotics, EOs do not target specific cellular components but have pleiotropic actions. Because of its higher bactericidal activity, cinnamon oil has been proposed as a possible alternative to antibiotics to fight *P. aeruginosa* infections (MIC from 400 to 1,000 µg/mL) (16, 18). To our knowledge, no mutants showing an increased resistance to CNA have been reported in the literature. The present study demonstrates that stable mutants of *P. aeruginosa* strain PA14 can survive to toxic concentrations of CNA, an adaptation which involves the multidrug efflux system MexAB-OprM.

Results

In vitro selection of mutants resistant to CNA. Because of their pleiotropic action, electrophilic compounds such as CNA may have potential mutagenic properties. To test this hypothesis, *P. aeruginosa* reference strain PA14 (MIC of CNA = 700 µg/mL) was cultivated in the presence of sub-inhibitory (500 µg/mL) concentrations of CNA, and streptomycin resistant mutants were counted on selective plates. Rates of resistant mutants were found similar ($p < 0.05$) to that of a control grown without CNA exposure ($4.9 \cdot 10^{-10}$), a result indicating that this antibacterial agent is not mutagenic for *P. aeruginosa*.

Exposure of liquid cultures of PA14 to 1.3-fold the MIC of CNA (i.e., 900 µg/mL) for 24 or 48h did not give rise to CNA resistant mutants. However, mutants could be obtained after 10 days by refreshing the cultures with new MHB medium containing 900µg/ml CNA (method A). Three of these clones were retained for further experiments (CNA-A1, -A2, -A3). In addition, serial passages of strain PA14 in MHB containing increasing CNA concentrations (method B) led to selection of 3 resistant mutants (CNA-B1, -B2 and B3) after 5 days at the concentration of 1100 µg/ml, and 4 mutants (CNA-B4, -B5, -B6, -B7) after 10 days (at 1400 µg/mL).

The 10 mutants from methods A and B displayed only a marginal increase in CNA resistance (from 1.1- to 1.6-fold that of parental strain PA14) (**Table 1**), thus highlighting the difficulty of *P. aeruginosa* to set up additional mechanisms to those involved in its natural resistance toward this toxic molecule.

CNA selects multidrug resistance mutants. Interestingly, our mutants turned out to have various antibiotic resistance profiles comparatively to their parent PA14. Most of them (8/10) were less susceptible (from 4- to 16- fold) to the β-lactam ticarcillin and to the fluoroquinolone ciprofloxacin (**Table 1**). In addition, some B-mutants showed a decreased susceptibility to imipenem and colistin (from 2- to 4-fold). Irrespective of the selection protocol, 6/10 mutant were more susceptible (2- to 4-fold) to the aminoglycoside gentamicin.

To get an insight into the role of RND efflux pumps in the mutant phenotypes we determined the expression levels of genes encoding 4 major efflux pumps of *P. aeruginosa* able to export antibiotics and confer multidrug resistance: MexAB-OprM (substrates: β-lactams except imipenem, and fluoroquinolones), MexXY/OprM (cefepime, aminoglycosides and fluoroquinolones), MexEF-OprN (fluoroquinolones) and MexCD-OprJ (cefepime and fluoroquinolones). Accounting for the higher resistance of 8/10 mutants to ticarcillin and ciprofloxacin, the *mexAB-oprM* efflux operon was found

significantly overexpressed. Besides, the hyper-susceptibility of 6 mutants to aminoglycosides was correlated to a low *mexY* expression (from 2- to 10- fold less than in PA14) (**Table 1**).

TABLE 1. Features of CNA resistant mutants

Strains/mutants ^a	nalC Sequence	Transcript levels ^c					MICs (µg/mL) of antibiotics and CNA ^d						
		mexB	armR	mexY	mexC	mexE	TIC	AZT	CIP	IPM	CST	GEN	CNA
PA14	WT	1	1	1	1	1	32	4	0.06	0.5	1	0.5	700
PA14 <i>mexAB</i> ^{+b}	WT	6.5	1	ND	ND	ND	128	16	0.25	0.5	1	0.5	900
PA14ΔAB	WT	-	ND	ND	ND	ND	16	£ 0.5	0.06	0.5	1	0.5	500
CNA-A1	-A₄₈₆	3.4	61	0.2	0.5	1.3	128	32	0.25	0.5	0.5	0.125	900
CNA-A2	T₂₄P	2.5	24	0.1	0.1	0.2	256	16	0.25	0.5	0.5	0.25	900
CNA-A3	WT	1.3	1	0.5	0.7	0.4	64	8	0.06	0.5	0.25	0.125	800
CNA-B1	+C₄₅₀	4.9	164	0.3	0.4	0.8	> 256	64	0.5	0.5	0.5	0.25	1000
CNA-B2	WT	1.2	1	0.5	0.6	0.5	64	16	0.06	0.5	0.5	0.25	800
CNA-B3	+GG₄₄₂	5.7	146	1.1	0.4	0.9	> 256	64	1	1	4	1	1000
CNA-B4	+C₄₅₀	3.3	130	0.4	0.5	0.9	> 256	64	0.5	2	1	0.125	1100
CNA-B5	+C₄₅₀	6.0	208	1.1	0.7	0.9	> 256	64	0.5	2	4	1	1000
CNA-B6	+C₄₅₀	5.0	136	0.7	0.6	0.8	> 256	64	0.5	1	1	0.5	1100
CNA-B7	+C₄₅₀	7.6	423	2.5	0.6	1.6	> 256	64	1	2	4	1	1100

^a mutants A1-A3 were obtained after 10 days of exposure to a fixed 900 µg/mL CNA concentration; mutants B1-B7 were obtained after exposure to increasing concentrations of CNA: up to 1050 µg/mL (B1-B3) and up to 1400 µg/mL (B4-B7). Data of MexAB-OprM overproducing mutants derived from the parent strain PA14 are indicated in boldface (8/10 *nalC* mutants).

^b In this characterized mutant, overproduction of MexAB-OprM is due to a 3-bp deletion in the repressor gene *mexR* (*nalB* mutant).

^c Expressed as a ratio to wild-type reference strain PA14. Mean values were calculated from two-independent bacterial cultures each assayed in duplicate.

^d TIC, ticarcillin; CIP, ciprofloxacin; IPM, imipenem; CST, colistin; GEN, gentamicin; CNA, cinnamaldehyde.

Genetics of CNA adaptation mutants. Method A gave rise to 3 different mutants harbouring a single SNP of difference with PA14 parent while method B selected 7 mutants diverging from PA14 by 16 to 39 SNPs likely as a result of the alteration of DNA mismatch repair genes *mutS* (**Table 2**). CNA-B2 was found to harbour a Q₅₈₉R substitution predicted to have a slight impact on the MutS protein (-2.456 neutral PROVEAN score), and the other B mutants a *mutS* allele lacking 9 nucleotides (Δ₂₃₂₇₋₂₃₃₆). Loss of function of this protein (as well as MutL and UvrD) is known to provide *P. aeruginosa* with a hypermutator phenotype, especially in long term chronic infection (19). Suspecting the notion that the inactivation of protein MutS boosted subsequent accumulation of multiple mutations in B clones, 16 to 26 SNPs were identified in bacteria after 5 days of CNA exposure (CNA-B1 to -B3) and 24 to 39 SNPs after 10 days (CNA-B4 to -B7). A phylogenetic tree showing the relationships of this mutants is represented **Figure S1**. Except CNA-B2, all the mutants were closely related (e.g., CNA-B3/B5 and CNA-B4/B6).

Role of NalC in bacterial adaptation to CNA. Eight out of ten mutants appeared to possess a mutated *nalC* gene which encodes an indirect regulator of operon *mexAB-oprM* expression. Indeed, the *nalC* product represses the transcription of a gene (*armR*) encoding an antirepressor operon *mexAB-oprM*, through its binding to MexR. Confirming the alteration of NalC, subsequent experiments revealed the concomitant overexpression of genes *mexB* and *armR* in all the 8 mutants, and the increased resistance of this latter to two MexAB-OprM substrates ticarcillin and ciprofloxacin (**Table 1**). In support to a role for MexAB-OprM and NalC in the adaptation of *P. aeruginosa* to CNA, it should be noticed that 3 different genetic events corresponding to 3 types of *nalC* mutants were independently selected in the course of our experiments A and B, while not other operon *mexAB-oprM* regulators were targeted. In 7/8 *nalC* mutants, the gene is inactivated consecutively to an addition (+C₄₅₀) or a deletion (-A₄₈₆). Only one mutant (CNA-A2) exhibited a substitution (T₂₄P) in NalC.

TABLE 2. Common altered functions in CNA-adaptation mutants compared with parental strain PA14.

Genes/ Proteins	A-type mutants (CNA MIC in µg/mL)			B-type mutants (CNA MIC in µg/mL)							Proteins functions
	CNA-A1 (900)	CNA-A2 (900)	CNA-A3 (800)	CNA-B1 (1000)	CNA-B2 (800)	CNA-B3 (1000)	CNA-B4 (1100)	CNA-B5 (1000)	CNA-B6 (1100)	CNA-B7 (1100)	
mutS/MutS				-9 pb	Q ₅₈₉ R	-9 pb	-9 pb	-9 pb	-9 pb	-9 pb	DNA mismatch repair DNA mismatch repair protein MutS
nalC/NalC	-A₄₈₆	T₂₄P		+C₄₅₀		+GG₄₄₂	+C₄₅₀	+C₄₅₀	+C₄₅₀	+C₄₅₀	Transmembrane transport Transcriptional repressor NalC (of MexAB-OprM pump)
DppB				G₁₁₄D		G₁₁₄D	G₁₁₄D	G₁₁₄D	G₁₁₄D	G₁₁₄D	Dipeptide ABC transporter permease DppB
AtpD			P₃₀₅S								Energy production FOF1 ATP synthase subunit beta
AtpA						D ₂₉₀ G		D ₂₉₀ G			FOF1 ATP synthase subunit alpha
AtpE							T ₂₃ A				FOF1 ATP synthase subunit C
MxtR							W₁₀₇₁*		W₁₀₇₁*	L ₁₀₆₈ P	Response to oxidative stress Orphan sensor kinase MxtR
YbbN						F₈₆S	F₈₆S	F₈₆S	F₈₆S	F₈₆S	Thioredoxin (oxidoreductase)
PcaB (TlpQ)				L₅₆₁P		E ₂₃₉ G L₅₆₁P	L₅₆₁P	E ₂₃₉ G L₅₆₁P	L₅₆₁P	E ₂₃₉ G L₅₆₁P	Response to chemicals 3-carboxy-cis, cis-muconate cycloisomerase Chemotaxis transducer (TlpQ)
FliE						Q₅₄*		Q₅₄*		Q₅₄*	Motility Flagellar hook-basal body protein FliE
FlgJ							Q ₃₄₁ R		Q ₃₄₁ R		Flagellar rod assembly protein/muramidase FlgJ
FlgG					P ₈₃ L						Flagellar basal body rod protein FlgG
PilJ							T₄₀₃A		T₄₀₃A		Twitching mobility protein
RbsR						V ₃₂₀ M	V ₃₂₀ M	V ₃₂₀ M	V ₃₂₀ M	V ₃₂₀ M	Nucleotide-sugar metabolic process Ribose operon repressor RbsR
PA0841						A ₃₀₄ V		A ₃₀₄ V			Unknown functions Hypothetical protein
PA3283						N ₁₄₂ S		N ₁₄₂ S		N ₁₄₂ S	Hypothetical protein

* STOP codon. Mutations predicted as being deleterious to protein function by PROVEAN (score < -2.5) are indicated in boldface.

To our knowledge, this substitution has never been reported in the literature. T24 is not a particularly conserved amino-acid in the TetR family (**Figure S2**), but the substitution T₂₄P occurs in helix α 1 of the DNA-binding domain of the repressor, which consists of 27- to 48-aminoacid region in the homologous regulators TetR (19). To get an insight into the impact of T₂₄P substitution on NalC oligomerization or DNA-binding, we mapped this mutation on a three-dimensional dimeric model bound to a cognate DNA. As the structure of NalC has not been determined yet, we performed homology modeling of NalC with the dimeric crystal structure of homologous protein TetR from *Mesorhizobium japonicum* (PDB code 3BHQ) which shares 24,4 % of sequence identity including the equivalent amino acid position T24 of NalC (**Figure S2**). According to our structural model, T24 is neither involved in dimer interface, nor in direct DNA recognition. Nevertheless, T24 residue of NalC is located on the helix α 1 of the DNA-binding domain and the substitution by a Pro residue at this position could destabilize the DNA-binding domain by introducing a structural kink in the helix α 1 because of the hydrogen bond loss within the main chain. Thus, the substitution T₂₄P could trigger the disruption of NalC-DNA binding. Besides, T24 could interact through a hydrogen bond with the residue R106 of the helix α 7, which is part of the ligand binding domain (**Figure S3**). This time, the substitution T₂₄P could indirectly disturb the binding pocket of NalC by disconnecting the assumed interaction with R106.

However, the NalC pathway does not seem to provide clear advantage in terms of CNA resistance compared to the NalB regulation (derepression of MexR). As indicated in **Table 1**, CNA MICs were very similar for the *nalB* mutant PA14*mexAB*⁺ and the 8 *nalC* clones from our selection (range from 900 to 1100 μ g/mL). To determine whether other mutations would account for the slightly higher resistance of mutants CNA-B1 and CNA-B3 to B7 to CNA (1000-1100 μ g/mL), efflux genes *mexAB* were deleted in those mutants. Susceptibility tests showed that lack of MexAB-OprM pump does not prevent mutants to grow on CNA 500 μ g/mL, contrary to the parental strain PA14 (PA14 Δ AB) (**Figure 1**).

Thin layer chromatography analysis of culture supernatant of the 10 CNA-adaptation clones did not show a clear relationship between CNA degradation and the mutants resistance level, though additional metabolites to cinnamic alcohol were seen in the culture of some of these mutants (CNA-B1, B2, B6) (**Figure 2**).

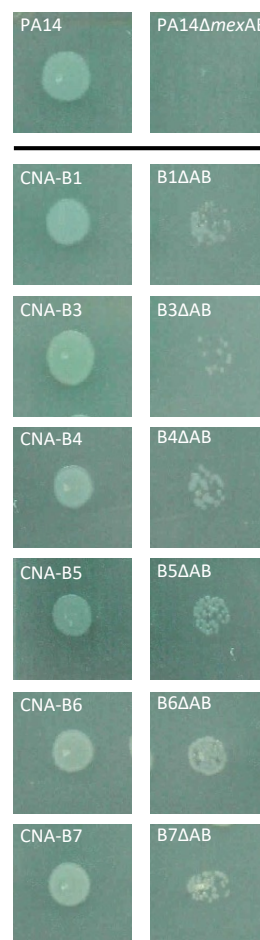


Figure 1. Impact of *mexAB* deletion on resistance to CNA. Deletion of genes *mexAB* was carried out in PA14 and several CNA-adaptation *nalC* mutants (CNA-B1 and CNA-B3 to CNA-B7). The inactivated mutants (Δ AB) and their progenitors were spotted at the surface of an MHA plate containing 500 μ g/mL CNA.

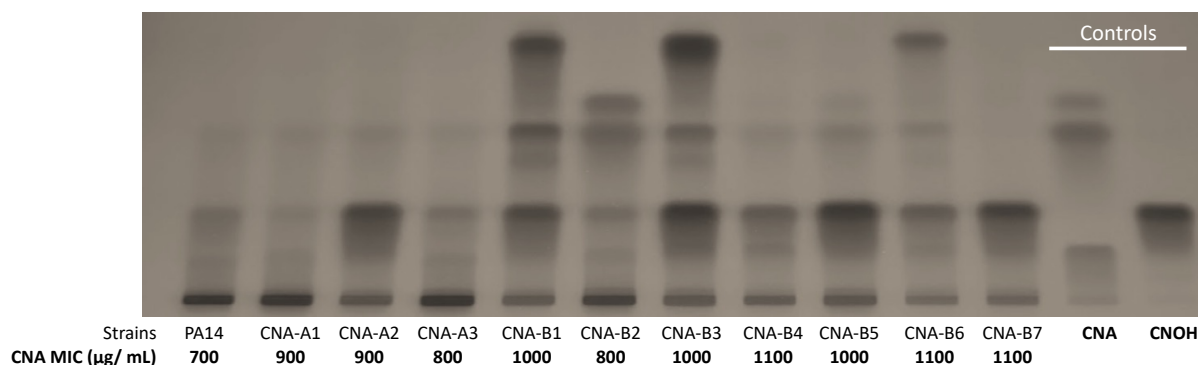


Figure 2 CNA degradation and conversion into cinnamic alcohol (CNOH) in PA14, A-type and B-type CNA-adaptation mutants. CNA and CNOH were assayed from culture supernatant by thin-layer chromatography 1h after addition of 1 mg/mL CNA.

Role of motility in CNA adaptation. Table 2 shows that 5 out of 6 of the mutants with CNA MICs ≥ 1000 $\mu\text{g/mL}$ contained mutations targeting the flagellar *flgJ*, *flgG* or *fliE* or pili machineries (*pilJ*). Swarming assays that explore the functionality of both flagellum and type IV pili revealed an impaired motility mutants CNA-B4 and -B6 ($Q_{341}R$ variant of FlgG) and to complete loss of motility by mutants CNA-B3, -B5, -B7 which harbour a disrupted *fliE* gene. In contrast, CNA-B2 was still motile, suggesting that the $P_{83}L$ substitution in protein FlgG is not significant (Figure 3A). As *P. aeruginosa* can attach to surfaces via its flagellum (20), pili (21) or Pel polysaccharides (22), we investigated the initial formation of biofilm by the mutants in microplates, and found clones CNA-B3 to -B7 significantly defective in this process (Figure 3B). Of note, mutant CNA-B1 (CNA MIC = 1000 $\mu\text{g/mL}$) was not impaired in biofilm formation, which indicates that other mechanisms that loss of motility can also contribute to a higher CNA resistance. To confirm that non motile bacteria can somewhat better survive to CNA exposure, we constructed a *fliE* deleted PA14 mutant ($PA14\Delta fliE$), and compared its susceptibility to CNA with that of PA14 and its gain-of-efflux derivative $PA14mexAB^+$.

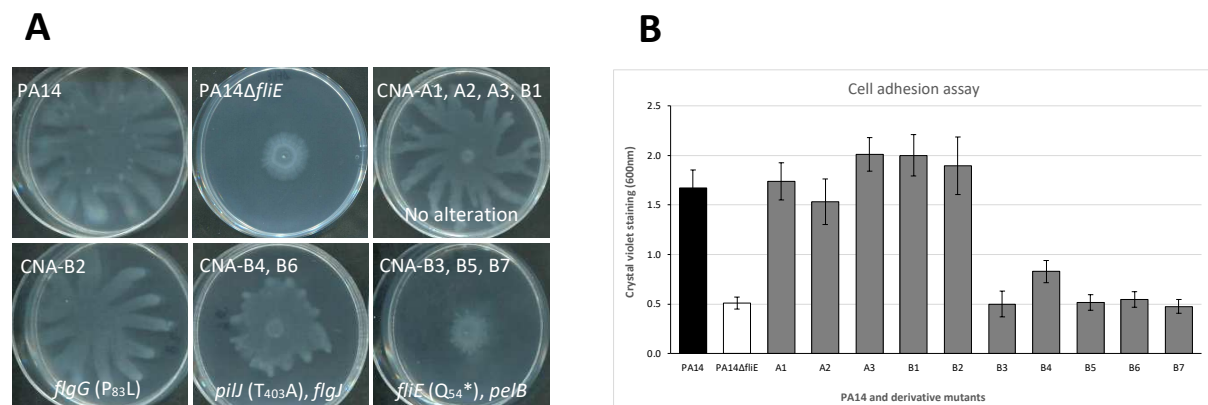


Figure 3 Motility and initial surface attachment of CNA-adaptation mutants (A) Swarming motility: the mutations found in genes responsible for flagellar structure/assembly, pili formation, and biosynthesis of biofilm matrix are indicated. (B) Absorbance at 600 nm is representative of sessile bacteria stained by crystal-violet in microplates (mean values resulting from 10 replicates).

In agreement with our assumption, $PA14\Delta fliE$ slightly better resisted CNA than PA14, even if this resistance was lower than those resulting from a stable MexAB-OprM overproduction (Figure 4).

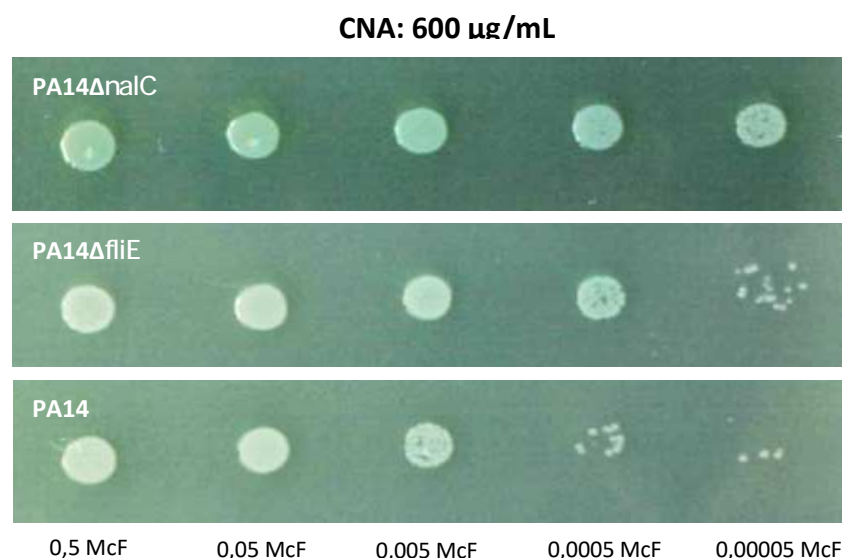


Figure 4: Increased resistance of PA14 *fliE* to CNA. PA14 and its derivative mutants ($PA14\Delta fliE$ and $PA14\Delta nalC$) were spotted at the surface of a MHA plate containing 600 $\mu\text{g/mL}$ CNA.

Finally, suggesting that some secondary mutations might compensate for the energy cost resulting from the upregulation of the pump, the ATPase was found to be the target of two different mutations (gene *atpA* and *atpE*) of unknown significance. Furthermore, it is worth noting that ATP synthase subunit beta was mutated in the low-level CNA resistance mutant A3 (MIC = 800 µg/mL), which does not overexpress the efflux system MexAB-OprM constitutively.

Discussion - Conclusion

This work underscores the difficulty to obtain mutant of *P. aeruginosa* showing an increased resistance to CNA. A previous attempt to select for mutants resistant to cinnamon EO after 50 passages turned unsuccessful (16). As a matter of fact, CNA is described to have an antimutagenic effect on spontaneous mutations in *Salmonella* TA104 depending on SOS-repair function (23). In this study, mutants more resistant than the parental strain were obtained upon long term exposure to inhibitory concentrations of CNA. Whether the repeated use of EOs by inhalation or nebulization by chronically colonized patients with cystic fibrosis or chronic obstructive pulmonary disease would select similar mutants warrants further investigations. Indeed, CNA and other electrophilic agents are able to increase the resistance of *P. aeruginosa* to antibiotics, either transiently or stably, by stimulating a stress response in the bacterium, which involves the upregulation of RND efflux pumps (12). In addition to MexAB-OprM being overproduced in CNA adaptation mutants, which accounts for their higher resistance level to ticarcillin and ciprofloxacin, other mechanisms are likely to be involved in their lower susceptibility to aminoglycosides in mutant CNA-B5 (e.g., A₂₂₅T mutation in *fusA1*), imipenem, and colistin (mutants CNA-B3 to -B7). It would be interesting to identify these resistance mechanisms as this could provide information on EOs cellular targets and drugs combinations to avoid.

As noted previously, MexAB-OprM often contributes to the protection of *P. aeruginosa* against natural toxic molecules such as those contained in tea tree (11), thyme EO (24), carvacrol (25) and cinnamaldehyde EOs (12). We hypothesize, like others (26), that the phenolic ring present in many plant antimicrobials is recognized by the MexAB-OprM pumps. If there is a consensus about the role of MexAB-OprM in bacterial tolerance to aromatic molecules, the mutations underlying the pump dysregulation is less known. In this work, we found that almost all A- and B-type mutants were inactivated in repressor gene *nalC*. This activates the expression of PA3720-*armR* operon, allowing the production of MexR anti-repressor ArmR, and then MexAB-OprM. The repressor activity of NalC can be modulated by phenolic compounds (pentachlorophenol, CNA), transiently inducing the expression of MexAB-OprM efflux pump (12, 26, 27). As phenolic compounds are commonly produced by plants, NalC might be the preferential way by which this pump is regulated under environmental conditions. Of note, analysis of *P. aeruginosa* isolates resistant to aztreonam as a result of MexAB-OprM derepression highlighted mutation in transcriptional regulator NalC for those bacteria isolated from soil (28), and in NalD, MexR or NalD for the clinical isolates (29).

Efflux pumps are proton/substrates antiporters, and their overexpression may lead to intracellular H⁺ accumulation, which may in turn offset the pH homeostasis. The faster way to eliminate the excess of protons is by increasing oxygen consumption as it has been shown for *P. aeruginosa* (30). Highly motile cells derive energy from the TCA cycle with consecutive increase in endogenous ROS, as those resulting from the oxidative stress induced by CNA (31). As a consequence, impairment of the flagellar function might confer a fitness advantage when more energy is needed to adapt to toxic molecules. Recently, it was observed that Δ *fliG* or Δ *fliC* mutants of *P. aeruginosa* grow better than the parental PA14 in the presence of the antibiotic vancomycin (32). Similarly, toxic concentrations of Manuka honey reduce the motility of *P. aeruginosa* by decreasing the expression of major structural flagellum-associated genes *fliA*, *fliC*, *fliH*, *fliN*, *fliQ* and *fliR* (33). Other, some molecules extracted from EOs are known to target the bacterial flagellum. For example, carvacrol (from oregano EO) inhibits the synthesis of flagellin, giving rise to *E. coli* cells devoid of flagella (34). Treatment of *P. aeruginosa* with *p*-cymene

(from cuminaldehyde), the precursor of carvacrol, results in decrease cellular motility by depleting the proton motive force (35). Other natural compounds (coumarin-like and 1,4-benzodioxan-like and 4-chloroindole) were also shown to downregulate flagellum related genes in *P. aeruginosa* (36).

It is interesting to note that a long term CNA exposure led to the emergence of *mutS* defective mutants and subsequent accumulation of mutations in multiple genes. Acquisition of a hypermutator phenotype is well known to accelerate the development of antibiotic resistance in various bacterial species and the role of EO compounds as potential promoters of hypermutations *in vivo* should be considered seriously, as this could compromise indirectly antibiotics treatments.

Material and methods

Bacterial strains, plasmids and growth conditions. The reference strains, mutants and plasmids used in this study are listed in **Table S1**. All the bacterial cultures were incubated at 37°C in Mueller-Hinton broth (MHB) with adjusted concentrations of Ca²⁺ (from 20 to 25 µg/ml) and Mg²⁺ (from 10 to 12.5 µg/ml) (Becton Dickinson and Company, Cockeysville, MD), or on Mueller-Hinton agar (MHA) (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) supplemented with antibiotics when required. Cinnamaldehyde (CNA) and dimethylsulfoxide (DMSO) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

Mutagenesis frequency evaluation. The mutagenic effect of CNA was determined by calculating the rate of mutants resistant to streptomycin because of point mutations in the *rpsL* gene (37). Overnight culture of *P. aeruginosa* PA14 was diluted into 20 mL MHB to reach A₆₀₀ = 0.2, and incubated at 37°C and 220 rpm for 3h with a sub-inhibitory concentration of CNA (500 µg/mL); this assay was also carried out with ciprofloxacin at ½ CMI (= 0.006 µg/mL) as a positive control. Afterwards, 50 µL of these cultures were spread with a spiral plater (easySpiral Pro, Interscience, Saint-Nom-la-Bretèche, France) MHA plates containing or not 8-fold MIC of streptomycin (final concentration: 512 µg/mL) (Sigma-Aldrich). Plates were incubated at 37°C or 48h and colonies were counted. Mutation rates were calculated by dividing the number of colonies present in streptomycin plates (mutation events) by the number of colonies present in plates without antibiotics (38). The values are representative of 3 independent experiments.

Selection of PA14 CNA adaptation mutants. An overnight culture of *P. aeruginosa* PA14 strain was calibrated (A₆₀₀ = 0.8) and incubated 24h at 37°C under agitation (250 rpm) in 20 mL MHB complemented by 700 µg/mL CNA. For 10 days, 100 µL were daily collected and spread on a plate containing 900 µg/mL CNA. The remaining bacteria were collected by centrifugation (6400 g, 15 min) and resuspended in fresh MHB containing the same concentration of CNA (Method A). In another experiment, the PA14 strain was submitted to the same protocol, with an increased concentration of CNA (+ 50µg/mL, daily) reaching 1400 µg/mL after 10 days.

Genome sequencing and SNP analysis. The whole DNA content of mutants CNA-A1 to A3 and CNA-B1 to -B7 was sequenced with the Illumina technology. Briefly, total bacterial DNA was extracted from overnight cultures by using PureLink Genomic DNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France), then was quantified with a NanoDrop[®]One spectrophotometer (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette), and finally sequenced by Microsynth AG (Balgach, Switzerland) in an Illumina NextSeq sequencer with v2 chemistry, using 2 × 150 paired-end reads. DNA libraries were prepared with Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, United States). High throughput sequencing yielded from 3355318 to 5529638 paired reads per mutant (6537648 for PA14), with a coverage depth comprised between 150 and 250 x. Reads were trimmed with Sickle (39) using a minimum length of 75bp and a minimum base quality of 20, subsampled to 80 x by home-made script and then aligned using BWA-MEM (40) against the PA14 reference genome (GCF_000014625.1) using default parameter. Variant calling was performed with FreeBayes (41) with haploid mode, a

minimum quality of base call and mapping of 20, a minimum alternate fraction of 0.8 and a minimum alternate count of 10. Sequence variations, found in the mutants and in the wild type PA14 strain, were removed.

Phylogenetic tree was built with MrBayes using the concatenation of identified SNPs from the 10 mutants CNA-R. The analysis was performed with the HKY85 mutation model and a gamma-distributed rate variation (42) during 1 million iterations.

Complete genomic sequences of the *P. aeruginosa* CNA-A1 to CNA-A3 and CNA-B1 to CNA-B7 mutants have been deposited in the NCBI data base under the BioProject accession number PRJNA663565. Mutations found in genes of mutants CNA-B1 to -B7 are listed in **Tables S3, S4, S5, S6, S7, S8 and S9**. SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>) and PROVEAN (cutoff -2.5) (<http://provean.jcvi.org/index.php>) algorithms were used to predict the effects of substitutions.

Drug susceptibility testing. The minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by the standard serial 2-fold dilution method, as recommended by the CLSI (43). For antibiotics (ticarcillin, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem, colistin), experiments were carried out in 96-well microplates supported by the Freedom EVO² robotic system (TECAN, Männendorf, Switzerland) with inocula of 10⁶ CFU per well. MIC of CNA (DMSO 1%) were performed in MHA with inocula of 10⁶ CFU per spot. In both cases, bacterial growth was visually assessed after 18 h of incubation at 37°C. To confirm the results, MIC experiments were performed in triplicate.

RT-qPCR experiments. Specific gene expression levels were measured by quantitative PCR after reverse transcription (RT-qPCR), as previously described (44). RNA was reverse transcribed with ImProm-II reverse transcriptase as specified by the manufacturer (Promega, Madison, WI). The amounts of specific cDNA were quantified on a Rotor Gene RG6000 instrument (Qiagen, Courtaboeuf, France) by using the QuantiFast SYBR green PCR Kit (Qiagen) and primers annealing to the target genes (**Table S2**). For each strain, the mRNA levels of target genes were normalized to that of housekeeping gene *rpsL*, and were expressed as a ratio to the transcript levels of strain PA14. Mean gene expression values were calculated from two independent bacterial cultures, each assayed in duplicate. As shown previously, transcript levels of *mexB* > 2-fold, *mexY* ≥ 5-fold, *mexC* and *mexE* ≥ 20-fold those of PA14, were considered as significantly increased because associated with a ≥ 2-fold higher resistance to respective pump substrates (44, 45).

Construction of PA14 *fliE*-defective mutant. In order to study the role of mobility in bacterial tolerance to CNA, a defective mutant in *fliE* was constructed from wild-type strain PA14. Gene inactivation was carried out using the suicide plasmid pKNG101 (**Table S1**) and homologous recombination events. Briefly, recombinant plasmids were constructed by assembly cloning using the NEBuilder Hi-Fi DNA Assembly Cloning Kit (New England Biolabs, France) and the deleted chromosomal region amplified with appropriate primers (**Table S2**). Assembly products were directly used to transform competent *E. coli* CC118λpir strain (**Table S1**). Recombinant plasmids with appropriate inserts were transferred to *P. aeruginosa* PA14 by conjugation. Transconjugants were selected on Pseudomonas Isolation Agar (PIA; Becton Dickinson) containing 2,000 µg/mL streptomycin. Excision of the undesired pKNG101 sequence was obtained by plating transformants on M9 plates (8.54 mM NaCl, 25.18 mM NaH₂PO₄, 18.68 mM NH₄Cl, 22 mM KH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 0.8% agar, pH 7.4) containing 5% (wt/vol) sucrose. Negative selection on streptomycin-containing MHA allowed the identification of transconjugants that had lost the plasmid. Finally, the allelic exchange was checked by PCR and confirmed deletion of 198-bp in gene *fliE*.

Mobility and cell adhesion assay.

Swarming. Swarming mobility is due to the combined action of rhamnolipids, type IV pili and flagella, and was evaluated on a semi-solid surface. Positive swarming strains form macroscopic colony patterns characterized by the coordinate translocation of bacteria on the semi-solid medium, when grown under optimal conditions. Briefly, 5 µL of a bacterial suspension (0.2 McFarland) were spotted

onto the surface of an M8-Swarm medium (Minimal medium. NaCl 8 mM, NaH₂PO₄ 42 mM, KH₂PO₄ 22 mM pH 7.4 supplemented with glucose 0.2%, MgSO₄ 2 mM, Casaminoacids 0.5% and agar 0.5%). Swarming colonies were observed after an incubation of 24 h at 37°C.

Detection of biofilm formation by adherence test. 200 µL of bacterial suspension (10⁸ CFU/ml) was incubated 24 h at 30°C into a polystyrene 96-well microplate. Each well was washed twice using 200 µL of distilled water to eliminate planktonic bacteria. Biofilm was colored using 200 µL of crystal-violet solution at 1% (w/v). After 15 min at room temperature, the wells were washed and crystal-violet attached to sessile bacteria was solubilized with 2 x 200 µL ethanol at 99% (v/v). Finally, absorbance was read at 600 nm and calibrated with a negative control containing 400 µL of cMHB (46).

Metabolite extraction and detection using Thin Layer Chromatography (TLC). Standard working solution of CNA (cinnamaldehyde) and CN-OH (cinnamic alcohol) was prepared by diluting aliquots of > 98 % stock solutions in DMSO. Overnight bacterial cultures were diluted into 20 mL of fresh MHB and incubated with shaking (250 rpm) at 37°C. When the cultures reached an absorbance of A_{600nm} = 0.8, CNA was added to a final concentration of 1 mg/mL. One hour post-exposure, the growth medium was collected by centrifugation and filtration through two filters of 0.45 and 0.2 µm pore size, respectively. An organic extraction was repeated 3 times using 25 mL dichloromethane (for a total volume of 75 mL). The organic fractions were pooled and dried under rotative evaporator, and finally re-dissolved in 1ml methanol. Standards were diluted (1:100) in methanol. A fraction of 25 µl for sample and 2µl for standards was sprayed as 8 mm bands on a TLC plate (Alugram® Xtra SIL G UV254, Macherey-Nagel) using an automatic sampler (ATS4, Camag, Moirans, France) connected to visionCATS Camag TLC software V2.4. The TLC plate was developed in an automatic developing chamber (ADC 2, Camag) with a mobile phase containing cyclohexane:ethyl acetate (7:2) over a 70 mm developing distance. Spots were observed using UV-light at 254 nm (CV-415.LS, Uvitech, England).

References

1. Bush K, Courvalin P, Dantas G, Davies J, Eisenstein B, Huovinen P, Jacoby GA, Kishony R, Kreiswirth BN, Kutter E, Lerner SA, Levy S, Lewis K, Lomovskaya O, Miller JH, Mobashery S, Piddock LJ, Projan S, Thomas CM, Tomasz A, Tulkens PM, Walsh TR, Watson JD, Witkowski J, Witte W, Wright G, Yeh P, Zgurskaya HI. 2011. Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 9:894-6.
2. Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother* 47:565-73.
3. Gadisa E, Weldearegay G, Desta K, Tsegaye G, Hailu S, Jote K, Takele A. 2019. Combined antibacterial effect of essential oils from three most commonly used Ethiopian traditional medicinal plants on multidrug resistant bacteria. *BMC Complement Altern Med* 19:24.
4. Castaneda-Correa A, Corral-Luna A, Hume ME, Anderson RC, Ruiz-Barrera O, Castillo-Castillo Y, Rodriguez-Almeida F, Salinas-Chavira J, Arzola-Alvarez C. 2019. Effects of thymol and carvacrol, alone or in combination, on fermentation and microbial diversity during in vitro culture of bovine rumen microbes. *J Environ Sci Health B* 54:170-175.
5. Langeveld WT, Veldhuizen EJ, Burt SA. 2014. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Crit Rev Microbiol* 40:76-94.
6. Lorenzi V, Muselli A, Bernardini AF, Berti L, Pages JM, Amaral L, Bolla JM. 2009. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from gram-negative species. *Antimicrob Agents Chemother* 53:2209-11.
7. Qiu J, Feng H, Lu J, Xiang H, Wang D, Dong J, Wang J, Wang X, Liu J, Deng X. 2010. Eugenol reduces the expression of virulence-related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. *Appl Environ Microbiol* 76:5846-51.
8. Wendakoon CN, Sakaguchi M. 1995. Inhibition of Amino Acid Decarboxylase Activity of *Enterobacter aerogenes* by Active Components in Spices. *J Food Prot* 58:280-283.
9. Sibanda T, Okoh AI. 2007. The challenges of overcoming antibiotic resistance: Plant extracts as potential sources of antimicrobial and resistance modifying agents. *African journal of biotechnology* 6:2886-2896.

10. Mann CM, Cox SD, Markham JL. 2000. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *Lett Appl Microbiol* 30:294-7.
11. Papadopoulos CJ, Carson CF, Chang BJ, Riley TV. 2008. Role of the MexAB-OprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* in tolerance to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its monoterpene components Terpinen-4-ol, 1,8-Cineole, and α -Terpineol. *Appl Environ Microbiol* 74:1932-1935.
12. Tetard A, Zedet A, Girard C, Plésiat P, Llanes C. 2019. Cinnamaldehyde induces expression of efflux pumps and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 63.
13. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. 2008. Frequencies of resistance to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and rifampicin in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Enterococcus faecalis*. *Int J Antimicrob Agents* 32:170-3.
14. Gomes Neto NJ, Luz Ida S, Tavares AG, Honorio VG, Magnani M, de Souza EL. 2012. *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its majority compound 1,8-cineole at sublethal amounts induce no direct and cross protection in *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. *Foodborne Pathog Dis* 9:1071-6.
15. Luz Ida S, Gomes Neto NJ, Tavares AG, Nunes PC, Magnani M, de Souza EL. 2012. Evidence for lack of acquisition of tolerance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028 after exposure to subinhibitory amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol. *Appl Environ Microbiol* 78:5021-4.
16. Becerril R, Nerin C, Gomez-Lus R. 2012. Evaluation of bacterial resistance to essential oils and antibiotics after exposure to oregano and cinnamon essential oils. *Foodborne Pathog Dis* 9:699-705.
17. Lu M, Dai T, Murray CK, Wu MX. 2018. Bactericidal property of oregano oil against multidrug-resistant clinical isolates. *Front Microbiol* 9:2329.
18. Utcharyakiat I, Surassmo S, Jaturanpinyo M, Khuntayaporn P, Chomnawang MT. 2016. Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. *BMC Complement Altern Med* 16:158.
19. Ramos JL, Martinez-Bueno M, Molina-Henares AJ, Teran W, Watanabe K, Zhang X, Gallegos MT, Brennan R, Tobes R. 2005. The TetR family of transcriptional repressors. *Microbiol Mol Biol Rev* 69:326-56.
20. Schniederberend M, Williams JF, Shine E, Shen C, Jain R, Emonet T, Kazmierczak BI. 2019. Modulation of flagellar rotation in surface-attached bacteria: A pathway for rapid surface-sensing after flagellar attachment. *PLoS Pathog* 15:e1008149.
21. O'Toole GA, Kolter R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30:295-304.
22. Marmont LS, Whitfield GB, Rich JD, Yip P, Giesbrecht LB, Stremick CA, Whitney JC, Parsek MR, Harrison JJ, Howell PL. 2017. PelA and PelB proteins form a modification and secretion complex essential for Pel polysaccharide-dependent biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 292:19411-19422.
23. Shaughnessy DT, Setzer RW, DeMarini DM. 2001. The antimutagenic effect of vanillin and cinnamaldehyde on spontaneous mutation in *Salmonella* TA104 is due to a reduction in mutations at GC but not AT sites. *Mutat Res* 480-481:55-69.
24. Fadli M, Chevalier J, Hassani L, Mezrioui NE, Pages JM. 2014. Natural extracts stimulate membrane-associated mechanisms of resistance in Gram-negative bacteria. *Lett Appl Microbiol* 58:472-7.
25. Pesingi PV, Singh BR, Pesingi PK, Bhardwaj M, Singh SV, Kumawat M, Sinha DK, Gandham RK. 2019. MexAB-OprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* offers resistance to carvacrol: a herbal antimicrobial agent. *Front Microbiol* 10:2664.
26. Starr LM, Fruci M, Poole K. 2012. Pentachlorophenol induction of the *Pseudomonas aeruginosa* mexAB-oprM efflux operon: involvement of repressors NalC and MexR and the antirepressor ArmR. *PLoS One* 7:e32684.
27. Ghosh S, Cremers CM, Jakob U, Love NG. 2011. Chlorinated phenols control the expression of the multidrug resistance efflux pump MexAB-OprM in *Pseudomonas aeruginosa* by interacting with NalC. *Mol Microbiol* 79:1547-56.
28. Braz VS, Furlan JP, Fernandes AF, Stehling EG. 2016. Mutations in NalC induce MexAB-OprM overexpression resulting in high level of aztreonam resistance in environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 363.
29. Llanes C, Hocquet D, Vogne C, Benali-Baitich D, Neuwirth C, Plésiat P. 2004. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1797-802.

30. Olivares Pacheco J, Alvarez-Ortega C, Alcalde Rico M, Martinez JL. 2017. Metabolic Compensation of Fitness Costs Is a General Outcome for Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Mutants Overexpressing Efflux Pumps. *mBio* 8.
31. Visvalingam J, Hernandez-Doria JD, Holley RA. 2013. Examination of the genome-wide transcriptional response of *Escherichia coli* O157:H7 to cinnamaldehyde exposure. *Appl Environ Microbiol* 79:942-50.
32. Rundell EA, Commodore N, Goodman AL, Kazmierczak BI. 2020. A Screen for Antibiotic Resistance Determinants Reveals a Fitness Cost of the Flagellum in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 202.
33. Roberts AE, Maddocks SE, Cooper RA. 2015. Manuka honey reduces the motility of *Pseudomonas aeruginosa* by suppression of flagella-associated genes. *J Antimicrob Chemother* 70:716-25.
34. Gabel CV, Berg HC. 2003. The speed of the flagellar rotary motor of *Escherichia coli* varies linearly with protonmotive force. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8748-51.
35. Burt SA, van der Zee R, Koets AP, de Graaff AM, van Knapen F, Gaastra W, Haagsman HP, Veldhuizen EJ. 2007. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 73:4484-90.
36. Laborda P, Alcalde-Rico M, Chini A, Martinez JL, Hernando-Amado S. 2021. Discovery of inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* virulence through the search for natural-like compounds with a dual role as inducers and substrates of efflux pumps. *Environ Microbiol* doi:10.1111/1462-2920.15511.
37. Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J. 2000. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288:1251-4.
38. Rosche WA, Foster PL. 2000. Determining mutation rates in bacterial populations. *Methods* 20:4-17.
39. Joshi N, Fass J. 2011. Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33) [Software]. available at <https://github.com/najoshi/sickle>.
40. Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754-60.
41. Garrison E, Marth G. 2012. Haplotype-based variant detection from short-read sequencing. arXiv:1207.3807 [q-bio.GN].
42. Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Hohna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* 61:539-42.
43. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. In Wayne (ed), 30th ed, vol M100, PA USA.
44. Richardot C, Juarez P, Jeannot K, Patry I, Plésiat P, Llanes C. 2016. Amino acid substitutions account for most MexS alterations in clinical *nfxC* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 60:2302-10.
45. Llanes C, Pourcel C, Richardot C, Plésiat P, Fichant G, Cavallo JD, Merens A, Group GS. 2013. Diversity of beta-lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 68:1763-71.
46. Vasseur P, Soscia C, Voulhoux R, Filloux A. 2007. PelC is a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane lipoprotein of the OMA family of proteins involved in exopolysaccharide transport. *Biochimie* 89:903-15.
47. Robert X, Gouet P. 2014. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res* 42:W320-4.
48. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J, Thompson JD, Higgins DG. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7:539.
49. Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, Lee DG, Drenkard E, Wu G, Villanueva J, Wei T, Ausubel FM. 2006. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2833-8.
50. Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 172:6557-67.
51. Lacks S, Greenberg B. 1977. Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *J Mol Biol* 114:153-68.
52. Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR. 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* 77:7347-51.
53. Kaniga K, Delor I, Cornelis GR. 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 109:137-41.

54. Hocquet D, Nordmann P, El Garch F, Cabanne L, Plésiat P. 2006. Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1347-51.
55. Jeannot K, Sobel ML, El Garch F, Poole K, Plésiat P. 2005. Induction of the MexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction. *J Bacteriol* 187:5341-6.
56. Dumas JL, van Delden C, Perron K, Köhler T. 2006. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol Lett* 254:217-25.

Funding: This work was supported by grants from the Region "Bourgogne Franche-Comté" and from the French cystic fibrosis associations "Vaincre la Mucoviscidose" and "Grégory Lemarchal".

Competing interests: Not declared.

Ethical approval: Not required.

Figure S1. Phylogenetic tree of CNA-adaptation mutants derived from PA14. Mutants CNA-A1 to A3 were selected with a fixed concentration (Method A) of CNA (900 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 10 days. Mutants CNA-B1 to B7 were selected on increasing CNA concentrations (Method B), after 5 days (CNA-B1, B2 and B3) or 10 days of exposure (CNA-B4, B5, B6 and B7). Posterior probability, representing the fraction of trees where this split is observed, is indicated at branches.

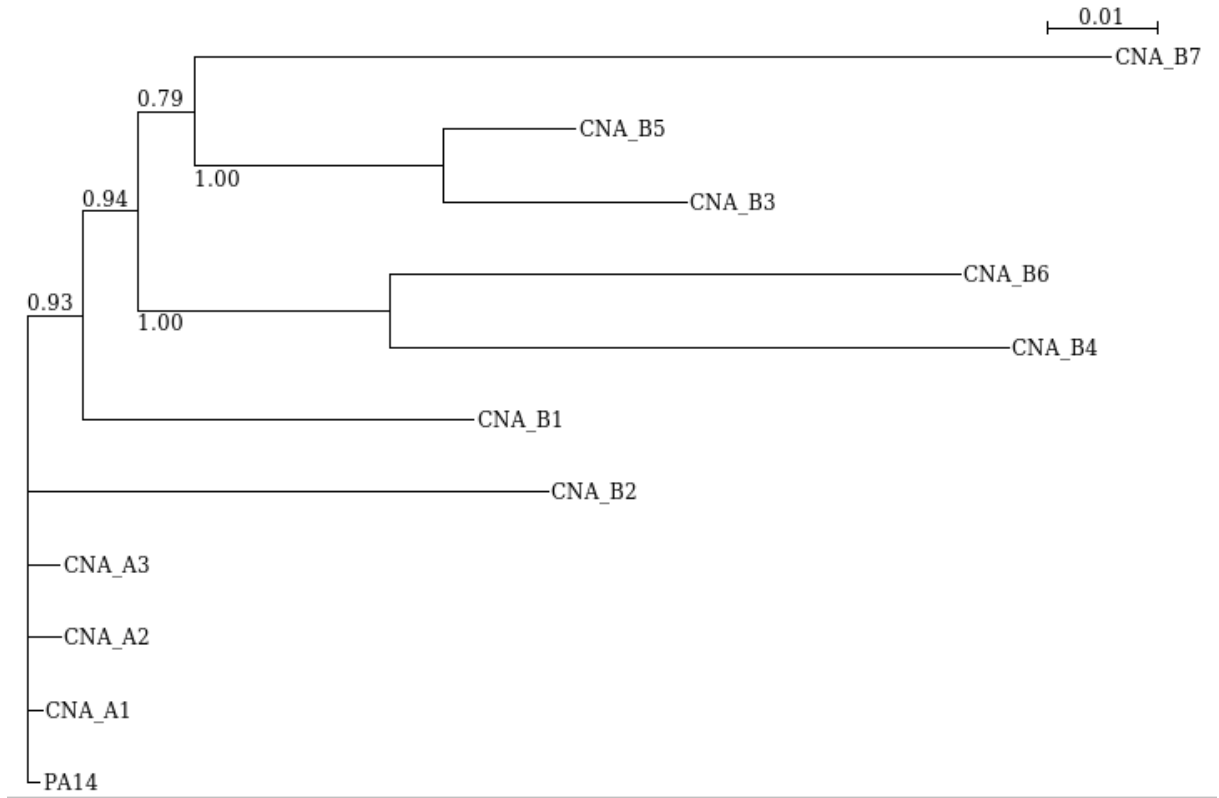


Figure S2: Structural alignment of NalC N-terminal region (1-108 over 209 amino acids) with representative TetR family proteins of known structures.

TetR from *Escherichia coli* (UniProt code P0ACT4; PDB code 1QPI), TetR from of *Mesorhizobium japonicum* (UniProt code Q98D70; PDB code 3BHQ), DesT from *Pseudomonas aeruginosa* (UniProt code Q9HUS3; PDB code 3LSP), LuxR from *Vibrio cholerae* (UniProt code B4X9Q4; PDB code 7AMN) and MtrR from *Neisseria gonorrhoea* (UniProt code P39897; PDB code 7JPN). Alignment was made with ESPrpt program (1). Predicted secondary structure of NalC model are shown above the sequences (α = helix α). Conserved residues are indicated in red and consensus residues are indicated in yellow. Mutation T24P in NalC is indicated with an arrow. NalC exhibits 24.4%, 20.9%, 23.4%, 20.7% and 20% of sequence identity with TetR *M. japonicum*, TetR *E. coli*, DesT, LuxR and MtrR, respectively (Clustal Omega; (2)).

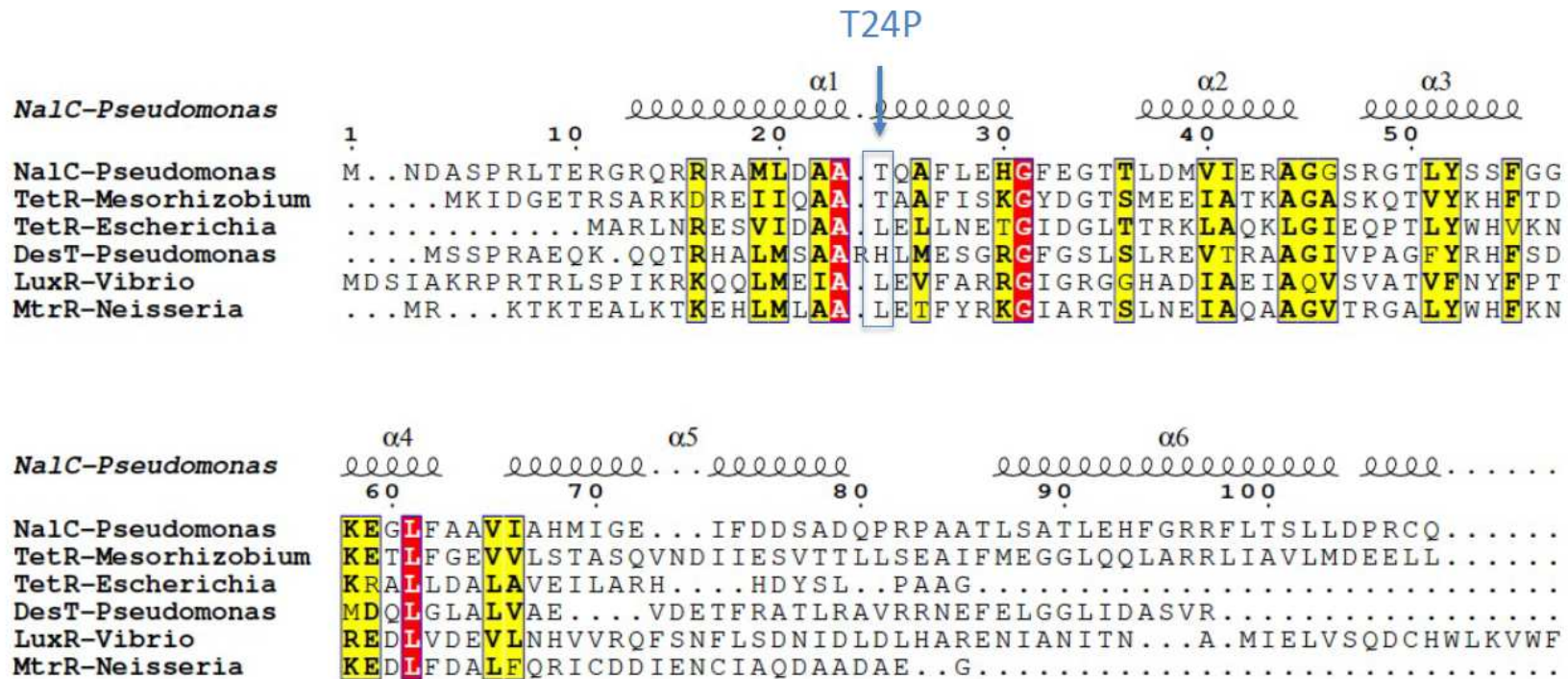


Figure S3: NaIC model (homodimer) with a cognate DNA. The model of NaIC homodimer in complex with DNA was generated based on the superposition of NaIC model with TetR-DNA crystal structure from *E. coli* (PDB code 1QIN) using PyMOL program (Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC). One of NaIC monomer is represented in rainbow colors (from N-terminal blue to C-terminal red). The α -helix numbering nomenclature is indicated according to TetR structure. Hydrogen bonds are shown in yellow dashed-line. According to the superposition of NaIC with TetR tetracycline binding pocket, NaIC putative binding pocket is indicated in pink. Enlargement of the substitution T24P region is shown below: possible hydrogen bond with R106 of helix α 7 and intra-chain hydrogen bond of helix α 1 will be lost after T24P substitution.

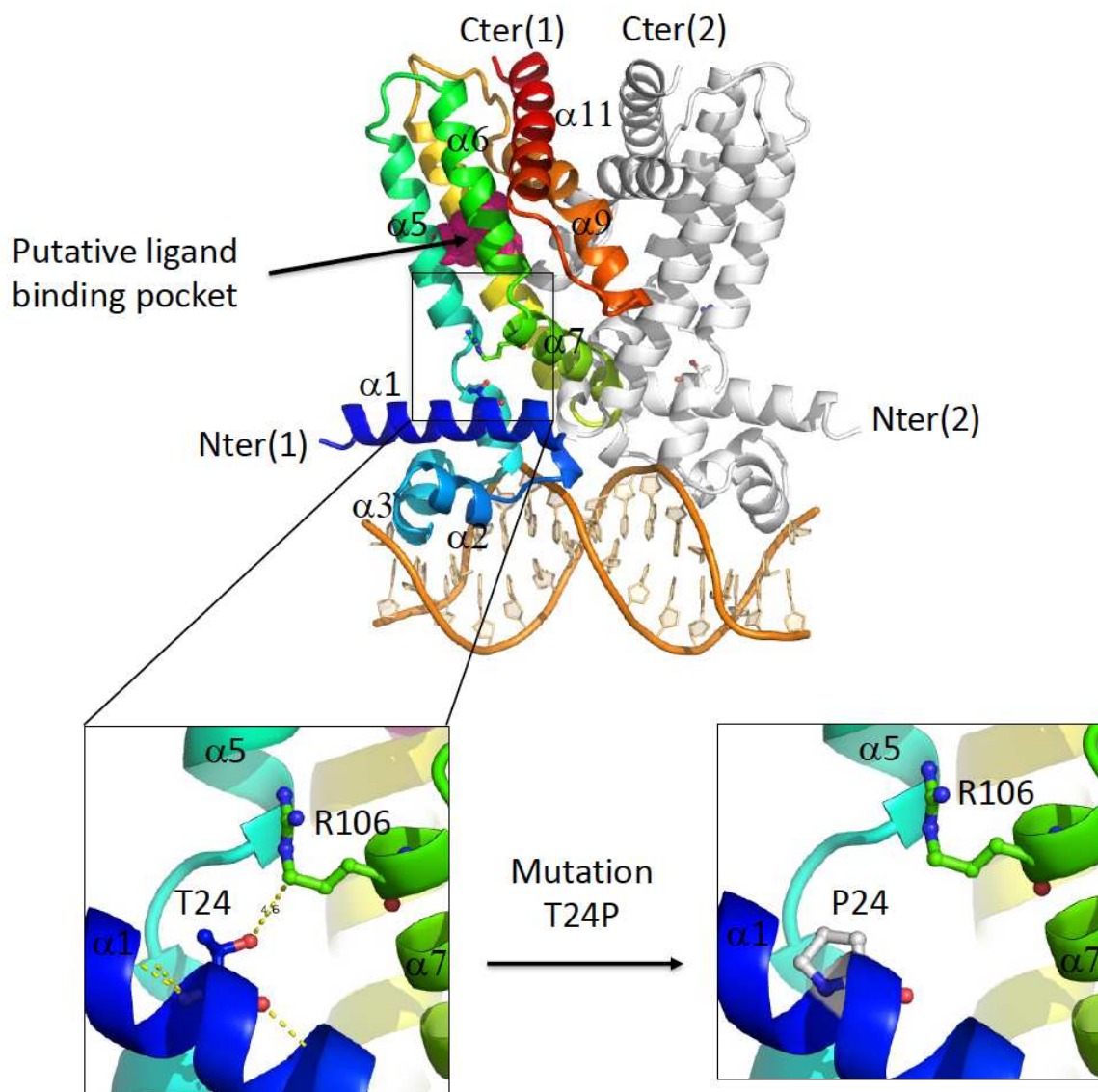


Table S1. Strains and plasmids used in the study.

Stains	Description	References
P. aeruginosa		
<u>Reference strain</u>		
PA14	Wild type reference strain, susceptible to antibiotics	(3)
PA14Δ <i>mexAB</i>	PA14-derived <i>mexAB</i> deleted mutant	(4)
PA14 <i>mexAB+</i>	Spontaneous MexAB-OprM overproducing mutant from PA14 exhibiting a 3-bp deletion in the repressor gene <i>mexR</i>	(4)
PA14Δ <i>fliE</i>	PA14-derived <i>fliE</i> deleted mutant	This study
<u>Mutants CNA-R</u>		
CNA-A1, A2, A3	PA14-derived CNA-R mutants obtained by method A after 10 days	This study
CNA-B1, B2, B3	PA14-derived CNA-R mutants obtained by method B after 5 days	This study
CNA-B4, B5, B6, B7	PA14-derived CNA-R mutants obtained by method B after 10 days	This study
B1ΔAB	CNA-B1 inactivated in genes <i>mexA</i> and <i>mexB</i>	This study
B3ΔAB	CNA-B3 inactivated in genes <i>mexA</i> and <i>mexB</i>	This study
B4ΔAB	CNA-B4 inactivated in genes <i>mexA</i> and <i>mexB</i>	This study
B5ΔAB	CNA-B5 inactivated in genes <i>mexA</i> and <i>mexB</i>	This study
B6ΔAB	CNA-B6 inactivated in genes <i>mexA</i> and <i>mexB</i>	This study
B7ΔAB	CNA-B7 inactivated in genes <i>mexA</i> and <i>mexB</i>	This study
E. coli		
DH5α	<i>F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻</i>	Invitrogen
CC118λ <i>pir</i>	CC118 lysogenic for phage λ <i>pir</i>	(5)
HB101	<i>subE44 subF58 hsdS3(r_B⁻ m_B⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	(6)
HB101(pRK2013)	Strain HB101 containing helper plasmid pRK2013 for conjugation (<i>mob1, tra1, colE1, Kan^R</i>)	(7)
CC118λ <i>pir</i> (pKNG101)	Strain CC118λ <i>pir</i> containing suicide vector pKNG101 (<i>oriR6K, sacB, Str^R</i>)	(8)

Kan^R, Str^R: selective plasmid markers conferring resistance to kanamycin and streptomycin, respectively.

Table S2: Primers used for gene inactivation and RT-qPCR experiments.

Primer	Sequence (5' → 3')	T _m (°C)	Source
Gene inactivation			
<i>ifliE_2</i>	CGCGAATTCCAGGTGATCAT	60	This study
<i>ifliE_2</i>	GCGCCGCGGAGAGCATTTCGAAAAGC	60	This study
<i>ifliE_3</i>	GCTCTCCGCGGCGCGAGGATAACTA	60	This study
<i>ifliE_4</i>	GTTGTTCAGGCTCGACACG	60	This study
RT-qPCR			
<i>armR-F</i>	CAACAAACCGTCCCGCACCGA	60	(4)
<i>armR-R</i>	TCAGTAGAAGTGCTCGCCGTAGAGG	60	
<i>mexB1</i>	ATCCGCCAGACCATCGCCA	60	(9)
<i>mexB2</i>	CATCACCAGGAACACGAGGAGG	60	
<i>mexY1A</i>	TTACCTCCTCCAGCGGC	60	(10)
<i>mexY1B</i>	GTGAGGCGCGGTTGTG	60	
<i>mexC1</i>	TGCGGATTTACCCAGACC	60	(11)
<i>mexC2</i>	GGCCAAGGTGCCTTTCTTCA	60	
<i>mexE4</i>	CCAGGACCAGCACGAACT	60	(11)
<i>mexE5</i>	CGACAACGCCAAGGGCGAGTTACC	60	
<i>rpsL3</i>	GCAACTATCAACCAGCTGGTG	60	(11)
<i>rpsL5</i>	GCTGTGCTCTGCAGTTGTG	60	

Table S3: 18 mutations found in mutant B1

PA number (PA14)	Ortholog (PA01)	Name	Mutation	Probable function
Transport				
PA14_01670	PA0136		D467G	probable ATP-binding component of ABC transporter
PA14_02410	PA0192		S673G	TonB-dependant receptor protein
PA14_26240	PA2923	<i>hisJ</i>	A9T	periplasmic histidine-binding protein HisJ
PA14_58440	PA4503	<i>dppB</i>	G114D	dipeptide ABC transporter permease DppB
DNA replication/repair				
PA14_00050	PA0004	<i>gyrB</i>	Q519R	DNA gyrase subunit B
PA14_17500	PA3620	<i>mutS</i>	indel	DNA mismatch repair protein MutS (interaction sur armZ)
Transcription and transcriptional regulation				
PA14_16280	PA3721	<i>nalC</i>	indel	transcriptional regulator NalC
PA14_32360	PA2497		indel	lysR family transcriptional regulator
PA14_34730	PA2312		G123D	XRE family transcriptional regulator
PA14_69390	PA5255	<i>algQ</i>	Indel	anti-RNA polymerase sigma 70 factor
Energy and metabolism				
PA14_38820	PA1986	<i>pqqB</i>	H246R	pyrroloquinoline quinone biosynthesis protein PqqB
PA14_52210	PA0932	<i>cysM</i>	T27A	cysteine synthase B
Cell wall integrity				
PA14_20580	PA3364	<i>amiC</i>	T233A	aliphatic amidase expression-regulating protein
PA14_66100	PA4999	<i>waal</i>	W282R	Hypothetical protein / O-antigen ligase, WaaL
Chemotaxis / stress response				
PA14_29760	PA2652/54	<i>(tlpQ)</i>	L561P	chemotaxis transducer
PA14_03720	PA0285		V525A	hypothetical protein (sensory box GGDEF domain-containing)
Conjugal transfer				
PA14_15540	No	<i>trbL</i>	indel	mating pair formation protein TrbL
Unknown function				
PA14_17580	PA3613		R661H	hypothetical protein

In bold, inactivating mutations.

Table S4: 16 mutations found in mutant B2

PA number (PA14)	Ortholog (PAO1)	Name	Mutation	Probable function
Transport				
PA14_02900	PA0235	<i>pcaK</i>	indel	4-hydroxybenzoate transporter
DNA replication/repair				
PA14_17500	PA3620	<i>mutS</i>	Q589R	DNA mismatch repair protein MutS (interaction sur armZ)
PA14_55670	PA4284	<i>recB</i>	N1172S	exodeoxyribonuclease V subunit beta
PA14_63010	PA4763	<i>recN</i>	T451A	DNA repair protein RecN
Transcription and transcriptional regulation				
PA14_08370	PA0652	<i>vfr</i>	Y65G	cAMP-regulatory protein / transcriptional regulator
PA14_14060	PA3860		P396L	AMP-binding protein
PA14_52740	PA0893	<i>argR</i>	P292S	transcriptional regulator ArgR
Translational machineries				
PA14_08750	PA4271	<i>rplL</i>	T78A	50S ribosomal protein L7/L12
Energy and metabolism				
PA14_19360	PA3460		indel	GNAT family acetyltransferase
PA14_40640	PA1846	<i>cti</i>	W441R	cis/trans isomerase
Virulence factors				
PA14_16250	PA3725	<i>lasB</i>	D365G	elastase LasB
PA14_32790	PA0041		T3644A	hypothetical protein (probable hemagglutinin)
PA14_50430	PA1082	<i>flgG</i>	P83L	flagellar basal body rod protein FlgG
Chemotaxis / stress response				
PA14_19340	PA3462		G189R	probable sensor/response regulator hybrid
Unknown function				
PA14_32930	PA2450		V21*	hypothetical protein
PA14_56620	PA4354		D4G	hypothetical protein
PA14_60590	PA4580		A68V	hypothetical protein

In bold, inactivating mutations

Table S5: 26 mutations found in mutant B3

PA number (PA14)	Ortholog (PAO1)	Name	Mutation	Probable function
Transport				
PA14_30600	PA2589		A300V	permease
PA14_58440	PA4503	<i>dppB</i>	G114D	dipeptide ABC transporter permease DppB
DNA replication/repair				
PA14_17500	PA3620	<i>mutS</i>	indel	DNA mismatch repair protein MutS (interaction with armZ)
PA14_39300	PA1949	<i>rbsR</i>	V320M	ribose operon repressor RbsR
PA14_55610	PA0669	<i>dnaE2</i>	G793S	error-prone DNA polymerase
Transcription and transcriptional regulation				
PA14_16280	PA3721	<i>nalC</i>	Indel	transcriptional regulator NalC
PA14_49680	PA1138		Indel	transcriptional regulator
PA14_11180	PA4074		Q259R	probable transcriptional regulator
Energy and metabolism				
PA14_02830	PA0230	<i>pcaB</i>	E239G	3-carboxy-cis, cis-muconate cycloisomerase
PA14_15030	PA3792	<i>leuA</i>	I464T	2-isopropylmalate synthase
PA14_37370	PA2098		A292V	esterase / deacetylase
PA14_73260	PA5556	<i>atpA</i>	D290G	FOF1 ATP synthase subunit alpha
Virulence factors				
PA14_24490	PA3063	<i>pelB</i>	S550G	hypothetical protein (pel operon)
PA14_50160	PA1100	<i>fliE</i>	Q54*	flagellar hook-basal body protein FliE
PA14_58570	6 orthologs		T735A	outer membrane ferric siderophore receptor
PA14_62350	PA4710	<i>phuR</i>	Y295C	heme/hemoglobin uptake outer membrane receptor PhuR
Chemotaxis / stress response				
PA14_28910	PA2726		F25L	radical activating enzyme
PA14_29760	PA2652/54	<i>(tlpQ)</i>	L561P	chemotaxis transducer
PA14_11340	PA4061	<i>ybbN</i>	F86S	thioredoxin
Unknown function				
PA14_21580	PA3283		N142S	hypothetical protein
PA14_41930	PA1749		indel	hypothetical protein
PA14_46140	PA1416		V208A	hypothetical protein
PA14_47120	PA1324		Indel	hypothetical protein
PA14_53390	PA0841		A304V	hypothetical protein
PA14_57470	PA4422		Indel	hypothetical protein
PA14_58070	PA4474		Y365C	hypothetical protein

In bold, inactivating mutations

Table S6: 35 mutations found in mutant B4

PA number (PA14)	Ortholog (PAO1)	Name	Mutation	Probable function
Transport				
PA14_33410	PA2420		V290A	Porin
PA14_58440	PA4503	<i>dppB</i>	G114D	dipeptide ABC transporter permease DppB
PA14_66400	PA5022	<i>kefA</i>	F722L	potassium efflux protein KefA
DNA replication/repair				
PA14_17500	PA3620	<i>mutS</i>	indel	DNA mismatch repair protein MutS (interaction with armZ)
PA14_26480	PA2907	<i>cobL</i>	S110P	precorrin-6γ-dependent methyltransferase CobL
PA14_39300	PA1949	<i>rbsR</i>	V320M	ribose operon repressor RbsR
PA14_68380	PA5176	<i>nudE</i>	Y45C	ADP-ribose diphosphatase NudE
Transcription and transcriptional regulation				
PA14_08780	PA4269	<i>rpoC</i>	K1172E	DNA-directed RNA polymerase subunit beta*chain
PA14_16280	PA3721	<i>nalC</i>	indel	transcriptional regulator NalC
PA14_21700	PA3271		W1071*	two-component sensor
PA14_23700	PA3124		indel	LysR family transcriptional regulator
PA14_46810	PA1351		indel	RNA polymerase ECF-subfamily sigma-70 factor
Translational machineries				
PA14_12350	PA3280	<i>yleA/miaB</i>	G200R	(dimethylallyl)adenosine tRNA methylthiotransferase
Energy and metabolism				
PA14_07580	PA0581	<i>ygiH</i>	V120A	glycerol-3-phosphate acyltransferase PlsY
PA14_22500	No		F87L	protein-disulfide isomerase
PA14_24860	PA3032	<i>snr1</i>	D28G	cytochrome c Snr1
PA14_33480	PA2414	<i>sndH</i>	V117A	L-sorbose dehydrogenase
PA14_34200	PA2355		N384S	FMNH ₂ -dependent monooxygenase
PA14_73300	PA5559	<i>atpE</i>	T23A	FOF1 ATP synthase subunit C
Cell wall integrity				
PA14_48000	3 orthologs		G278D	dihydrodipicolinate synthetase
Virulence factors				
PA14_05360	PA0411	<i>pilJ</i>	T403A	twitching motility protein
PA14_10140	PA4161	<i>fepG</i>	S177N	ferric enterobactin transport proteine
PA14_33630	PA2400	<i>pvdJ</i>	indel	protein PvdJ synthesis (unknown function)
PA14_50380	PA1085	<i>flgJ</i>	Q341R	flagellar rod assembly protein/muramidase FlgJ
Chemotaxis / stress response				
PA14_29760	PA2652/54	<i>(tlpQ)</i>	L561P	chemotaxis transducer
PA14_42220	PA1727	<i>mucR</i>	indel	membrane sensor domain-containing protein
PA14_11340	PA4061	<i>ybbN</i>	F86S	thioredoxin
Unknown function				
PA14_02060	PA0165		indel	hypothetical protein
PA14_04700	PA0360		H297R	hypothetical protein
PA14_30800	PA2575		L6P	hypothetical protein
PA14_55380	5 orthologs		G170D	hypothetical protein
PA14_62250	PA4703		L61P	hypothetical protein
PA14_63290	PA4788	<i>phaJ3</i>	L156P	hypothetical protein
PA14_66460	PA5027		L93S	hypothetical protein
PA14_70580	PA5346	<i>sadB</i>	T220A	hypothetical protein

In bold, inactivating mutations

Table S7: 24 Mutations found in mutant B5

PA number (PA14)	Ortholog (PAO1)	Name	Mutation	Probable function
Transport				
PA14_30600	PA2589		A300V	permease
PA14_58440	PA4503	<i>dppB</i>	G114D	dipeptide ABC transporter permease DppB
DNA replication/repair				
PA14_17500	PA3620	<i>mutS</i>	indel	DNA mismatch repair protein MutS (interaction with armZ)
PA14_39300	PA1949	<i>rbsR</i>	V320M	ribose operon repressor RbsR (purines synthesis)
Transcription and transcriptional regulation				
PA14_68630	PA5195		Q119R	heat shock protein
PA14_16280	PA3721	<i>nalC</i>	indel	transcriptional regulator NalC
Translational machineries				
PA14_08820	PA4266	<i>fusA1</i>	A225T	elongation factor G
Energy and metabolism				
PA14_02830	PA0230	<i>pcaB</i>	E239G	3-carboxy-cis, cis-muconate cycloisomerase
PA14_15030	PA3792	<i>leuA</i>	I464T	2-isopropylmalate synthase
PA14_63550	PA4809	<i>fdhE</i>	T255A	formate dehydrogenase accessory protein FdhE
PA14_73260	PA5556	<i>atpA</i>	D290G	FOF1 ATP synthase subunit alpha
Cell wall integrity				
PA14_73040	PA5538	<i>amiA</i>	R62W	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase
Virulence factors				
PA14_24490	PA3063	<i>pelB</i>	S550G	hypothetical protein (operon pel)
PA14_50160	PA1100	<i>fliE</i>	Q54*	flagellar hook-basal body protein FliE
PA14_62350	PA4710	<i>phuR</i>	Y295C	heme/hemoglobin uptake outer membrane receptor PhuR
Chemotaxis / stress response				
PA14_29760	PA2652/54	<i>(tlpQ)</i>	L561P	chemotaxis transducer
PA14_11340	PA4061	<i>ybbN</i>	F86S	thioredoxin
Unknown function				
PA14_21580	PA3283		N142S	Hypothetical protein
PA14_27560	PA2823		R271C	hypothetical protein
PA14_46140	PA1416		V208A	hypothetical protein
PA14_53390	PA0841		A304V	hypothetical protein
PA14_57470	PA4422		Indel	hypothetical protein
PA14_57680	PA4440		V146A	hypothetical protein
PA14_58070	PA4474		Y365C	hypothetical protein

In bold, inactivating mutations

Table S8: 35 mutations found in mutant CNA-B6

PA number (PA14)	Ortholog (PAO1)	Name	Mutation	Probable function
Transport				
PA14_10200	PA4156	<i>fvbA</i>	T59A	TonB-dependant receptor protein
PA14_45060	PA1497		G253S	transporter
PA14_58440	PA4503	<i>dppB</i>	G114D	dipeptide ABC transporter permease DppB
PA14_66400	PA5022	<i>kefA</i>	F722L	potassium efflux protein KefA
PA14_68060	PA5152		H256R	ABC transporter ATP-binding protein
DNA replication/repair				
PA14_15310	PA3770	<i>guaB</i>	P154S	inosine 5'-monophosphate dehydrogenase
PA14_17500	PA3620	<i>mutS</i>	indel	DNA mismatch repair protein MutS (interaction with armZ)
PA14_39300	PA1949	<i>rbsR</i>	V320M	ribose operon repressor RbsR
PA14_51650	No ortholog		Indel	integrase
PA14_68380	PA5176	<i>nudE</i>	Y45C	ADP-ribose diphosphatase NudE
PA14_72490	PA5493	<i>polA</i>	P609L	DNA polymerase I
Transcription and transcriptional regulation				
PA14_08780	PA4269	<i>rpoC</i>	K1172E	DNA-directed RNA polymerase subunit beta*chain
PA14_16280	PA3721	<i>nalC</i>	indel	transcriptional regulator NalC
PA14_16380	PA3711		V272A	LysR family transcriptional regulator
Translational machineries				
PA14-00180	PA0017		A253V	hypothetical protein (tRNA and rRNA cytosine C5-methylases)
Energy and metabolism				
PA14_10260	PA4150		A219T	dehydrogenase E1 component
PA14_11130	PA4079		V4A	short chain dehydrogenase / NADPH-dependant carbonyl reductase
PA14_38200	PA2035		V442A	thiamine pyrophosphate protein
PA14_51220	6 orthologs	<i>wapB</i>	Y192C	glycosyl transferase family protein - 1,2-glycosyltransferase WapB
PA14_53380	PA0842		G399E	glycosyl transferase family protein
Cell wall integrity				
PA14_56450	3 orthologs		P229L	amidase
Virulence factors				
PA14_05360	PA0411	<i>pilJ</i>	T403A	twitching motility protein
PA14_42660	PA1690	<i>pscU</i>	N263S	translocation protein in type III secretion
PA14_50380	PA1085	<i>flgJ</i>	Q341R	flagellar rod assembly protein/muramidase FlgJ
Chemotaxis / stress response				
PA14_21700	PA3271	<i>mxtR</i>	W1071*	two-component sensor
PA14_29760	PA2652/54	<i>(tlpQ)</i>	L561P	chemotaxis transducer
PA14_11340	PA4061	<i>ybbN</i>	F86S	thioredoxin
Unknown function				
PA14_00990	PA0082	<i>tssA1</i>	indel	hypothetical protein
PA14_02060	PA0165		Indel	hypothetical protein
PA14_27350	PA2842		L136P	hypothetical protein
PA14_55380	5 orthologs		G170D	hypothetical protein
PA14_57650	PA4438		T256A	hypothetical protein
PA14_60070	PA1939		S85P	hypothetical protein
PA14_62250	PA4703		L61P	hypothetical protein
PA14_73140	PA5546	<i>dppB</i>	Indel	hypothetical protein (conserved)

In bold, inactivating mutations

Table S9: 39 mutations found in mutant B7

PA number (PA14)	Ortholog (PA01)	Name	Mutation	Probable function
Transport				
PA14_06340	PA0487	<i>modR/modE</i>	I171T	probable molybdenum transport regulator
PA14_13170	PA3920	<i>copA1</i>	E150G	metal transporting P-type ATPase
PA14_15475	No ortholog	<i>merT</i>	L101P	Mercuric transport protein MerT
PA14_18275	PA3560	<i>fruA</i>	K236R	phosphotransferase system, transporter fructose-specific IIBC
PA14_21620	PA3279	<i>oprP</i>	V288A	phosphate-specific outer membrane porin OprP precursor
PA14_50550	PA1071	<i>livG/braF</i>	Indel	leucine/isoleucine/valine transporter ATP-binding
PA14_58440	PA4503	<i>dppB</i>	G114D	dipeptide ABC transporter permease DppB
DNA replication/repair				
PA14_00010	PA0001	<i>dnaA</i>	A338V	Chromosomal replication initiator protein
PA14_17500	PA3620	<i>mutS</i>	Indel	DNA mismatch repair protein MutS (interaction with armZ)
PA14_39300	PA1949	<i>rbsR</i>	V320M	ribose operon repressor RbsR
Translational machineries				
PA14_70420	PA5334	<i>rph</i>	T71I	ribonuclease PH
Energy and metabolism				
PA14_02830	PA0230	<i>pcaB</i>	E239G	3-carboxy-cis, cis-muconate cycloisomerase
PA14_35270	PA2266		V338A	cytochrome c precursor
PA14_35880	No ortholog		P321L	gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase
PA14_37470	PA2090		V125A	flavin-dependent oxidoreductase
PA14_50010			Indel	dehydrogenase
PA14_53220	PA0854	<i>fumC2</i>	G231S	fumarate hydratase
Transcription and transcriptional regulation				
PA14_16280	PA3721	<i>nalC</i>	Indel	transcriptional regulator NalC
Cell wall integrity				
PA14_11845	PA4020	<i>mpl</i>	P237S	UDP-N-acetylmuramate:L-alanyl-gamma-D-glutamyl- meso-
Virulence factors				
PA14_50160	PA1100	<i>fliE</i>	Q54*	flagellar hook-basal body protein FliE
PA14_63960	6 orthologs	<i>cntO</i>	L659P	cntO (TonB-dependant outer-membrane protein)
Chemotaxis / stress response				
PA14_11340	PA4061	<i>ybbN</i>	F86S	thioredoxin
PA14_21700	PA3271	<i>mxtR</i>	L1068P	two-component sensor
PA14_29760	PA2652/54	<i>(tlpQ)</i>	L561P	chemotaxis transducer
PA14_36020	No ortholog		Indel	paraquat-inducible protein B
PA14_58650	PA4520		T282A	chemotaxis transducer
PA14_72380	PA5483	<i>algB</i>	R307H	two-component response regulator AlgB
Unknown function				
PA14_03470	PA0267		L234F	hypothetical protein
PA14_13130	PA3923		P281L	hypothetical protein
PA14_15600	No ortholog		S4P	hypothetical protein
PA14_21580	PA3283		N142S	hypothetical protein
PA14_21630	PA3278		Indel	hypothetical protein
PA14_21710	PA3270		H171R	hypothetical protein
PA14_44100	PA1578		N234S	hypothetical protein
PA14_49030	No ortholog		Indel	hypothetical protein
PA14_50070	PA1106		Y204C	hypothetical protein
PA14_55380	5 orthologs		Q450R	hypothetical protein
PA14_58250	PA4489	<i>magD</i>	V898A	hypothetical protein
PA14_59480	No ortholog	<i>modR/modE</i>	V75A	hypothetical protein

In bold, inactivating mutations

References

1. Robert X, Gouet P. 2014. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res* 42:W320-4.
2. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J, Thompson JD, Higgins DG. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7:539.
3. Liberati NT, Urbach JM, Miyata S, Lee DG, Drenkard E, Wu G, Villanueva J, Wei T, Ausubel FM. 2006. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:2833-8.
4. Tetard A, Zedet A, Girard C, Plésiat P, Llanes C. 2019. Cinnamaldehyde induces expression of efflux pumps and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 63.
5. Herrero M, de Lorenzo V, Timmis KN. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 172:6557-67.
6. Lacks S, Greenberg B. 1977. Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *J Mol Biol* 114:153-68.
7. Ditta G, Stanfield S, Corbin D, Helinski DR. 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* 77:7347-51.
8. Kaniga K, Delor I, Cornelis GR. 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* 109:137-41.
9. Hocquet D, Nordmann P, El Garch F, Cabanne L, Plésiat P. 2006. Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1347-51.
10. Jeannot K, Sobel ML, El Garch F, Poole K, Plésiat P. 2005. Induction of the MexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction. *J Bacteriol* 187:5341-6.
11. Dumas JL, van Delden C, Perron K, Köhler T. 2006. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol Lett* 254:217-25.

3.2.3 Résultats complémentaires

Nous montrons dans ce travail que la résistance au CNA, induite ou acquise, passe le plus souvent par la surproduction de MexAB-OprM et que cette activation est dépendante du régulateur NalC. En clinique, certaines souches surproduisent de façon stable le système MexAB-OprM consécutivement à des mutations dans les gènes régulateurs *mexR*, *nalC* ou *nalD*. Toutefois, ces 3 voies d'activation ne sont pas équivalentes. Par Western Blot, il a été montré que MexB est moins produite chez un mutant *nalD* que chez un mutant *nalC*, et encore moins que chez un mutant *mexR*, les niveaux de résistance des mutants aux antibiotiques étant corrélés à ces niveaux de production (résistance à la novobiocine respectivement 2-fois, 4-fois et 8-fois celle de la souche parentale) (Evans *et al.*, 2001, Cao *et al.*, 2004, Sobel *et al.*, 2005). La voie NalC ne semble donc pas la plus efficace pour l'activation du système MexAB-OprM et l'obtention de niveaux importants de résistance. En ce sens, il nous semblait important de comprendre pourquoi la voie NalC est systématiquement sélectionnée en présence de CNA.

Pour répondre à cette question, nous avons construit différents mutants d'inactivation : PA14 Δ *mexR*, PA14 Δ *nalC*, PA14 Δ *nalD*, ainsi que les doubles mutants PA14 Δ *mexR* Δ *nalC*, PA14 Δ *mexR* Δ *nalD* et PA14 Δ *nalD* Δ *nalC*, tous surproducteurs de MexAB-OprM (**Figure 24**).

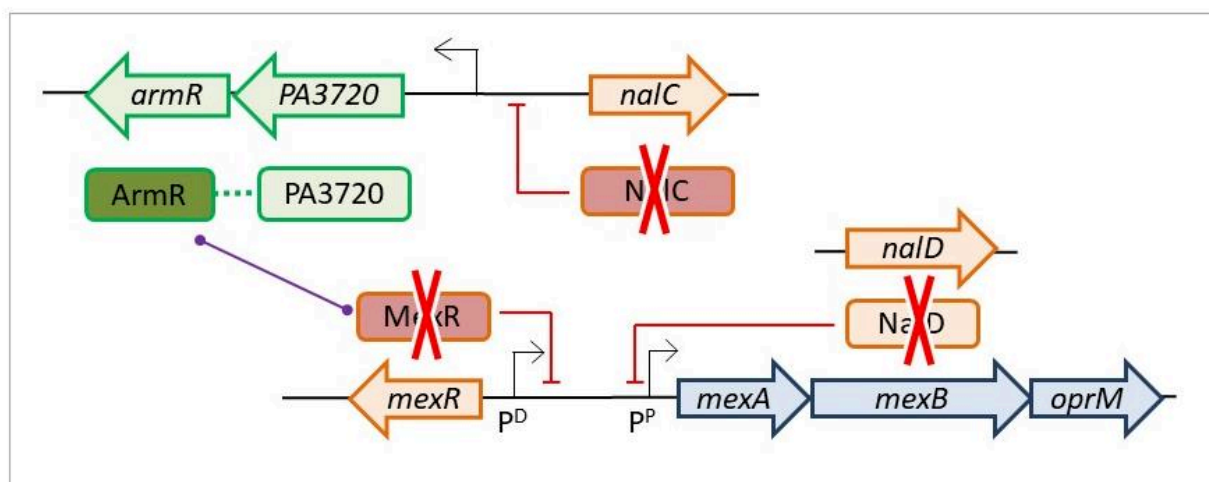


Figure 24 : Gènes régulateurs de l'opéron mexAB-oprM inactivés (croix rouge) par recombinaison homologue. L'inactivation d'au moins 1 de ces gènes conduit à la surexpression de mexAB-oprM. La double inactivation *mexR*-*nalD* libère les deux promoteurs P^D (Promoteur distal) et P^P (Promoteur proximal) de toute répression.

Notre but était (i) d'évaluer l'impact de ces inactivations sur les niveaux d'expression de *mexAB-oprM*, et (ii) de déterminer les niveaux de résistance aux antibiotiques substrats (par exemple, l'aztréonam) et au CNA de ces mutants.

Conformément aux données de la littérature (Llanes *et al.*, 2004), le niveau d'expression de *mexB* augmente d'environ 6-fois lorsque *mexR* est inactivé et d'environ 8-fois lorsque deux gènes régulateurs le sont (**Figure 25**).

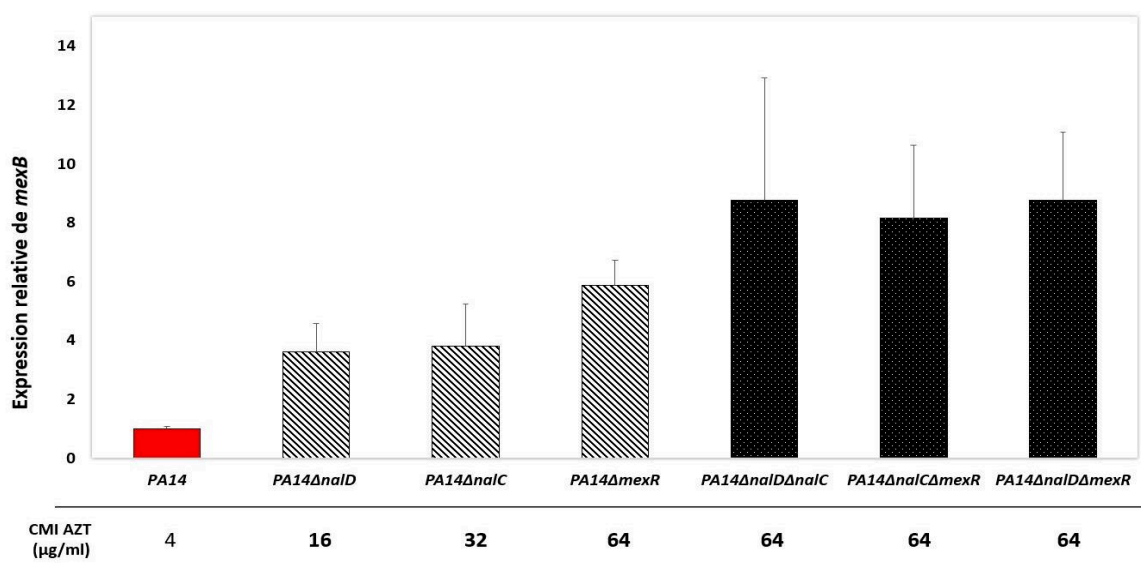


Figure 25 : Niveaux d'expression de mexB chez différents mutants mexAB+ dérivés de PA14 (en hachuré, les simples mutants et en pointillé, les doubles mutants). La CMI à l'aztréonam (AZT), substrat de MexAB-OprM, est indiquée en dessous (en gras, augmentation de la résistance par rapport à celle de PA14).

Cette observation est bien corrélée à une résistance plus élevée à l'aztréonam, maximale pour le mutant PA14ΔmexR, et qui n'augmente pas chez les doubles mutants lorsque la région promotrice de mexAB-oprM est libre de tout répresseur. Par contre, les tests de sensibilité au CNA (Figure 26) indiquent que le mutant PA14ΔnalC est le plus résistant au CNA, les doubles mutants montrant une résistance au CNA similaire à celle du mutant nalC.

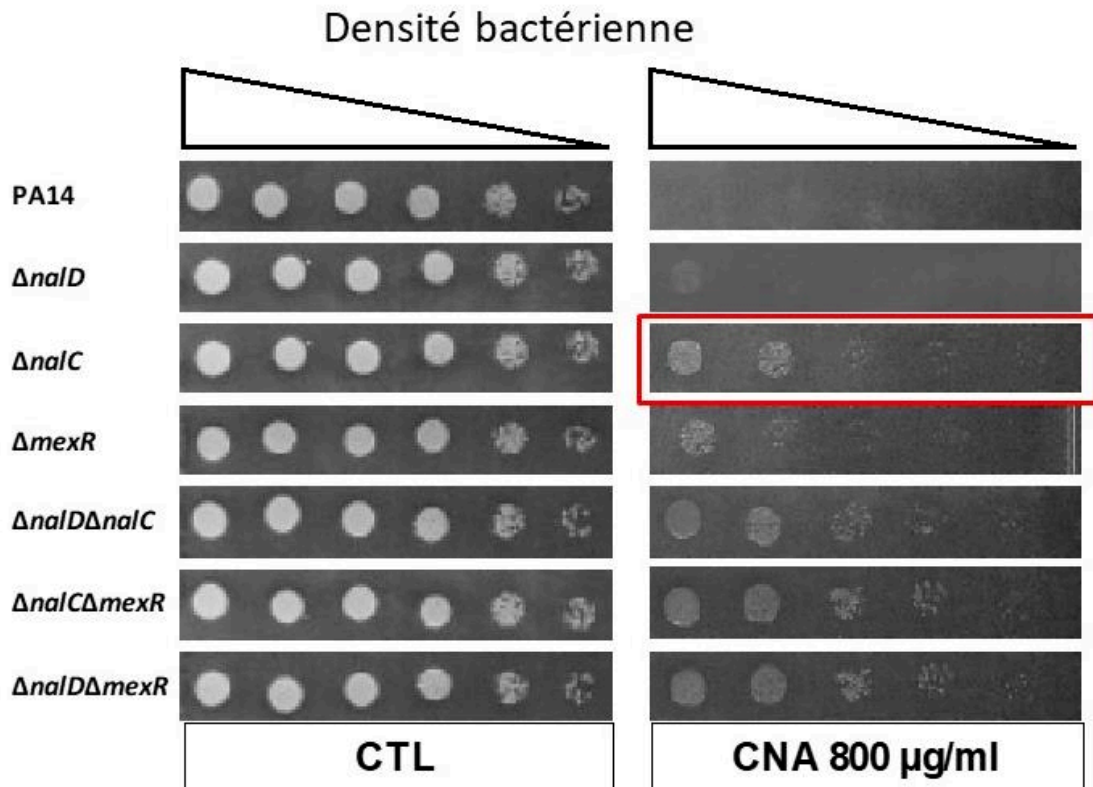


Figure 26 : Tests de sensibilité au CNA. Des spots de concentrations décroissantes en bactéries sont déposés sur une gélose contenant du CNA (800 µg/ml) ou non (CTL). Dans le cadre rouge : tolérance du mutant PA14 $\Delta nalC$ au CNA.

Ce résultat suggère que l'inactivation de *nalC* pourrait avoir un impact sur d'autres gènes en dehors de l'opéron PA3720-*armR* ou que le gène de fonction inconnue PA3720 pourrait améliorer la tolérance au CNA.

Ce travail a été réalisé avec le concours de Soumaya Aarras (Master Signalisation Cellulaire et Moléculaire, UFR Sciences et Techniques, Besançon).

3.3 Effet du citral, un électrophile naturel non-phénolique, sur la résistance

3.3.1 Contexte et résumé

Au regard des résultats obtenus précédemment avec l'alcool cinnamique, il apparaît que la perte du groupement aldéhyde du CNA empêche l'induction des systèmes d'efflux MexEF-OprN et MexXY/OprM. Pour confirmer ces observations, nous avons choisi de travailler avec une molécule portant un groupement aldéhyde (comme dans le cas du CNA) mais dépourvue de cycle phénolique : le citral. Présent dans l'HE de citronnelle, de citron et d'orange, le citral est décrit comme un composé bactéricide, tout particulièrement vis-à-vis des bactéries à Gram positif (Inouye *et al.*, 2001). Nous avons donc cherché à savoir si le citral pouvait augmenter la résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques et si les systèmes d'efflux MexEF-OprN et MexXY/OprM étaient impliqués dans ce processus.

Confirmant les données de la littérature, le pouvoir inhibiteur du citral s'est avéré très limité chez les bactéries à Gram négatif testées, avec une CMI de 8 mg/mL chez la souche de référence *P. aeruginosa* PA14. Malgré cette faible activité, le citral, utilisé à des concentrations comprises entre 0,5 et 4 mg/mL, a montré des effets antagonistes avec certains antibiotiques (CMI x 2-8), tels que les aminosides, la colistine et les fluoroquinolones. Des expériences de RT-qPCR ont confirmé que cet effet repose partiellement sur la surproduction des systèmes d'efflux MexXY/OprM et MexEF-OprN, un phénomène transitoire en raison de la dégradation du citral par la bactérie, totale après 3 heures d'exposition.

Toutefois, le traitement par le citral de mutants dans lesquels ces deux pompes ont été inactivées (PA14 Δ EFN et PA14 Δ XY) ne supprime pas totalement l'antagonisme avec les aminosides et la colistine, ce qui suggère l'implication d'autres phénomènes. Par ailleurs, le même antagonisme a été observé chez d'autres espèces à Gram négatif (*E. coli*, *A. baumannii*, *P. putida*) dépourvues naturellement de ces deux pompes d'efflux. Or, le point commun entre les aminosides et la colistine est leur interaction avec les charges négatives des groupements phosphate des LPS, une étape qui leur permet de traverser la membrane externe et d'atteindre leur cible intracellulaire. Afin de vérifier si le citral masque ou non les charges des LPS, nous avons mesuré le potentiel Zeta de bactéries exposées à différentes concentrations de citral et/ou d'antibiotiques. Il apparaît que le citral modifie très peu la charge de surface (de -40 mV à -35 mV) comparativement aux aminosides et à la colistine (qui font passer la valeur du potentiel Zeta de -40 mV à -5 mV), contredisant de fait l'hypothèse d'une entrave à la pénétration des antibiotiques par le citral.

Par contre, le citral étant un aldéhyde, il peut former spontanément une liaison avec une ou plusieurs des fonctions amines des antibiotiques (aminosides et colistine), entraînant la formation d'une base de Schiff. La formation de cette fonction imine, stabilisée par le grand nombre de molécules de citral (ratio tobramycine-citral 1/3000 et colistine-citral 1/600), a été prouvée par Spectroscopie Raman : la disparition de la liaison aldéhyde C=O du citral au profit

de la liaison imine C=N du complexe s'observe à 37°C dès la première heure de contact. En outre, l'incubation pendant 3 à 24h de la colistine, de la tobramycine ou de la gentamicine avec du citral avant leur utilisation augmente leur CMI jusqu'à 32 fois, ce qui prouve que la formation de ces complexes inactive ces antibiotiques polycationiques. Ce phénomène n'est pas observé avec un antibiotique non-aminé tel que la ticarcilline.

Enfin, pour mesurer l'activité résiduelle de la base de Schiff formée, un complexe de tobracitryl (tobramycine:citral) a été synthétisé (1:1) puis réduit, de façon à stabiliser la liaison C=N qui s'hydrolyse spontanément en milieu aqueux. Il apparaît que le tobracitryl ne montre plus aucune activité sur *P. aeruginosa* PA14 par diffusion en milieu gélosé par comparaison avec la tobramycine (disque à 30 µg) et que la CMI de ce composé est plus de 32-fois supérieure à celle de la tobramycine.

Les principaux résultats de cette étude sont schématisés dans la **Figure 27**.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Andy Zedet et Yann Pellequer (laboratoire PEPITE, EA4267, Besançon) pour les expérimentations de chromatographie et de mesure du potentiel Zeta, Sarah Foley, Freddy Torrealba Anzola et Christophe Rameseyer (laboratoire Chrono-Environnement, UMR CNRS 6249, Besançon) pour l'analyse RAMAN, Jean-Michel Brunel (laboratoire Membranes et Cibles Thérapeutiques UMR INSERM MD1, Marseille) pour la synthèse du tobracitryl et Gaétan Mislin (laboratoire Métaux et microorganismes, UMR CNRS 7242, Strasbourg) pour l'analyse des adduits par RMN.

Huiles essentielles : effets du citral sur la résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa*

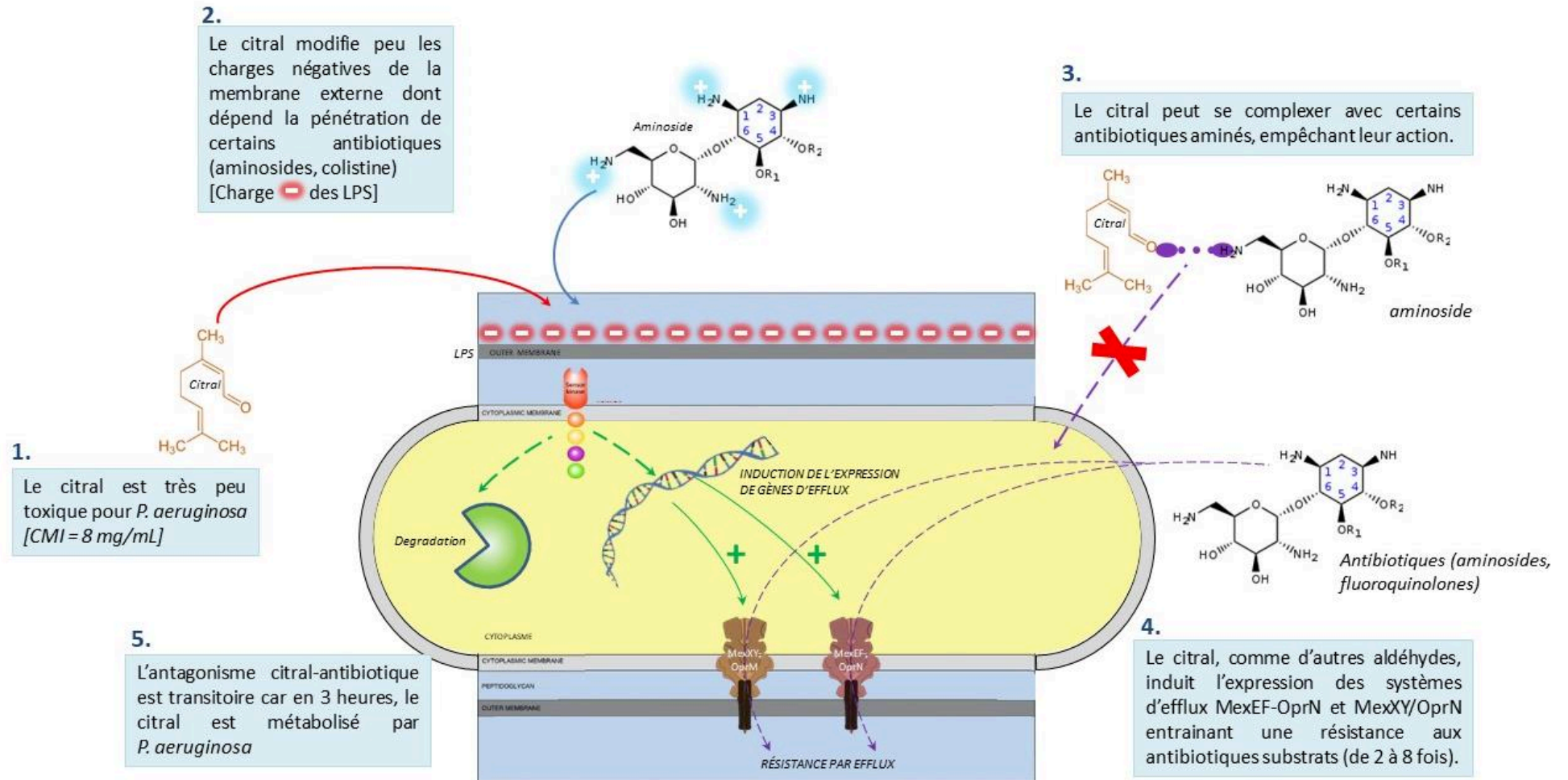


Figure 27 : Schéma récapitulatif de l'effet du citral sur la résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa*

3.3.2 Article



Negative Impact of Citral on Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to Antibiotics

Alexandre Tetard¹, Sarah Foley¹, Gaëtan L. A. Mislin², Jean-Michel Brunel³, Estefania Oliva⁴, Freddy Torrealba Anzola¹, Andy Zedet⁵, Bruno Cardey¹, Yann Pellequer⁵, Christophe Ramseyer¹, Patrick Plésiat^{1,6} and Catherine Llanes^{1*}

¹ UMR CNRS 6249 Chrono-Environnement, Université Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France, ² CNRS/Université de Strasbourg UMR 7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, Illkirch, France, ³ UMR_MD1, U-1261, Aix Marseille Université, INSERM, SSA, MCT, Marseille, France, ⁴ Plateforme d'Analyse Chimique de Strasbourg-Illkirch (PACSI), Faculté de Pharmacie de Strasbourg, Illkirch, France, ⁵ PEPITE EA4267, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France, ⁶ Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques, Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, Besançon, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Xian-Zhi Li,
Health Canada, Canada

Reviewed by:

Yuji Morita,
Meiji Pharmaceutical University, Japan
Patrick Kyle Taylor,
Simon Fraser University, Canada

*Correspondence:

Catherine Llanes
cllanesb@univ-fcomte.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Antimicrobials, Resistance
and Chemotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 14 May 2021

Accepted: 11 June 2021

Published: 05 July 2021

Citation:

Tetard A, Foley S, Mislin GLA,
Brunel J-M, Oliva E,
Torrealba Anzola F, Zedet A,
Cardey B, Pellequer Y, Ramseyer C,
Plésiat P and Llanes C (2021)
Negative Impact of Citral on
Susceptibility of *Pseudomonas
aeruginosa* to Antibiotics.
Front. Microbiol. 12:709838.
doi: 10.3389/fmicb.2021.709838

Essential oils (EOs) or their components are widely used by inhalation or nebulization to fight mild respiratory bacterial infections. However, their interaction with antibiotics is poorly known. In this study we evaluated the effects of citral, the main component of lemongrass oil, on *in vitro* susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics. Exposure of strain PA14 to subinhibitory concentrations of citral increased expression of operons encoding the multidrug efflux systems MexEF-OprN and MexXY/OprM, and bacterial resistance to anti-pseudomonal antibiotics including imipenem (twofold), gentamicin (eightfold), tobramycin (eightfold), ciprofloxacin (twofold), and colistin (≥ 128 -fold). Use of pump deletion mutants showed that in addition to efflux other mechanisms were involved in this citral-induced phenotype. Determination of Zeta potential suggested that citral impairs the cell surface binding of aminoglycosides and colistin used at low concentrations (≤ 10 $\mu\text{g/mL}$). Moreover, experiments based on Raman spectroscopy and high-resolution mass spectrometry demonstrated formation of a Schiff base between the aldehyde group of citral and amino-groups of tobramycin and colistin. Chemical synthesis of tobracitryl, the imine compound resulting from condensation of citral and tobramycin, confirmed the loss of antibiotic activity due to adduct formation. Altogether these data point to the potential risk concern of self-medication with EOs containing citral in patients suffering from *P. aeruginosa* chronic lung infections and being treated with aerosols of aminoglycoside or colistin.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, essential oils, citral, antibiotic resistance, efflux, tobramycin-citral Schiff base, colistin-citral Schiff base

INTRODUCTION

Essential oils (EOs) are complex mixtures of volatile compounds, produced by plants. Some possess antimicrobial activities, and are thus commonly used as self-medication to treat mild respiratory infections (Inouye et al., 2001). Noteworthy, an increasing number of studies suggest that EOs could be useful as adjunctive therapy in cystic fibrosis (CF) patients chronically infected with

Haemophilus influenzae (Balazs et al., 2019), *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* (Pesavento et al., 2016), or *Pseudomonas aeruginosa* (Ragno et al., 2020). For instance, extracts of bay, cinnamon, clove, pimento, thyme, rosemary, oregano and lemongrass have been reported to inhibit *in vitro* the growth of *P. aeruginosa*, a major pathogen in CF lung (Hammer et al., 1999; Swamy et al., 2016). However, clinical evidence that such EOs or their components would have the same efficacy *in vivo* is lacking.

The main constituent of lemongrass oil, citral, is actually a mixture of two isomeric acyclic monoterpene aldehydes (C₁₀H₁₆O): geranial (*trans*-citral or citral A), and neral (*cis*-citral or citral B). This common flavor compound occurs at various concentrations in *Citrus* oil, as well as in leaves and fruits of myrtle trees, basil, lemon, lime, lemongrass, orange, and bergamot. Despite its moderate volatility, citral exhibits an interesting antipseudomonal activity by gaseous contact, close to that of cinnamaldehyde, another aldehyde present in cinnamon bark oil (Inouye et al., 2001). However, when in solution, citral appears to be more active on Gram positive bacteria (MIC of 0.1 mg/mL for *Staphylococcus aureus*) than on Gram negatives (MIC \geq 0.5 mg/mL) (Hyltdgaard et al., 2012; Shi et al., 2016; Gupta et al., 2017; Thielmann and Muranyi, 2019). In the foodborne pathogen *Cronobacter sakazakii*, this aldehyde triggers pleiotropic effects including a shift in ATP concentration, acidification of the cytosol, cell membrane hyperpolarization, and damages to the cell wall, that would result in or contribute to cell death (Shi et al., 2016). Beside these alterations, citral is able to lower the production of virulence factors in *Vibrio parahaemolyticus* (Sun et al., 2019) and *C. sakazakii* (Shi et al., 2017), as well as to prevent the synthesis of quorum sensing auto-inducer *N*-dodecanoyl-L-homoserine lactone in *Pseudomonas putida* (Jaramillo-Colorado et al., 2012). Because of these different properties, citral might have potential applications in the treatment of some bacterial infections (Shah et al., 2011).

In the context of CF, lemongrass oil (that contains about 65–85% citral) was found to inhibit the *in vitro* growth of drug resistant strains belonging to the *Burkholderia cepacia* complex (Vasireddy et al., 2018). On *P. aeruginosa*, its effects ranged from negligible (MIC > 17 mg/mL) (Cox and Markham, 2007) to mild (MIC = ~ 9 mg/mL) (Hammer et al., 1999). Other EOs known to contain citral (lemon, bergamot, orange, myrtle, and basil oils) yielded similar results on CF or reference strains (Ragno et al., 2020). Likely accounting for this poor activity, *P. aeruginosa* together with other *Pseudomonas* sp. such as *P. citronellolis* and *P. mendocina*, is able to degrade citral and to use it as sole source of carbon and energy (Cantwell et al., 1978; Hoschle and Jendrossek, 2005). In addition, recent studies demonstrated that *P. aeruginosa* copes with the toxic effects of EOs by overproducing RND efflux pumps, a family of polyspecific transporters that plays a major role in both natural and acquired resistances to antibiotics (Papadopoulos et al., 2008; Pesingi et al., 2019; Tetard et al., 2019). For example, we found that subinhibitory concentrations of cinnamaldehyde (from cinnamon bark oil) result in an electrophilic stress to which *P. aeruginosa* adapts by upregulating not less than four RND pumps: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, and

MexXY/OprM. This general increase in cell efflux activity is associated with a higher resistance of *P. aeruginosa* to β -lactams (via MexAB-OprM), aminoglycosides (via MexXY/OprM), and fluoroquinolones (all systems) (Tetard et al., 2019). Activation of the *mexXY* and *mexEF-oprN* operons was lost when cinnamaldehyde was substituted in the culture medium with its catabolite cinnamic alcohol, a result that highlights the role of aldehyde group in cell stress.

In this work, we studied the impact of the acyclic aldehyde citral on the susceptibility of *P. aeruginosa* to several antibiotics commonly prescribed to treat CF lung infections. While citral has a limited antimicrobial activity on *P. aeruginosa* by itself, it may have antagonistic effects when combined with antibiotics. An efflux-independent mechanism is proposed to explain some of these adverse effects.

RESULTS AND DISCUSSION

P. aeruginosa Is Highly Resistant to Citral

Susceptibility of reference (PA14, PAO1, LESB58) and environmental strains (1341, 1393, 1423) was first assayed by the disk diffusion method (Supplementary Figure 1). As no inhibition zone appeared around disks loaded with 5 μ L (4.44 mg) citral, we monitored the growth of PA14 exposed to increasing concentrations of the compound. After 5 h, no visible growth developed in presence of 8 mg/mL citral, while lower concentrations (4 or 2 mg/mL) slowed down the bacterial multiplication (Figure 1). After 18 h, only the culture exposed to 16 mg/mL remained negative (data not shown). In comparison, the MIC of cinnamaldehyde was more than 20-fold lower (0.7 mg/mL) for PA14, confirming the weak toxicity of citral on *P. aeruginosa*.

Citral Induces Efflux Pumps Expression and Antibiotic Resistance in *P. aeruginosa*

Exposure of *P. aeruginosa* to some EO components (such as cinnamaldehyde), triggers a complex adaptive response that in part relies on a fast increase in efflux activity (Tetard et al., 2019). We thus assessed the impact of citral on the expression of four RND efflux operons known to mediate antibiotic resistance in this species, namely *mexAB-oprM*, *mexCD-oprJ*, *mexEF-oprN*, and *mexXY* (Li et al., 2015). Relative expression levels of representative genes *mexB*, *mexC*, *mexE*, and *mexY* were determined in strain PA14 by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) at different time points of citral exposure. As shown in Figure 2, *mexE* and *mexY* were activated in the bacteria challenged with sub-minimal inhibitory concentrations (subMICs) of citral (2 and 4 mg/mL). Their expression peaked rapidly (30 min) and then dropped (60 min) below the threshold level. Likely accounting for this transient gene induction, citral was rapidly degraded by strain PA14 after 1 h of incubation (Figure 3A), as it is consumed by the bacterium as source of carbon and energy (Figure 3B). In contrast, a weak impact on *mexB* and *mexC* activity was documented in cultures with

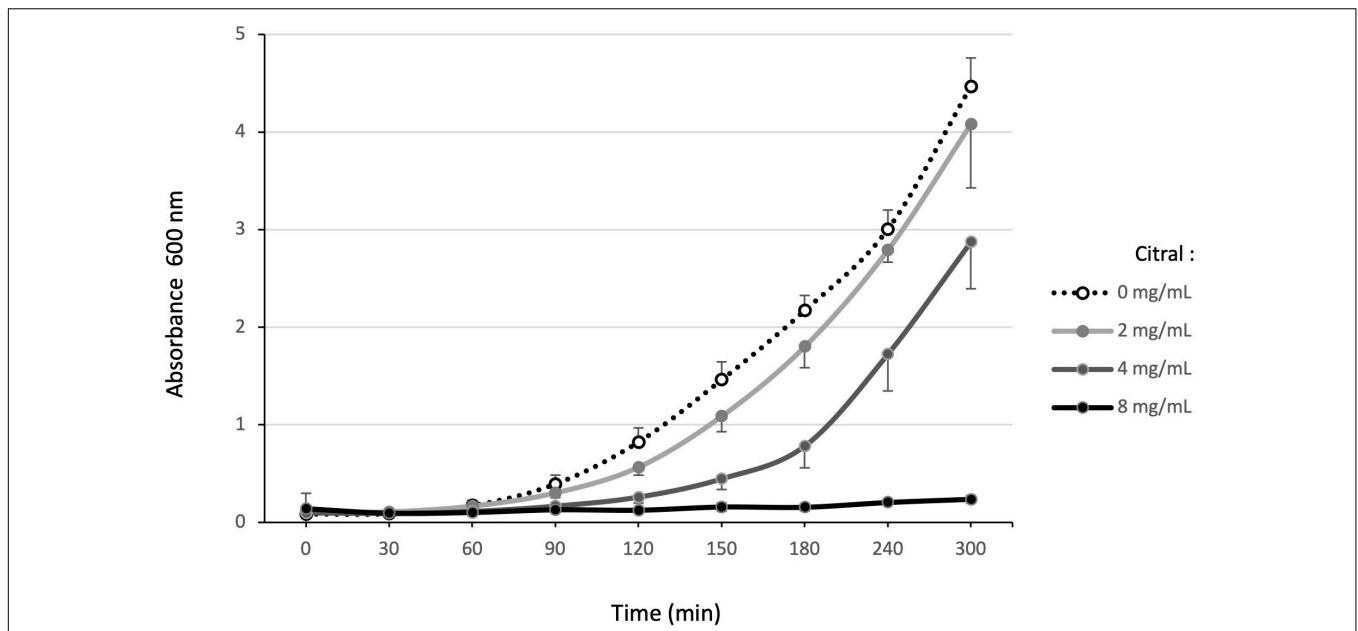


FIGURE 1 | Effect of increasing citral concentrations on *P. aeruginosa* reference strain PA14. Bacterial growth in MHB supplemented with different concentrations of citral (0, 1, 2, 4, and 8 mg/mL) was monitored at $A_{600\text{ nm}}$ over 5 h. The results presented are mean values, calculated from three independent bacterial cultures.

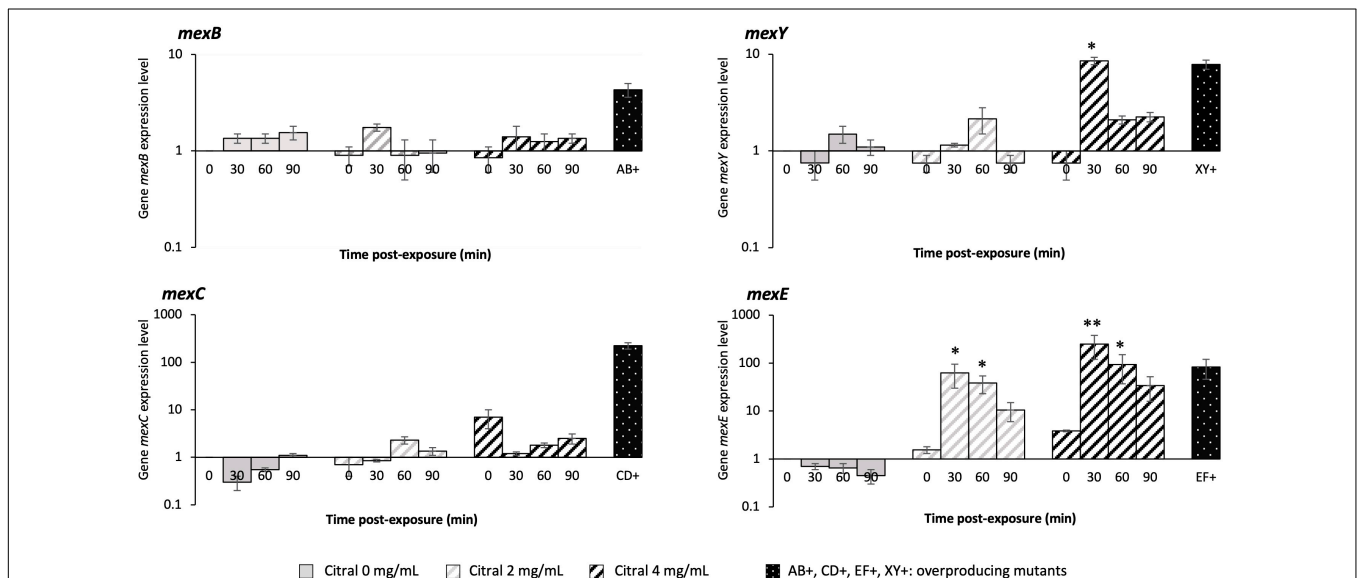


FIGURE 2 | Relative expression levels of *P. aeruginosa* genes *mexB*, *mexC*, *mexE*, and *mexY*. Gene transcripts were measured over time by RT-qPCR in strain PA14 exposed to 0, 2, and 4 mg/mL citral. The genes were considered as activated (single asterisk) when their expression was ≥ 3 -fold (*mexB*), ≥ 5 -fold (*mexY*), and ≥ 20 -fold (*mexE* and *mexC*) that of unexposed PA14 at t_0 . A double asterisk indicates when mRNA amounts were higher than those of efflux overproducing mutants PA14*mexAB*⁺ (*mexB*: 3.6-fold that of PA14), PA14*mexCD*⁺ (*mexC*: 257-fold), PA14*mexEF*⁺ (*mexE*: 47-fold), and PA14*mexXY*⁺ (*mexY*: 8.7-fold), derived from parental strain PA14. Values are means of two independent experiments each including two technical replicates.

citral, these genes being overexpressed 2.5- and 31-fold less than the levels of control mutants constitutively overexpressing the corresponding pumps, respectively.

Because overproduction of MexEF-OprN and MexXY/OprM results in an increased drug resistance in *P. aeruginosa* (Llanes et al., 2011; Guenard et al., 2014), we determined

the susceptibility of strain PA14 to various antibiotics in the presence and absence of citral, by the microdilution method (Table 1). Consistent with operon *mexEF-oprN* being overexpressed, MICs of ciprofloxacin and chloramphenicol increased 2- and >32-fold, respectively upon citral exposure (2 or 4 mg/mL). Resistance of PA14 also increased twofold to

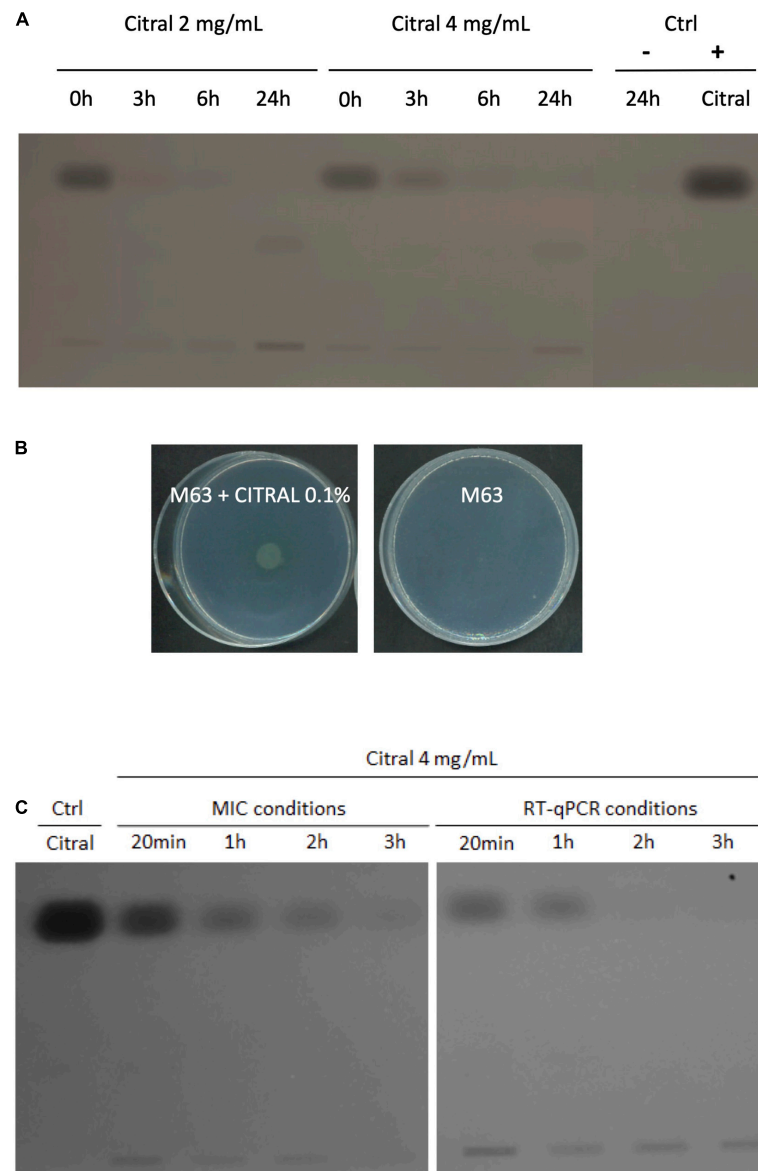


FIGURE 3 | Degradation of citral by *P. aeruginosa* strain PA14. **(A)** TLC analysis of culture supernatants of strain PA14 after 0, 3, 6, and 24 h of incubation with 2 or 4 mg/mL citral. Ctrl: supernatant of PA14 growth medium without citral after 24 h (-), citral control sample 5 μ g (+). **(B)** Growth of PA14 on minimal medium M63 with or without citral as sole carbon source (after 48 h at 37°C). **(C)** TLC analysis of citral consumption by using an initial inoculum of 5.10^5 CFU/mL (MICs conditions) or $1.5.10^8$ CFU/mL (RT-qPCR conditions) in MHB.

imipenem, while it decreased twofold to ticarcillin, likely because of inverse coregulation of MexEF-OprN with carbapenem-specific porin OprD and pump MexAB-OprM, respectively (Maseda et al., 2004; Sobel et al., 2005; **Table 1**). In addition, MICs of aminoglycosides (tobramycin and gentamicin), which are exported by MexXY/OprM, augmented up to eightfold in cultures exposed to 4 mg/mL citral. Supporting the notion of reversible adaptive response to the presence of the aldehyde, PA14 cells recovered their wild-type susceptibility phenotype when subcultured in citral-free medium (for example, to tobramycin, **Figure 4**). It should be noted that while RT-qPCR

experiments demonstrated a relatively brief induction of operons *mexEF-oprN* and *mexXY* by citral (about 1 h), the impact of the aldehyde on antibiotic resistance (MICs) persisted much longer (18 h post-exposure). Because higher bacterial densities (1.5×10^8 CFU/mL) are needed for gene expression assays than in MIC experiments (5×10^5 CFU/mL), citral is rapidly metabolized under the RT-qPCR culture conditions, resulting in rapid decline of the stressor in the growth medium. In contrast, its presence in drug susceptibility testing conditions was still detected by thin layer chromatography (TLC) after 3 h of incubation (**Figure 3C**).

Efflux Is Not the Only Mechanism Interfering With Antibiotic Activity

To better assess the role of efflux pumps in citral-promoted resistance to antibiotics, we used PA14 mutants harboring single or dual deletions of operons *mexEF-oprN* and *mexXY* (PA14ΔEFN, PA14ΔXY, and PA14ΔEFN/XY, respectively) (Table 1). As expected, inactivation of *mexEF-oprN* completely abolished the development of ciprofloxacin resistance in mutant PA14ΔEFN exposed to citral. On the other hand, deletion of *mexXY* had a more limited impact on aminoglycosides MIC variations (compare PA14 with PA14ΔXY) and virtually

no effect on colistin resistance, suggesting that additional causes contribute to the loss antibiotic activity under citral exposure (Table 1).

Citral Reduces Cell Surface Binding of Aminoglycosides and Colistin at Low Antibiotic Concentrations

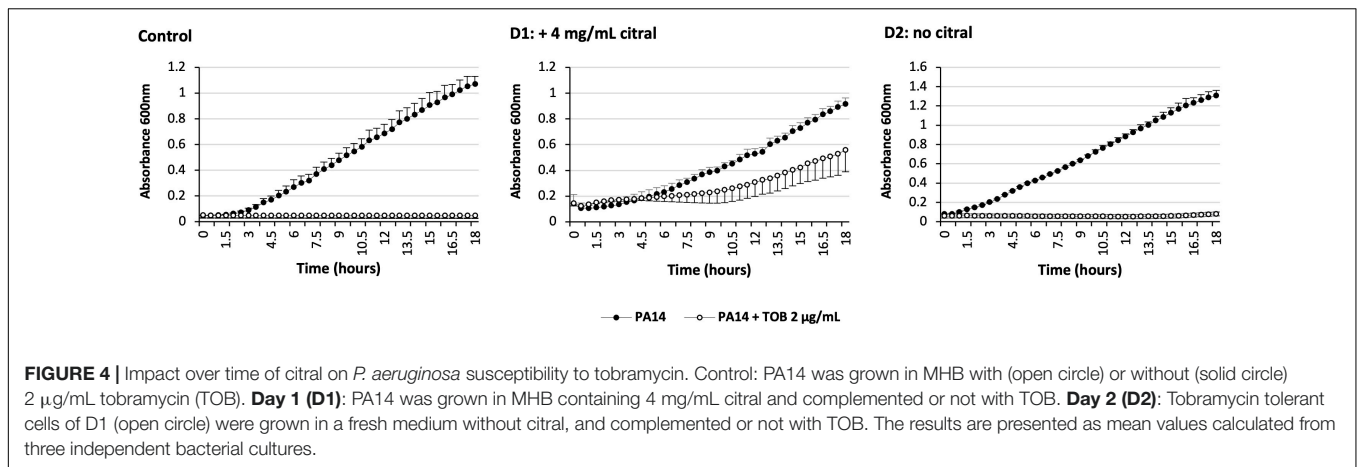
Aminoglycosides and colistin are polycationic molecules at neutral pH. The electrostatic interaction of their amine groups with the phosphate residues of lipopolysaccharides (LPS) is believed to promote the penetration of these drugs across the

TABLE 1 | Influence of citral on *P. aeruginosa* susceptibility to antibiotics.

Antibiotics ^a	Citral (mg/mL)	MICs of antibiotics (μg/mL) of strains ^b					
		PA14	PA14ΔXY	PA14 <i>mexXY</i> ⁺	PA14ΔEFN	PA14 <i>mexEFN</i> ⁺	PA14ΔXY/EFN
Ticarcillin	0	32			32	16	
	0.5	32			32	16	
	1	32			32	16	
	2	16			32	16	
	4	16			32	16	
Imipenem	0	0.5				4	
	0.5	0.5				4	
	1	0.5				4	
	2	1				4	
	4	1				4	
Gentamicin	0	1	0.25	4			
	0.5	1	0.25	4			
	1	2	0.25	4			
	2	4	0.5	8			
	4	8	1	8			
Tobramycin	0	0.5	0.25	2			
	0.5	0.5	0.25	2			
	1	1	0.25	2			
	2	2	0.5	4			
	4	4	1	4			
Ciprofloxacin	0	0.125	0.125	0.25	0.125	2	0.06
	0.5	0.125	0.125	0.25	0.125	2	0.06
	1	0.125	0.125	0.25	0.125	2	0.06
	2	0.25	0.25	0.25	0.125	2	0.06
	4	0.25	0.5	0.5	0.125	2	0.06
Chloramphenicol	0	64	64		64	1,024	
	0.5	128	128		64	1,024	
	1	256	256		64	1,024	
	2	256	256		64	1,024	
	4	512	512		64	1,024	
Colistin	0	0.5	0.5				
	0.5	1	1				
	1	2	4				
	2	8	8				
	4	≥64	≥64				

^aTicarcillin, is substrate of *MexAB-OprM*; gentamicin and tobramycin are substrates of *MexXY/OprM*; ciprofloxacin is a substrate of *MexAB-OprM*, *MexEF-OprN* and *MexXY/OprM*; chloramphenicol is substrate of *MexAB-OprM* and *MexEF-OprN*; porin *OprD*, which is inversely co-regulated with *MexEF-OprN*, is the main uptake pathway of imipenem; colistin is substrate of *MexXY/OprM* in the specific case of *PmrAB* mutants.

^bWhen increased (decreased) by the presence of citral, MIC values are indicated in bold (italic). All the experiments were made in triplicate. Blank spaces with no MIC data denote that no drug susceptibility testing was conducted as they are not relevant.



outer membrane, via a mechanism called “self-uptake pathway” that does not require the presence of porins (Krause et al., 2016; O’Driscoll et al., 2018). We wondered whether citral would reduce the net negative charges of bacterial surface, and thus the passage of aminoglycosides and colistin into the cell interior. To check this hypothesis, we measured the Zeta potential of strain PA14 before and after citral treatment. As previously reported (Tashiro et al., 2010), untreated PA14 cells exhibited a negative surface charge of -38 mV. This value slightly raised to -30 mV when the bacteria were preincubated with citral, suggesting that a number of outer membrane polar groups are masked by this very hydrophobic molecule when it partitions into the lipid bilayer. In absence of citral, the potential yielded a value of -10 and -12 mV with increasing concentrations of colistin and tobramycin, respectively in agreement with the notion that these antibiotics interact with and neutralize the negatively charged groups of LPS (Figure 5). Interestingly, citral reduced the magnitude of variation in Zeta potential when the bacterial cells were exposed to low concentrations of polycations (10 µg/mL) (Figure 5). A plausible explanation for these results is that citral impairs the binding and penetration of amine antibiotics, at least under certain experimental conditions. The further discovery that citral antagonizes polycationic antibiotics not only in *P. aeruginosa* but also in *P. putida*, *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* prompted us to search other origins to its negative effects (Supplementary Figure 2).

Citral Forms an Adduct With Tobramycin

Reactive amino groups of aminoglycosides and polymyxins are subject to react with the aldehyde groups of other compounds, to form Schiff bases ($RC=N-$) (Fan et al., 2019). In this context, the more reactive amine group appears to be that in position 6’ of the nebrosamin part of tobramycin (Alkhzem et al., 2020). If so, formation of some adducts could impair the activity of these antibiotics, by preventing their entry into bacterial cells and/or by inhibiting their binding to specific cellular targets. In order to demonstrate the formation of such imine conjugates, we carried out LC-HRMS (electrospray) experiments on mixtures of tobramycin/citral (ratio 1/600) and of colistin/citral (1/1500). This approach allowed the detection of

a mono-imine tobramycin-citral derivative (calculated mass for $[M + H]^+ C_{28}H_{52}N_5O_9$: 602.3765; measured: 602.3756) along with free tobramycin (Figure 6), but failed to evidence formation of a similar compound between colistin and citral. To prevent a possible hydrolysis of imine during the preparation of the MS sample, a prior reduction of the colistin/citral mixture using sodium cyanoborohydride was performed, but the corresponding reduced colistin-citral adduct was not detected by LC-HRMS (data not shown). The loss of citral C=O chemical bond (in favor of C=N) in presence of tobramycin or colistin was then assessed by Raman spectroscopy at 1676 cm^{-1} (Figure 7). In control experiments, we could observe that after 6 h of incubation at 37°C (Figure 7A), the C=O vibration increased in intensity, probably due to an improved solubilization of citral in water. At the opposite, the addition of either 20 or 40 µg/mL of tobramycin resulted in a decrease of C=O band intensity (proportional with tobramycin concentration) over the incubation time (Figures 7B,C). A similar result was obtained with 40 µg/mL colistin, but not with ticarcillin, an antibiotic molecule devoid of amine group (Supplementary Figures 3A,B).

To objectivate the formation of inactive citral-based adducts over time, we compared the susceptibility of strain PA14 to a selection of antibiotics previously preincubated with or without citral. As indicated in Table 2, MICs of gentamicin, tobramycin, and colistin gradually increased with the preincubation time, up to 32-fold after 24 h of contact, while the activity of ticarcillin remained constant under these conditions.

The lack of antibacterial activity of imine adducts was finally tested by using tobracitryl, a product resulting from the condensation of citral with tobramycin in a 1:1 ratio as a mixture of four isomers in 58% yield (Figure 8A). Interestingly, MIC of tobracitryl for PA14 was 16-fold higher than that of tobramycin (8 vs. 0.5 µg/mL). However, as the imine appeared to be unstable in water, re-forming spontaneously the initial amine, we synthesized a stable tobracitryl derivative, by reduction of the imine group of tobracitryl into an amine one in 47% yield (Figure 8B). The activity of this stable adduct proved to be very low (MIC > 64 µg/mL), confirming our hypothesis that citral is able to spontaneously inactivate amine antibiotics by forming Schiff bases.

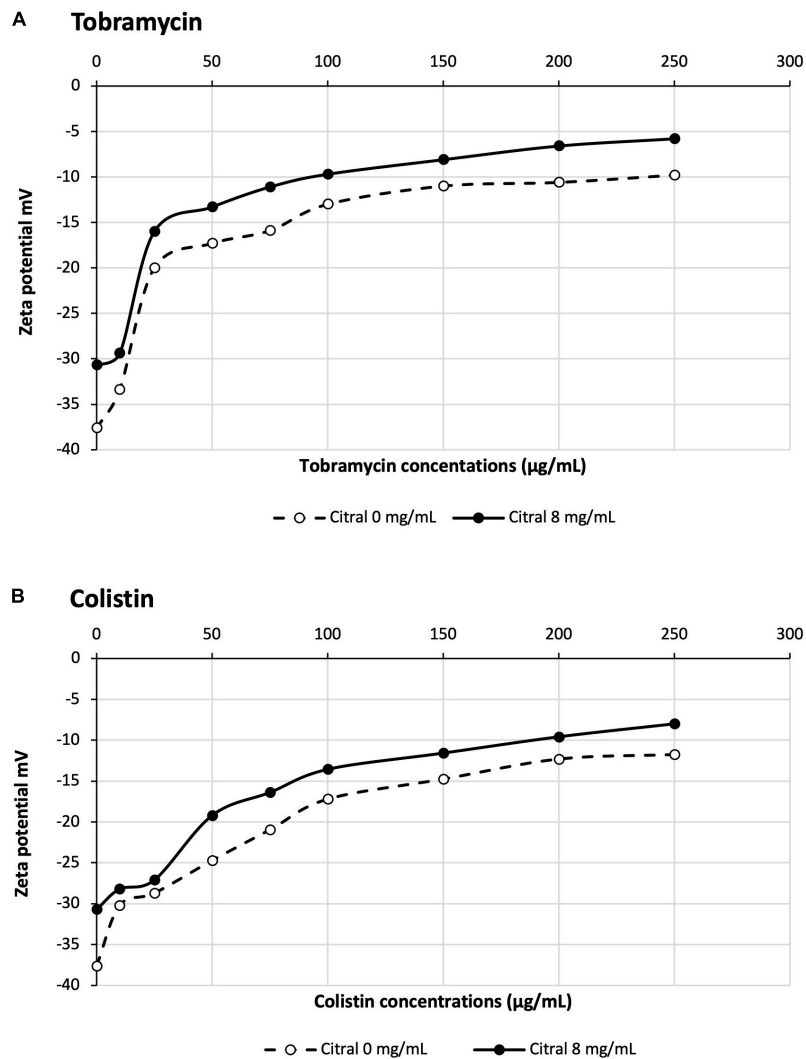


FIGURE 5 | Impact of citral on Zeta potential of PA14 cells treated with tobramycin (A) or colistin (B).

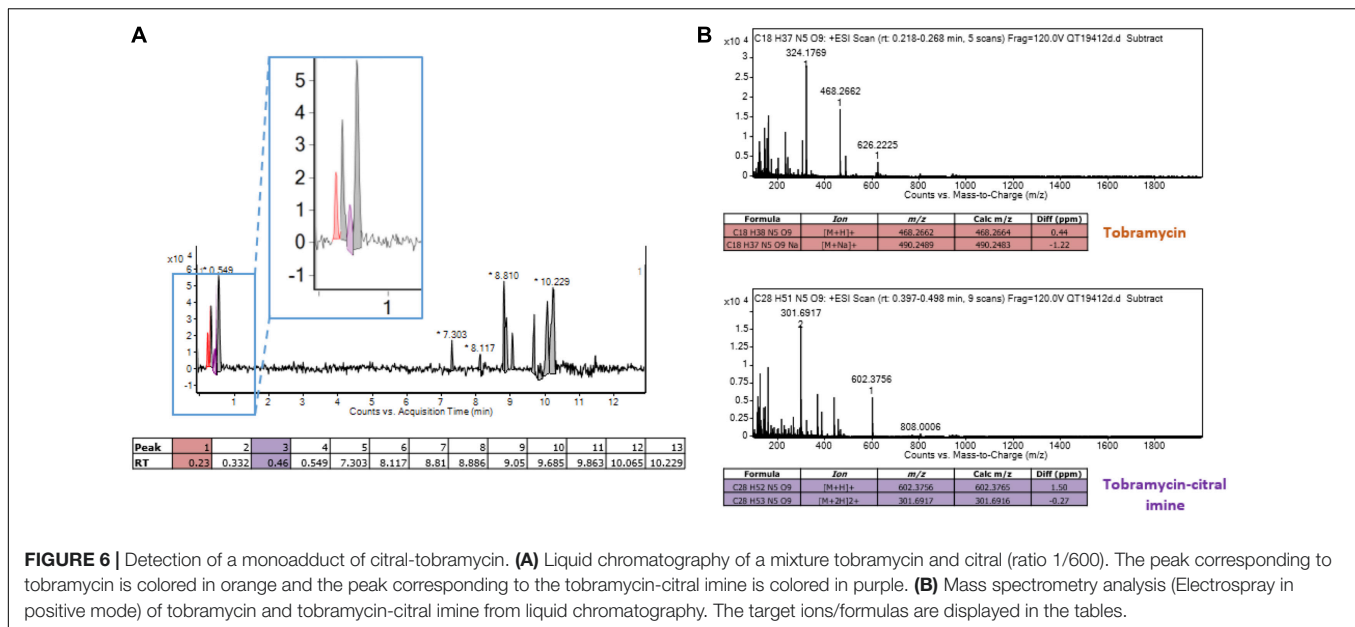
CONCLUSION

In the global context of increasing antibiotic resistance, therapeutic indications of EOs need to be reassessed. Because they are obtained from plants, these natural products are often viewed as a safe and affordable alternative to antibiotics to treat mild respiratory infections mostly due to Gram positive bacterial species (Inouye et al., 2001). However, their activity is several orders of magnitude lower than that of antibiotics, their MICs being around 1–8 mg/mL. Moreover, data supporting their clinical efficacy are scarce and their toxicity is often overlooked (Calhoun et al., 2019). As a matter of fact, the Cystic Fibrosis Foundation (CFF) warns against using EOs by nebulization as this may cause lung inflammation¹. Based on *in vitro* experiments, a number of studies suggest that EOs could be used to synergize antibiotics against multidrug resistant Gram

negative bacteria (for a review Langeveld et al., 2014). While their conclusions still need to be confirmed in clinical situations, data accumulate showing that some EO components show adverse effects *in vitro* on major antibiotics (Van Vuuren et al., 2009; Moussaoui and Alaoui, 2016). For example, compounds with aldehyde groups such as cinnamaldehyde and citral induce an electrophilic stress response in *P. aeruginosa* implying multidrug efflux transporters such as MexEF-OprN and MexXY/OprM, which in turn increases the resistance of the bacterium to pump-substrate antibiotics (Tetard et al., 2019). Similar effects on the pathogen are obtained with glutaraldehyde, a biocide used for cleaning and disinfection in hospitals, and malondialdehyde, a catabolite of polyunsaturated fatty acid peroxidation found in CF lungs (data not shown).

The present work reveals the potential risk of using citral with aminoglycosides or polymyxins to treat human infections. Since these antibiotics are essentially administered by intravenous route to combat hard-to-treat nosocomial infections, their

¹www.cff.org



coadministration with citral is not well justified in view of the very weak efficacy of the product on Gram negative species, and absence of validated protocols. In contrast, in the context of CF and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), aerosols of tobramycin and colistin are administered iteratively as maintenance therapy to control lung colonization with *P. aeruginosa*. Whether self-medication with EO formulations containing citral can be detrimental to these therapeutic regimens is unknown. Data are lacking on the concentrations of EO components achieved in airways after nebulization, inhalation or ingestion. Our results tend to demonstrate that aerosolization of antibiotics together with some volatile antimicrobials yielding 1:8 MIC locally *in vivo* may result in antagonistic interactions due to bacteria-dependent mechanisms (e.g., increased efflux, lower outer membrane permeability) combined with chemical inhibition of antibiotic active groups. Thus, patients with CF or COPD should be informed about the risk of self-medication with EOs containing citral or cinnamaldehyde, as these off the shelf supplements are distributed without restriction, and are usually considered as non-toxic.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains, Plasmids and Growth Conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 3. All the bacterial cultures were incubated at 37°C in Mueller-Hinton broth (MHB) provided with adjusted concentrations of Ca²⁺ (from 20 to 25 µg/mL) and Mg²⁺ (from 10 to 12.5 µg/mL) (Becton Dickinson and Company, Cockeysville, MD, United States), or on Mueller-Hinton agar cation-adjusted (MHA) (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France)

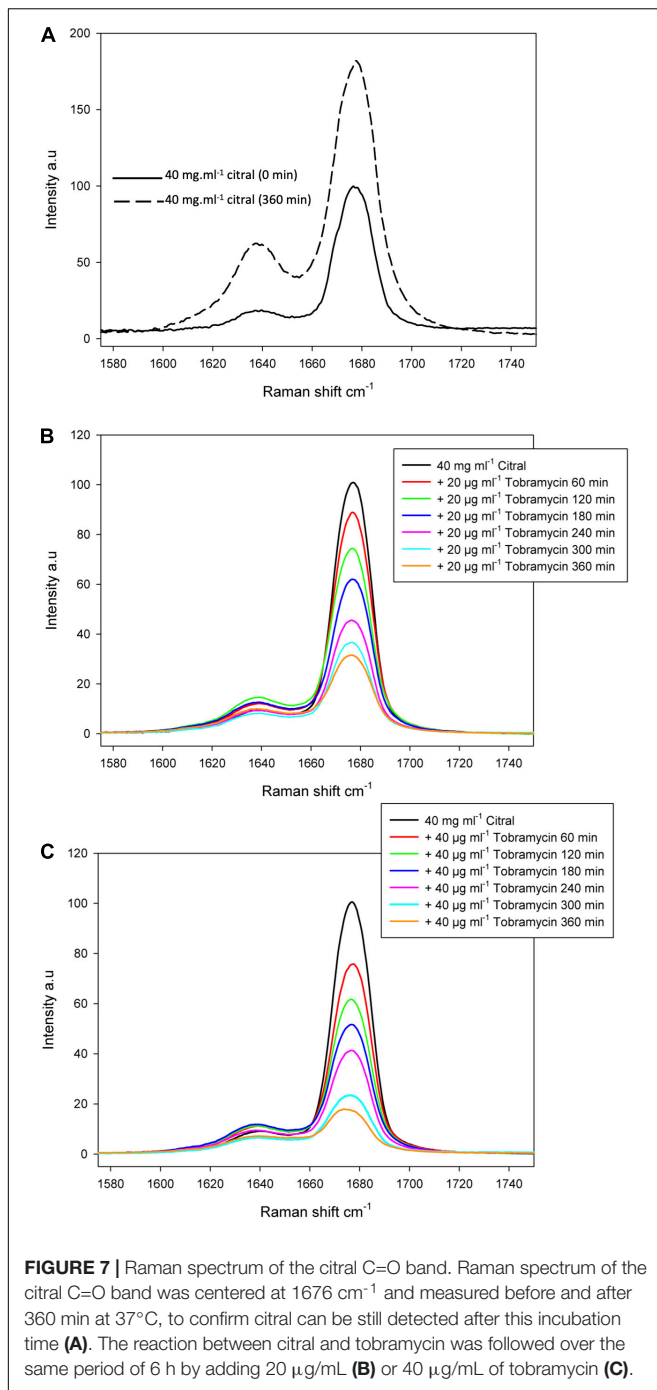
supplemented with antibiotics when required, or on minimal medium M63 with 0.1% citral as carbon and energy source (Ausubel et al., 2000). Citral, a mixture of citral B and citral A (1:2) (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was dissolved in 1:6 (vol:vol) aqueous solution of ethanol before use (stock solution 148 mg/mL).

Drug Susceptibility Testing

Citral susceptibility of *P. aeruginosa* strains was assessed on MHA. Paper disks loaded with 4.44 mg (5 µL) citral were deposited onto the surface of seeded MHA plates. The size of the inhibition zone was measured after 18 h of incubation at 37°C ± 1.

The minimum inhibitory concentrations (MICs) of selected antibiotics were determined by the standard serial twofold microdilution method, as recommended by the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020). Briefly, log-phase bacterial cultures adjusted at 10⁵ CFU/mL were distributed in 96-well sterile microplates by using a Freedom EVO® platform (Tecan, Männedorf, Switzerland), were incubated at 37°C ± 1, and then examined visually after 18 h of growth. All the MIC experiments were performed in triplicate. The impact of citral on antibiotic MICs was assessed at different subinhibitory concentrations (0.5, 1, 2, or 4 mg/mL). A negative control with 2% ethanol was made in parallel.

Chemical interaction of citral with amine antibiotics gentamicin, tobramycin, and colistin was studied by incubating each antibiotic with 0, 0.5, or 1 mg/mL citral at 37°C for 0, 3, 6, or 18 h in MHB, before performing MIC experiments (see above). Serial twofold dilutions of the antibiotic solutions with and without citral were added to 10⁵ CFU, and incubated at 37°C ± 1 for 18 h. A negative control was made in parallel with the non-amine antibiotic ticarcillin. A similar assay was carried out with paper disks impregnated with tobramycin



pre-incubated or not with citral, and deposited onto the surface of MHA plates inoculated with a strain of *S. aureus* (Table 3).

RT-qPCR Experiments

Specific gene expression levels were measured by quantitative PCR after reverse transcription (RT-qPCR), as previously described (Richardot et al., 2016). RNA was reverse transcribed with ImProm-II reverse transcriptase, according to the manufacturer's protocol (Promega, Madison, WI, United States).

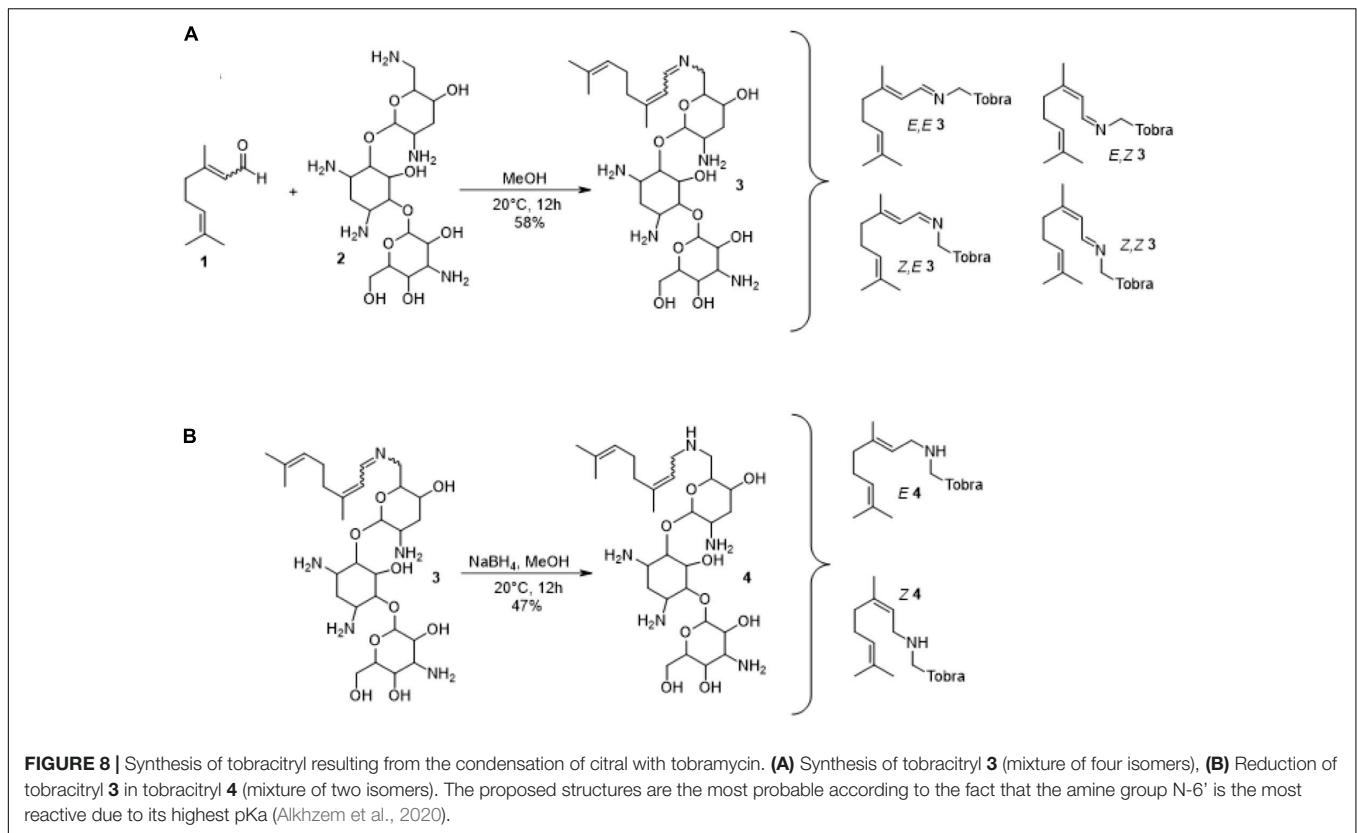
Amounts of specific cDNA were assessed on a Rotor Gene RG6000 instrument (Qiagen, Courtaboeuf, France) by using the QuantiFast SYBR green PCR Kit (Qiagen) and primers annealing to target gene sequences (Supplementary Table 1). For each strain, target gene mRNA levels were normalized to that of housekeeping gene *rpsL*, and were expressed as a ratio to the transcript levels of strain PA14. Mean gene expression values were calculated from two independent bacterial cultures, each assayed in duplicate. As shown previously, transcript levels of *mexB* \geq 3-fold, *mexY* \geq 5-fold, *mexC*, and *mexE* \geq 20-fold those of PA14, were considered as significantly increased because associated with a \geq 2-fold higher resistance to respective pump substrates (Llanes et al., 2013; Richardot et al., 2016).

Metabolite Extraction and Detection Using Thin Layer Chromatography (TLC)

A standard working solution of citral was prepared by diluting aliquots of >98% stock solutions in methanol. Overnight bacterial cultures were diluted into 25 mL of fresh MHB and incubated with shaking (250 rpm) at 37°C. When cultures reached an absorbance of $A_{600 \text{ nm}} = 0.8$, citral was added to a 2 or 4 mg/mL final concentration. Aliquots were removed at $t_0 \text{ h}$, $t_1 \text{ h}$, $t_3 \text{ h}$, and $t_{24} \text{ h}$ post-exposure; the growth medium was then collected by centrifugation and filtration through two filters of 0.45 and 0.2 μm pore size, respectively. An organic extraction was repeated three times using 1 mL dichloromethane (for a total volume of 3 mL). The organic fractions were pooled and dried overnight in a chemical hood, and were finally re-dissolved in 500 μL of dichloromethane. Organic fractions and standards were diluted (1:200 for organic fraction and 1:2,000 for standard) in methanol. Ten microliter volumes were then sprayed as 8 mm bands on a TLC plate (Alugram® Xtra SIL G UV254, Macherey-Nagel) using an automatic sampler (ATS4, Camag, Moirans, France) connected to visionCATS Camag TLC software V2.4. The TLC plates were developed in an automatic developing chamber (ADC 2, Camag) with a mobile phase containing cyclohexane:ethyl acetate (7:2) over a 70 mm migration distance. Spots were observed using UV-light at 254 nm (CV-415.LS, Uvitech, England).

Measurement of Bacterial Surface Charge

Three independent mid-phase cultures of strain PA14 (ca. 10^7 CFU/mL) were centrifuged (5,000 g, 10 min). The pellets were washed three times in distilled water and resuspended to yield 10^9 CFU/mL prior to adding 8 mg/mL citral and antibiotics (tobramycin or colistin). Zeta potential was measured in a folded capillary cell (DTS 1070; Malvern Instruments, Worcestershire, United Kingdom) at 25°C using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments) equipped with a 633 nm He-Ne laser, and piloted with Zetasizer software v7.02. Bacteria were allowed to equilibrate for 120 s at 25°C. Zeta potential measurements were performed three times for each replicate sample. The Smoluchowski equation was used to calculate the potential from nine electrophoretic mobility determinations.



Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS)

Electrospray high-resolution mass spectrometry experiments (ESI-HRMS) were performed on an Agilent Accurate Mass QToF 6520 quadrupole time-of-flight instrument (Agilent Technologies, Les Ulis, France), hyphenated with a liquid chromatography system (Agilent 1200 HPLC system). Samples were prepared in methanol and 0.8 μL was injected. A Zorbax SB Agilent C₁₈-column (50 mm \times 2.1 mm i.d.) with a particle size of 1.8 μm maintained at 40°C was used. The elution was performed using a 0.5 mL/min mobile phase gradient of 0.05% formic acid in water (A) and 0.05% formic acid in acetonitrile (B), programmed as follows (A:B): 98:2 ($t = 0$ min), 0:100 ($t = 8$ min), 0:100 ($t = 12.5$ min), 98:2 ($t = 12.6$ min), 98:2 ($t = 13$ min). The acquisition of mass spectra was conducted in ESI (Electro-Spray Ionization) positive ionization mode using a capillary voltage of 4,000 V and the following conditions: nebulizer nitrogen gas pressure, 30 psig; drying gas flow rate, 8 L/min; and drying temperature, 340°C. The scan range was m/z 100–2,000 at 1 s/scan. Data acquisition was performed using MassHunter Qualitative Analysis software (B.07.00, Agilent).

Raman Spectroscopy

The Raman spectroscopy experimental set up has previously been described (Foley and Enescu, 2007). It includes a Spectra Physics Nd/YAG laser model LAB-170-10 which delivers pulses with a duration of 5 ns at a repetition rate of 10 Hz. The equivalent

power density at the sample was 30 mW mm^{-2} for a beam diameter of 1 cm. From our experience, the advantage of using pulsed excitation in Raman spectroscopy is that the relative contribution of the sample fluorescence to the detected signal is reduced due to the saturation of the excitation (this saturation does not occur for the Raman scattered light). The spectra were recorded using the second harmonic emission wavelength (532 nm) of the laser. The scattered light was detected at 90° using a Princeton Instruments spectroscopy system, which includes an Acton Spectra Pro 2500i monochromator with maximum resolution of 0.035 nm and a PIMAX-1024-RB CCD camera. In the present configuration, the spectral resolution of the system was 7 cm^{-1} as determined by the FWHM of the Raman spectrum of N₂ in air. The intensity of the laser was constantly monitored by measuring the intensity of the N₂ Raman band as obtained from the laser beam scattering on air. All spectra were then corrected with respect to the changes in laser intensity by dividing them by the intensity of the N₂ Raman band acquisition over 400 laser shots. This was equivalent to a “normalization” of the measured intensities with respect to the Raman band of N₂ in air. Consequently, the intensities of the different experimental Raman spectra reported in the present paper were measured in the same (arbitrary) unit, and can be directly compared. The study of the interaction between citral and antibiotics (tobramycin, colistin, or ticarcillin) was initiated by the rapid mixing of the two solutions. The concentration of citral was 40 mg/mL whilst the concentration of antibiotics was either 40 or 20 $\mu\text{g/mL}$. The reaction was monitored for 6 h by taking the

TABLE 2 | Preincubation with citral reduces the activity of aminoglycosides and colistin on *P. aeruginosa* strain PA14.

Antibiotics ^a	Citral (mg/mL)	MICs of antibiotics (μg/mL) after preincubation with citral			
		0 h	3 h	6 h	24 h
Gentamicin	0	1	1	1	1
	0.5	1	1	2	4
	1	2	2	4	16
Tobramycin	0	0.5	0.5	0.5	0.5
	0.5	0.5	2	2	4
	1	1	2	4	16
Colistin	0	0.5	0.5	0.5	0.5
	0.5	1	4	4	16
	1	2	4	8	16
Ticarcillin	0	32	32	32	32
	0.5	32	32	32	32
	1	32	32	32	32

When increased by citral, antibiotic MIC values are indicated in bold; when further increased by preincubation, MICs are underlined. Ticarcillin was used as a negative control since it does not interact with citral.

All the experiments were made in triplicate.

Raman spectra every hour. The citral-antibiotics solution was maintained at 37°C for the duration of the measurements. Each spectrum was averaged over 1000 laser shots and for each time section an average of three experiments was performed.

Synthesis of Tobracitryl

All the solvents were purified according to reported procedures, and the reagents used were commercially available. Methanol, ethyl acetate and petroleum ether were purchased from Sigma-Aldrich, and used without further purification. Column chromatography was performed on Merck silica gel (70–230 mesh). ¹H NMR and ¹³C NMR spectra were recorded in CD₃OD on a Bruker AC 300 spectrometer working at 300 and 75 MHz, respectively (the usual abbreviations are used: s: singlet, d: doublet, t: triplet, q: quadruplet, m: multiplet). All chemical shifts are given in ppm. The purity of the compounds was checked by analytical HPLC (C18 column, eluent CH₃CN-water-TFA (90:10:0.025, v/v/v), 0.5–1 mL/min) with PDA detector spanning from 210 to 310 nm. All compounds possessed purity above 95%, as determined by analytical HPLC-PDA at 210 nm.

General Procedure for the Synthesis of Tobracitryl 3

A mixture of citral (65 mg, 0.42 mmol) and tobramycin 200 mg (0.42 mmol) in absolute methanol (5 mL) was stirred at room temperature for 12 h. A small precipitate appeared and was eliminated by centrifugation. The supernatant was concentrated under vacuum leading to a yellow powder (150 mg) corresponding to the expected product **3** as a mixture of isomers in 58% yield. ¹H NMR (CD₃OD) mixture of isomers: δ = 8.20–8.40 (m, 2H), 5.96–6.08 (m, 2H), 5.06–5.20 (m, 4H), 3.96–4.01 (m, 1H), 3.86–3.90 (m, 1H), 3.62–3.76 (m, 4H), 3.49–3.57 (m, 2H), 3.37–3.44 (m, 2H), 3.17–3.29 (m, 3H), 3.02–3.07 (m, 1H),

TABLE 3 | Strains and plasmids used in the study.

Stains	Description	Origin
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PA14	Wild type reference strain, susceptible to antibiotics	Liberati et al., 2006
PAO1	Wild type reference strain, susceptible to antibiotics	B. Holloway
LESB58	Clinical strain isolated from cystic fibrosis patient (United Kingdom)	C. Winstanley
1341	Environmental strain isolated from surface water (France)	This study
1393	Environmental strain isolated from surface water (France)	This study
1423	Environmental strain isolated from surface water (France)	This study
PA14ΔEFN	PA14 mutant lacking operon <i>mexEF-oprN</i>	Tetard et al., 2019
PA14 <i>mexEF</i> ⁺	<i>MexEF-OprN</i> overproducing mutant derived from PA14	Tetard et al., 2019
PA14ΔXY	PA14 mutant lacking operon <i>mexXY</i>	Tetard et al., 2019
PA14 <i>mexXY</i> ⁺	<i>MexXY-OprM</i> overproducing mutant derived from PA14	Tetard et al., 2019
PA14ΔEFNΔXY	PA14 mutant lacking operons <i>mexEF-oprN</i> and <i>mexXY</i>	Tetard et al., 2019
Other bacterial species		
ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i> reference strain	Minogue et al., 2014
CIP 70.10	<i>Acinetobacter baumannii</i> reference strain	Marchand et al., 2004
KT2440	<i>Pseudomonas putida</i> reference strain	Nelson et al., 2002
SA1	Clinical strain of <i>Staphylococcus aureus</i> isolated at the Besançon teaching hospital (France)	This study

2.81–2.91 (m, 3H), 2.17–2.26 (m, 7H), 1.92–2.05 (m, 6H), 1.68 (s, 7H), 1.64 (s, 7H). ¹³C (CD₃OD) mixture of isomers: δ = 164.84, 164.43, 154.99, 154.53, 154.29, 133.39, 133.04, 132.96, 125.51, 124.73, 124.27, 124.22, 124.16, 124.11, 124.06, 101.18, 100.98, 90.63, 90.47, 77.11, 76.23, 75.87, 75.69, 74.40, 73.90, 73.63, 73.36, 71.47, 71.18, 69.93, 69.10, 67.84, 67.20, 62.51, 56.16, 51.53, 51.17, 50.88, 50.74, 43.50, 42.79, 41.15, 41.07, 37.58, 37.22, 36.85, 33.42, 33.28, 27.85, 27.74, 27.60, 27.01, 26.96, 26.93, 25.75, 25.70, 25.66, 24.48, 17.69, 17.65, 17.58, 17.56, 17.36, 17.32, 17.13, 17.06.

General Procedure for the Synthesis of Reduced Tobracitryl 4

A mixture of tobracitryl **3** (50 mg, 8.1 10⁻⁵ mol) and sodium borohydride (31 mg, 8.1 10⁻⁵ mmol) in absolute methanol (5 mL) was stirred at room temperature for 12 h. The reaction was then quenched by adding water (1 mL). Stirring was maintained at room temperature for 20 min. After filtration over a pad of Celite washing with methanol and ethylacetate, the solvents were removed under vacuum and the crude mixture was purified by flash chromatography on Silicagel by using successively petroleum ether, ethylacetate and methanol affording the expected product **4** in 47% yield as a mixture of isomers. ¹H NMR (MeOD): δ = 5.24–5.35 (m, 1H), 5.07–5.14 (m, 2H),

3.78–3.89 (m, 1H), 3.63–3.67 (m, 1H), 3.50–3.54 (m, 1H), 3.18–3.40 (m, 4H), 2.85–2.91 (m, 1H), 2.60–2.75 (m, 2H), 1.95–2.18 (m, 7H), 1.72–1.80 (m, 3H), 1.69 (s, 7H), 1.63 (s, 7H), 0.86–1.04 (m, 4H). ¹³C (MeOD): δ = 170.30, 139.89, 139.52, 132.79, 132.69, 132.40, 125.16, 125.09, 124.05, 123.25, 123.04, 102.39, 88.22, 76.83, 74.78, 73.05, 70.12, 62.54, 56.53, 47.88, 45.05, 40.86, 40.78, 33.40, 33.14, 33.07, 31.21, 30.76, 27.75, 27.63, 26.06, 26.01, 25.95, 23.77, 17.91, 17.88, 17.84, 16.61, 16.46, 14.49.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CL, PP, GM, and CR conceived the study. AT, SF, GM, J-MB, EO, FT, AZ, BC, and YP carried out the experiments. CL, AT, and PP co-wrote the manuscript. CL did funding acquisition. All authors discussed the results and comments on the manuscript.

REFERENCES

- Alkhzem, A. H., Woodman, T. J., and Blagbrough, I. S. (2020). Individual pKa values of tobramycin, kanamycin B, amikacin, sisomicin, and netilmicin determined by multinuclear NMR spectroscopy. *ACS Omega* 5, 21094–21103. doi: 10.1021/acsomega.0c02744
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., et al. (2000). *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, NY: John Wiley & Sons, Inc.
- Balazs, V. L., Horvath, B., Kerekes, E., Acs, K., Kocsis, B., Varga, A., et al. (2019). Anti-*Haemophilus* activity of selected essential oils detected by TLC-direct bioautography and biofilm inhibition. *Molecules* 24:3301. doi: 10.3390/molecules24183301
- Calhoun, K., Duke, J., George, N., and Akkanti, B. (2019). *When Oil Meets Air: A New Cause of Hypersensitivity Pneumonitis*. New Orleans: CHEST Annual Meeting.
- Cantwell, S. G., Lau, E. P., Watt, D. S., and Fall, R. R. (1978). Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* 135, 324–333. doi: 10.1128/jb.135.2.324-333.1978
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 30th Edn. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cox, S. D., and Markham, J. L. (2007). Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds. *J. Appl. Microbiol.* 103, 930–936. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03353.x
- Fan, X. C., Yang, L., Wang, T., Sun, T. D., and Lu, S. T. (2019). pH-responsive cellulose-based dual drug-loaded hydrogel for wound dressing. *Eur. Polymer J.* 121:109290. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2019.109290
- Foley, S., and Enescu, M. (2007). A Raman spectroscopy and theoretical study of zinc–cysteine complexation. *Vib. Spectrosc.* 44, 256–265. doi: 10.1016/j.vibspec.2006.12.004
- Guenard, S., Muller, C., Monlezun, L., Benas, P., Broutin, I., Jeannot, K., et al. (2014). Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 221–228. doi: 10.1128/aac.01252-13
- Gupta, P., Patel, D. K., Gupta, V. K., Pal, A., Tandon, S., and Darokar, M. P. (2017). Citral, a monoterpenoid aldehyde interacts synergistically with norfloxacin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine* 34, 85–96. doi: 10.1016/j.phymed.2017.08.016

FUNDING

This work was supported by the grants from the Region “Bourgogne Franche-Comté” and from the French cystic fibrosis associations “Vaincre la Mucoviscidose” and “Grégory Lemarchal.” GM acknowledges the Interdisciplinary Thematic Institute (ITI) InnoVec (Innovative Vectorization of Biomolecules, IdEx, ANR-10-IDEX-0002) and SFRI (ANR-20-SFRI-0012).

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Mert Ugur and Salomé Borde for technical support. We also thank Thilo Köhler (Geneva, Switzerland) for providing reference strain LESB58.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.709838/full#supplementary-material>

- Hammer, K. A., Carson, C. F., and Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J. Appl. Microbiol.* 86, 985–990. doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00780.x
- Hoschle, B., and Jendrossek, D. (2005). Utilization of geraniol is dependent on molybdenum in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for different metabolic routes for oxidation of geraniol and citronellol. *Microbiology* 151, 2277–2283. doi: 10.1099/mic.0.27957-0
- Hyldgaard, M., Mygind, T., and Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front. Microbiol.* 3:12. doi: 10.3389/fmicb.2012.00012
- Inouye, S., Takizawa, T., and Yamaguchi, H. (2001). Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J. Antimicrob. Chemother.* 47, 565–573. doi: 10.1093/jac/47.5.565
- Jaramillo-Colorado, B., Olivero-Verbel, J., Stashenko, E. E., Wagner-Dobler, I., and Kunze, B. (2012). Anti-quorum sensing activity of essential oils from Colombian plants. *Nat. Prod. Res.* 26, 1075–1086. doi: 10.1080/14786419.2011.557376
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., and Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: an overview. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6:a027029. doi: 10.1101/cshperspect.a027029
- Langeveld, W. T., Veldhuizen, E. J., and Burt, S. A. (2014). Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. *Crit. Rev. Microbiol.* 40, 76–94. doi: 10.3109/1040841x.2013.763219
- 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. doi: 10.1128/cmr.00117-14
- Liberati, N. T., Urbach, J. M., Miyata, S., Lee, D. G., Drenkard, E., Wu, G., et al. (2006). An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103, 2833–2838. doi: 10.1073/pnas.0511100103
- Llanes, C., Köhler, T., Patry, I., Dehecq, B., Van Delden, C., and Plésiat, P. (2011). Role of the efflux system MexEF-OprN in low level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 5676–5684. doi: 10.1128/aac.00101-11
- Llanes, C., Pourcel, C., Richardot, C., Plésiat, P., Fichant, G., Cavallo, J. D., et al. (2013). Diversity of beta-lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: a French multicentre study. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1763–1771.

- 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. doi: 10.1128/aac.48.9.3298-3304.2004
- 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. doi: 10.1128/aac.48.4.1320-1328.2004
- Minogue, T. D., Daligault, H. A., Davenport, K. W., Bishop-Lilly, K. A., Broomall, S. M., Bruce, D. C., et al. (2014). Complete genome assembly of *Escherichia coli* ATCC 25922, a serotype O6 reference strain. *Genome Announc.* 2, e969–e914.
- Moussaoui, F., and Alaoui, T. (2016). Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants. *As. Pac. J. Trop. Biomed.* 6, 32–37. doi: 10.1016/j.apjtb.2015.09.024
- Nelson, K. E., Weinel, C., Paulsen, I. T., Dodson, R. J., Hilbert, H., Martins Dos, et al. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ. Microbiol.* 4, 799–808.
- O'Driscoll, N. H., Cushnie, T. P. T., Matthews, K. H., and Lamb, A. J. (2018). Colistin causes profound morphological alteration but minimal cytoplasmic membrane perforation in populations of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Microbiol.* 200, 793–802. doi: 10.1007/s00203-018-1485-3
- Papadopoulos, C. J., Carson, C. F., Chang, B. J., and Riley, T. V. (2008). Role of the MexAB-OprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* in tolerance to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its monoterpene components Terpinen-4-ol, 1,8-Cineole, and α -Terpineol. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1932–1935. doi: 10.1128/aem.02334-07
- Pesavento, G., Maggini, V., Maida, I., Lo Nostro, A., Calonico, C., Sassoli, C., et al. (2016). Essential oil from *Origanum vulgare* completely inhibits the growth of multidrug-resistant cystic fibrosis pathogens. *Nat. Prod. Commun.* 11, 861–864.
- Pesingi, P. V., Singh, B. R., Pesingi, P. K., Bhardwaj, M., Singh, S. V., Kumawat, M., et al. (2019). MexAB-OprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* offers resistance to carvacrol: a herbal antimicrobial agent. *Front. Microbiol.* 10:2664. doi: 10.3389/fmicb.2019.02664
- Ragno, R., Papa, R., Patsilina, A., Vrenna, G., Garzoli, S., Tuccio, V., et al. (2020). Essential oils against bacterial isolates from cystic fibrosis patients by means of antimicrobial and unsupervised machine learning approaches. *Sci. Rep.* 10:2653.
- Richardot, C., Juarez, P., Jeannot, K., Patry, I., Plésiat, P., and Llanes, C. (2016). Amino acid substitutions account for most MexS alterations in clinical *nhxC* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 2302–2310. doi: 10.1128/aac.02622-15
- Shah, G., Shri, R., Panchal, V., Sharma, N., Singh, B., and Mann, A. S. (2011). Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 2, 3–8. doi: 10.4103/2231-4040.79796
- Shi, C., Song, K., Zhang, X., Sun, Y., Sui, Y., Chen, Y., et al. (2016). Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *Cronobacter sakazakii*. *PLoS One* 11:e0159006. doi: 10.1371/journal.pone.0159006
- Shi, C., Sun, Y., Liu, Z., Guo, D., Sun, H., Sun, Z., et al. (2017). Inhibition of *Cronobacter sakazakii* virulence factors by citral. *Sci. Rep.* 7:43243.
- 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. doi: 10.1128/jb.187.4.1246-1253.2005
- Sun, Y., Guo, D., Hua, Z., Sun, H., Zheng, Z., Xia, X., et al. (2019). Attenuation of multiple *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors by citral. *Front. Microbiol.* 10:894. doi: 10.3389/fmicb.2019.00894
- Swamy, M. K., Akhtar, M. S., and Sinniah, U. R. (2016). Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2016:3012462.
- Tashiro, Y., Ichikawa, S., Shimizu, M., Toyofuku, M., Takaya, N., Nakajima-Kambe, T., et al. (2010). Variation of physicochemical properties and cell association activity of membrane vesicles with growth phase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3732–3739. doi: 10.1128/aem.02794-09
- 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, e1081–e1019.
- Thielmann, J., and Muranyi, P. (2019). Review on the chemical composition of *Litsea cubeba* essential oils and the bioactivity of its major constituents citral and limonene. *J. Essent. Oil Res.* 31, 361–378. doi: 10.1080/10412905.2019.1611671
- Van Vuuren, S. F., Suliman, S., and Viljoen, A. M. (2009). The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Let. Appl. Microbiol.* 48, 440–446. doi: 10.1111/j.1472-765x.2008.02548.x
- Vasireddy, L., Bingle, L. E. H., and Davies, M. S. (2018). Antimicrobial activity of essential oils against multidrug-resistant clinical isolates of the *Burkholderia cepacia* complex. *PLoS One* 13:e0201835. doi: 10.1371/journal.pone.0201835

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

Copyright © 2021 Tetard, Foley, Mislin, Brunel, Oliva, Torrealba Anzola, Zedet, Cardey, Pellequer, Ramseyer, Plésiat and Llanes. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Table S1: Primers used for RT-qPCR experiments.

Primer	Sequence (5' → 3')	T_m (°C)	Source
<i>mexB1</i>	ATCCGCCAGACCATCGCCA	60	(Hocquet et al., 2006)
<i>mexB2</i>	CATCACCAGGAACACGAGGAGG	60	
<i>mexY1A</i>	TTACCTCCTCCAGCGGC	60	(Jeannot et al., 2005)
<i>mexY1B</i>	GTGAGGCGCGGTTGTG	60	
<i>mexC1</i>	TGCGGATTTCACCCAGACC	60	(Dumas et al., 2006)
<i>mexC2</i>	GGCCAAGGTGCCTTTCTTCA	60	
<i>mexE4</i>	CCAGGACCAGCACGAACT	60	(Dumas et al., 2006)
<i>mexE5</i>	CGACAACGCCAAGGGCGAGTTCACC	60	
<i>rpsL3</i>	GCAACTATCAACCAGCTGGTG	60	(Dumas et al., 2006)
<i>rpsL5</i>	GCTGTGCTCTTGCAGGTTGTG	60	

Figure S1: Susceptibility of bacterial strains to citral. 5 μ L volumes (4.44 mg) of citral were spotted on paper disks. These latter were subsequently deposited on the surface of Mueller-Hinton agar plates inoculated with various clinical (PA14, PAO1, LESB58) or environmental (1341, 1393, 1423) strains of *P. aeruginosa* (on grey background). The activity of citral can be compared to that on the Gram-positive bacterium *Staphylococcus aureus*.

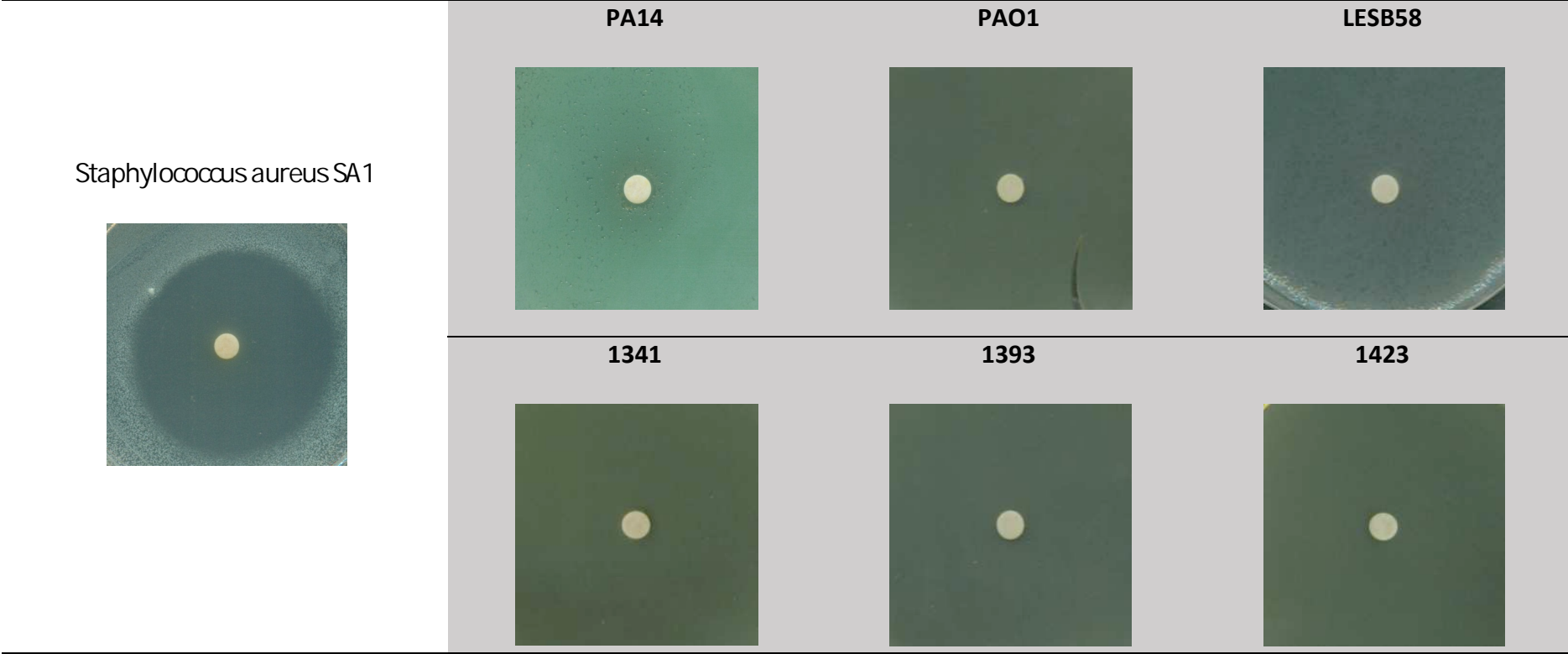
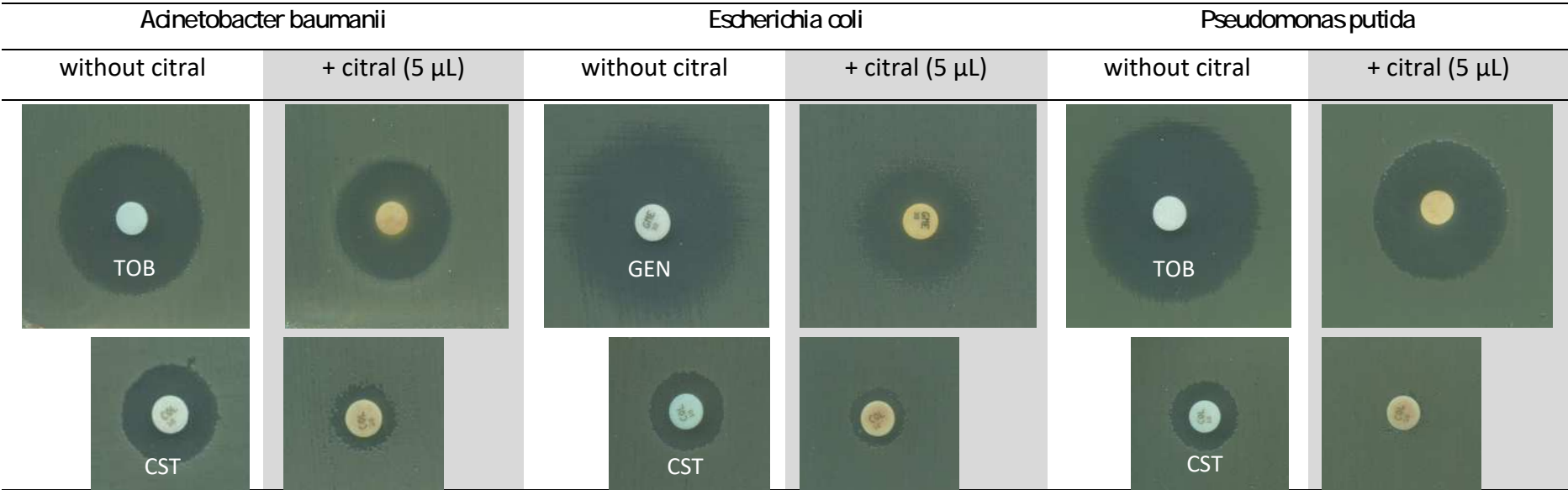
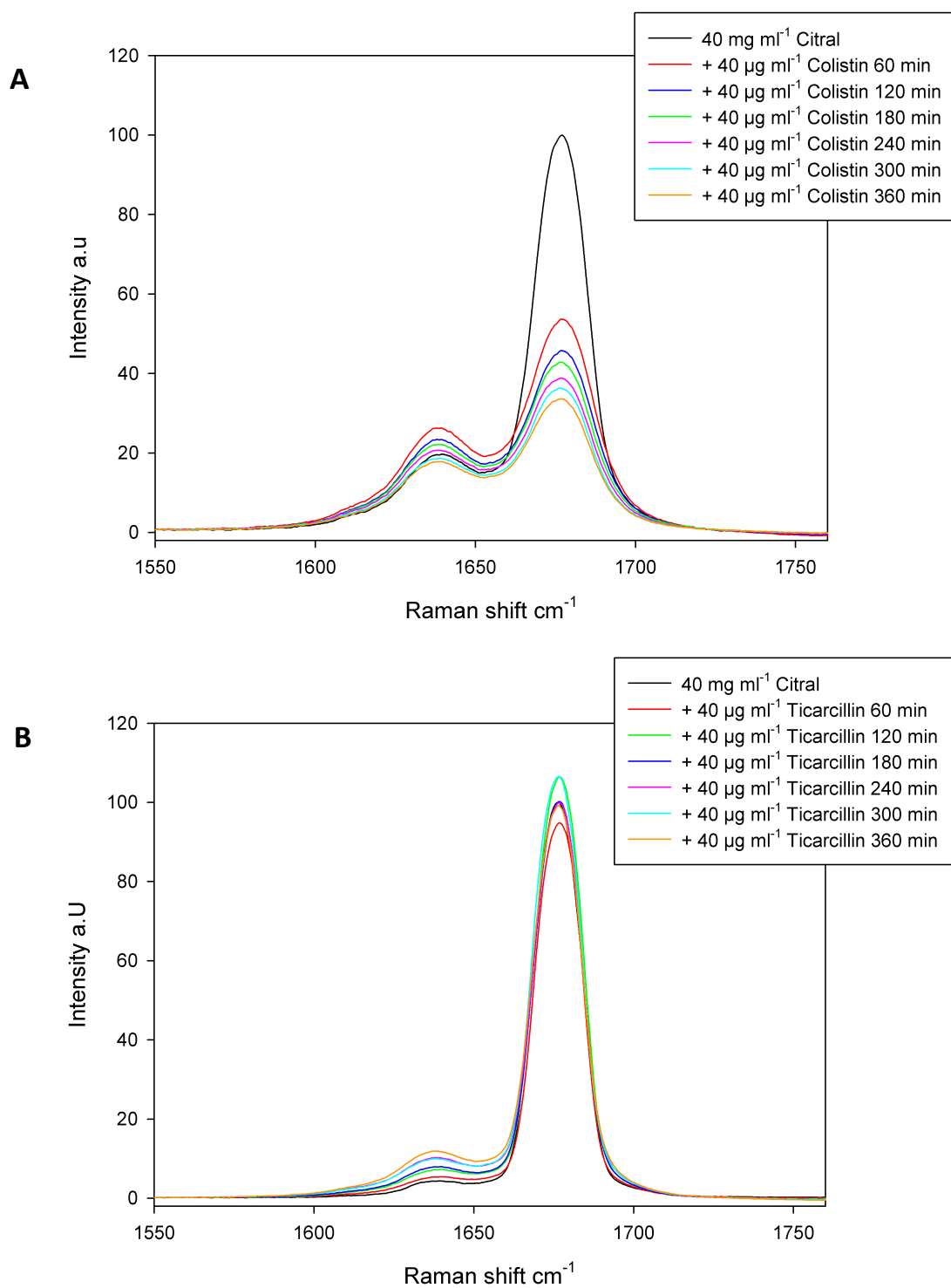


Figure S2. Antagonism between citral and aminoglycosides or colistin in different Gram-negative bacterial species.



Addition of citral (5 μ l, i.e. 4.44 mg) to disks impregnated with tobramycin (TOB), gentamicin (GEN) or colistin (CST) causes a reduction of inhibition zones.

Figure S3. Raman spectrum of the citral C=O band. (A) The aldehyde band of citral progressively disappears when the product (40 mg/mL) is incubated with colistin (40 $\mu\text{g/mL}$) at 37°C for 360 min. **(B)** In contrast, no change is observed when citral is incubated with ticarcillin (40 $\mu\text{g/mL}$).



References

- Dumas, J.L., Van Delden, C., Perron, K., and Köhler, T. (2006). Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol Lett* 254, 217-225.
- 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.
- 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.

3.3.3 Résultats complémentaires

Afin de voir si les résultats obtenus avec le citral peuvent être transposés à d'autres molécules, nous avons recherché des aldéhydes ayant un intérêt potentiel dans le traitement des infections bactériennes. Ainsi, nous avons étudié l'impact d'un désinfectant, le glutaraldéhyde, et celui d'un marqueur de l'inflammation pulmonaire, le malondialdéhyde, sur la résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques (**Figure 28**).

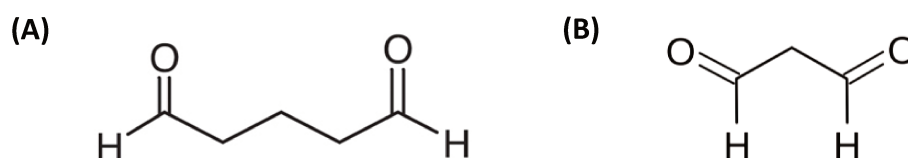


Figure 28 : Formules chimiques du glutaraldéhyde (A) et du malondialdéhyde (B).

3.3.3.1 Effets du glutaraldéhyde sur la résistance aux antibiotiques

Le glutaraldéhyde (GLT) à une concentration de 2% est un produit électrophile encore largement utilisé dans le monde pour désinfecter les équipements médicaux (endoscopes par exemple) (<http://www.inrs.fr>). Il inhibe la croissance de *P. aeruginosa* PA14 à une concentration de 1 mg/mL (0,1%). En raison de son effet inducteur potentiel des systèmes d'efflux MexEF-OprN et MexXY/OprM, nous avons déterminé par RT-qPCR le niveau d'expression relatif des gènes codant ces deux pompes et étudié la résistance aux antibiotiques substrats en présence de concentrations subinhibitrices de glutaraldéhyde.

Après respectivement 15 et 45 min d'exposition à 256 µg/mL de GLT (soit environ 0,02%), les gènes *mexE* (représentatif de MexEF-OprN) et *mexY* (MexXY/OprM) sont significativement surexprimés (**Figure 29**). Ce n'est pas le cas de *mexC* et *mexB* (respectivement exprimés 1,1- et 2,6-fois par rapport au contrôle sans GLT ; résultats non montrés).

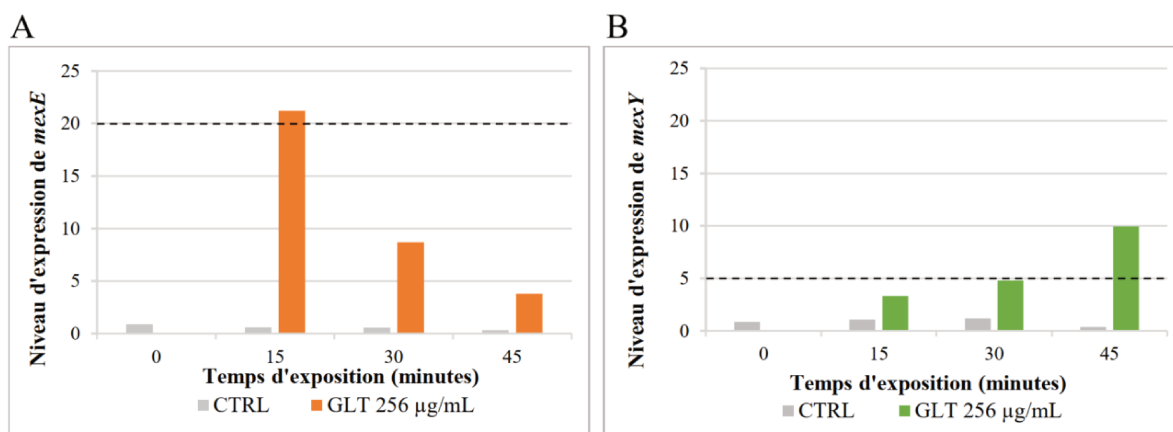


Figure 29 : Niveaux d'expression de mexE (A) et mexY (B) 45 min après l'exposition de la souche PA14 à une concentration de 256 µg/mL de glutaraldéhyde (GLT) comparativement à un contrôle (CTRL) sans glutaraldéhyde. Le niveau de surexpression est considéré comme significatif lorsqu'il est >20 pour mexE et >5 pour mexY (en pointillés).

Cette activation des pompes d'efflux suggère qu'elles jouent un rôle dans la tolérance au stress induit par le GLT. Pour le montrer, nous avons réalisé des expériences de bactéricidie avec des mutants luminescents portant l'opéron *luxCDABE* intégré dans le chromosome, et déficients dans l'une ou/et l'autre pompe d'efflux : PA14-*lux*, PA14ΔEFN-*lux*, PA14ΔXY-*lux* et PA14ΔEFNΔXY-*lux*. Après l'introduction de 800 µg/mL de GLT dans chaque culture, la mesure de la luminescence, corrélée à la survie bactérienne, a permis de comparer les cinétiques de bactéricidie (Figure 30).

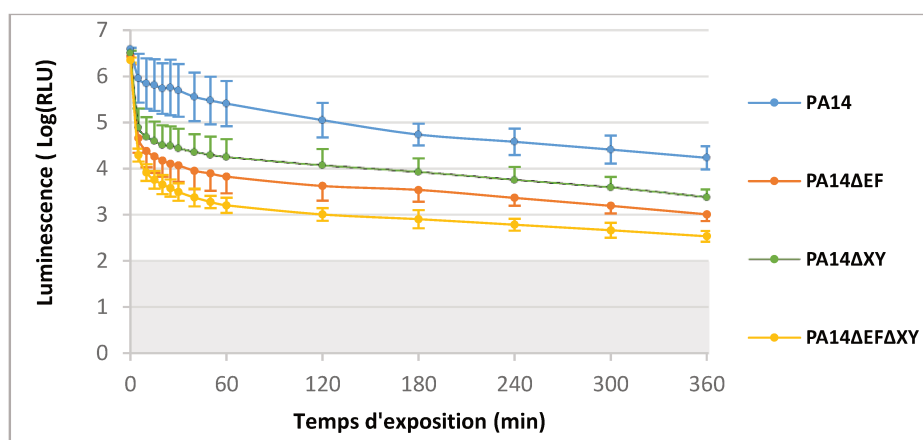


Figure 30 : Cinétiques de bactéricidie de la souche PA14-*lux* et de ses mutants PA14ΔEF-*lux*, PA14ΔXY-*lux* et PA14ΔEFΔXY-*lux* en présence de GLT (800 µg/mL). La luminescence émise par le milieu de culture seul est indiquée par la zone en gris.

Il apparaît que le GLT provoque une mortalité importante des bactéries dès les premières minutes de contact. Cependant, le résultat est plus marqué en l'absence de MexEF-OprN (PA14ΔEFN) et encore plus dans le double mutant PA14ΔEFNΔXY, ce qui signifie l'implication des deux pompes MexEF-OprN et MexXY/OprM dans la résistance au GLT.

Afin de visualiser l'effet du GLT sur la résistance aux antibiotiques substrats de ces systèmes (le chloramphénicol CHL pour MexEF-OprN et la gentamicine GMN pour MexXY/OprM), des antibiogrammes de la souche parentale PA14 et de ses mutants ont été réalisés en présence et en absence de GLT (Figure 31).

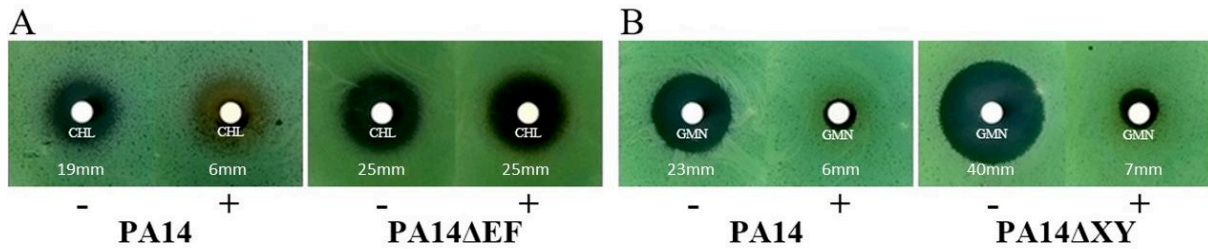


Figure 31 : Résistance à un disque de 30 μg de chloramphénicol, CHL (A) ou de 10 μg de gentamicine, GMN (B) imbibé (+) ou non (-) de 3 μL de glutaraldéhyde (GLT) 25% (les diamètres sont indiqués en mm). Le CHL est substrat de MexEF-OprN et la GMN est substrat de MexXY/OprM.

La figure montre que le GLT induit une baisse de sensibilité au chloramphénicol qui disparaît totalement lorsque MexEF-OprN est inactivée, confirmant la participation de cette pompe à l'effet antagoniste. La résistance de PA14 à la gentamicine augmente également en présence de GLT, ce qui est en accord avec la surexpression de l'opéron d'efflux *mexXY* mesurée par RT-qPCR. Toutefois, cette résistance ne disparaît pas chez la souche PA14 Δ XY, démontrant de fait que MexXY/OprM n'est pas le seul mécanisme impliqué. Les résultats obtenus avec le citral nous font penser que l'interaction entre le GLT et les fonctions NH₂ de la gentamicine conduisent là encore à la formation d'une base de Schiff inactivant l'activité de l'aminoside.

Ce travail a été réalisé avec Ilias Mangeolle (Stage Initiation Recherche, UFR Sciences de la Santé, Besançon).

3.3.3.2 Effets du malondialdéhyde sur la résistance aux antibiotiques

L'activité inductrice d'un autre aldéhyde, le malondialdéhyde (MDA) sur les systèmes d'efflux RND de *P. aeruginosa* et la résistance aux antibiotiques a été évaluée. La concentration de cette molécule de l'inflammation est augmentée dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose pour atteindre 300 nM, soit l'équivalent de 21,6 ng/mL (Antus *et al.*, 2015). Les analyses ont été effectuées avec la souche de référence *P. aeruginosa* PA14.

Le malondialdéhyde a été synthétisé à partir d'un précurseur commercial, le 1,1,2,2-tétraméthoxypropane (Figure 32). Le produit obtenu, dosé par une méthode à l'acide thiobarbiturique (TBA) (*Lipid Peroxidation Assay kit*, Sigma Aldrich) a une pureté équivalente à 85%.

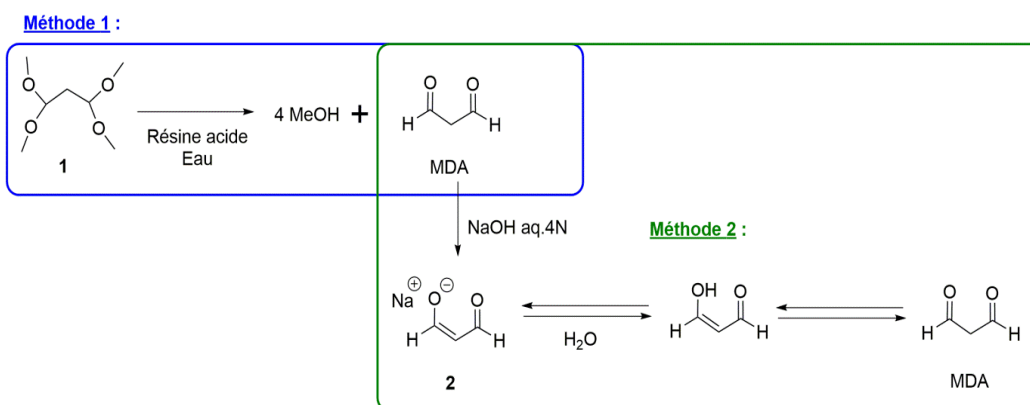


Figure 32 : Procédés de synthèse du malondialdéhyde à partir de son précurseur le 1,1,2,2-tétrahydroxypropane. **Méthode 1** : le précurseur peut être utilisé directement en présence de résines acides gonflant convenablement dans des tampons utilisés en biologie pour donner du MDA. **Méthode 2** : le MDA est converti sous atmosphère contrôlée en son énolate sodique, une forme stabilisée et hydrosoluble du MDA utilisable dans un laboratoire de microbiologie (Gaétan Mislin, Université de Strasbourg).

Le MDA est très peu toxique pour *P. aeruginosa*, sa CMI (déterminée en microplaque) étant > 16 mg/mL. En comparaison, les aldéhydes avec lesquels nous avons travaillé ont des CMI plus basses : 8 mg/mL (citral), 700 µg/mL (cinnamaldéhyde), 512 µg/mL (glyoxal), 256 µg/mL (méthylglyoxal). Nous avons voulu vérifier si des concentrations physiologiques de MDA peuvent avoir un impact sur la sensibilité bactérienne aux antibiotiques. Nos résultats montrent que le MDA, à partir de 30 µg/mL, diminue la sensibilité de *P. aeruginosa* à la gentamicine (substrat de MexXY/OprM) et au chloramphénicol (substrat de MexEF-OprN). Par contre, le MDA ne modifie pas la sensibilité à la ticarcilline, un résultat attendu car les aldéhydes testés jusqu'alors n'ont jamais montré de pouvoir inducteur sur la pompe MexAB-OprM dont cet antibiotique est substrat (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Induction de la résistance aux antibiotiques par le MDA chez la souche PA14

+ MDA (mg/mL)	Concentrations Minimales Inhibitrices (mg/mL)								
	0	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4
Ticarcilline	16	16	16	16	16	16	16	16	16
Gentamicine	0,5	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>4</u>	<u>8</u>	<u>>8</u>
Tobramycine	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>>8</u>
Céfépime	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Ciprofloxacine	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	<u>0,125</u>	<u>0,25</u>
Chloramphénicol	64	<u>128</u>	<u>128</u>	<u>128</u>	<u>256</u>	<u>256</u>	<u>256</u>	<u>256</u>	<u>256</u>

Les valeurs grisées sont celles sans MDA. Les valeurs soulignées indiquent un antagonisme MDA/antibiotique.

Pour s'assurer que l'effet antagoniste du MDA est bien lié à la surproduction des pompes, des tests similaires ont été effectués avec les mutants PA14ΔXY et PA14ΔEFN. Le rôle de la pompe MexEF-OprN dans l'antagonisme avec le chloramphénicol est confirmé (**Tableau 8**). Par contre, la suppression de MexXY n'élimine pas totalement l'antagonisme du MDA sur la gentamicine. Ce phénomène, déjà observé avec d'autres aldéhydes (citral, cinnamaldéhyde...), est probablement dû à la formation d'une base de Schiff. En effet, le MDA

étant porteur de deux groupements aldéhydes (**Figure 28**), une interaction spontanée avec les amines des aminosides est probable.

Tableau 8 : Induction de la résistance aux antibiotiques chez des mutants déficients dans les systèmes MexEF-OprN et MexXY/OprM.

PA14 ΔEFN		Concentrations Minimales Inhibitrices (mg/mL)							
+ MDA (mg/mL)	0	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4
Chloramphénicol	64	64	64	64	64	64	64	64	64
Ciprofloxacine	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06

PA14 ΔXY		Concentrations Minimales Inhibitrices (mg/mL)							
+ MDA (mg/mL)	0	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4
Gentamicine	≤0,125	≤0,125	≤0,125	≤0,125	<u>0,25</u>	<u>0,25</u>	<u>0,5</u>	<u>1</u>	<u>2</u>
Tobramycine	0,125	0,125	0,125	0,125	<u>0,5</u>	<u>0,5</u>	<u>2</u>	4	≥8

Les valeurs grisées sont celles sans MDA. Les valeurs soulignées indiquent un antagonisme MDA/antibiotique.

En conclusion, le MDA, comme les autres aldéhydes testés dans ce travail, induit la surproduction des pompes MexXY/OprM et MexEF-OprN et la résistance aux antibiotiques substrats. Toutefois, son impact sur la sensibilité bactérienne aux antibiotiques apparaît peu probable dans le poumon CF car il y est 1000 fois moins concentré (21,6 ng/mL) que dans les conditions inductrices déterminées dans ce travail.

3.3.3.3 Effets des aldéhydes extraits des huiles essentielles

Pour confirmer le pouvoir inducteur des aldéhydes extraits des HES, nous avons utilisé la construction luminescente PA14::PA2048-lux disponible au laboratoire (Juarez *et al.*, 2017) permettant de rapporter l'induction du système MexEF-OprN *via* l'activateur CmrA. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que le citronellal et surtout la vanilline (**Figure 33**) sont capables d'induire MexEF-OprN et d'augmenter la résistance aux antibiotiques substrats de 2- à 4-fois (chloramphénicol et ciprofloxacine) (résultats non montrés). La perte de la fonction aldéhyde du citronellal et son remplacement par la fonction alcool du citronellol, fait disparaître cette induction.

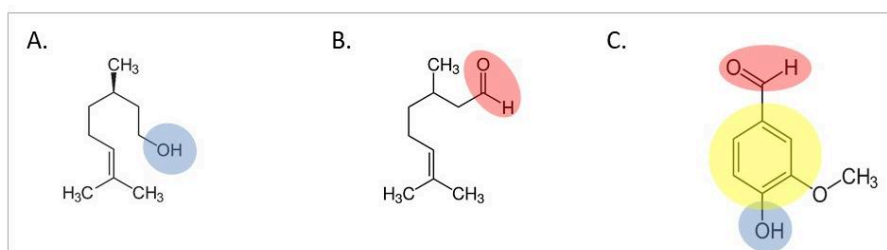


Figure 33 : Structure chimique du (A) citronellol (en bleu, la fonction alcool), (B) citronellal (en rouge, la fonction aldéhyde) et (C) vanilline (en jaune, la fonction phényl).

L'effet de ces aldéhydes naturels sur MexXY/OprM est plus modeste, aucune surexpression du gène *mexY* n'ayant pu être mise en évidence par RT-qPCR. Par contre, une augmentation

de la CMI de la tobramycine jusqu'à 8-fois évoque à nouveau la formation de bases de Schiff avec la fonction aldéhyde de ces produits naturels.

3.4 Sensibilité des souches cliniques aux extraits d'huiles essentielles

L'essentiel des travaux que nous avons réalisés a eu pour modèle la souche sauvage de référence PA14. Néanmoins, au regard de l'utilisation des huiles essentielles en clinique il semble important d'explorer l'effet des huiles essentielles sur les souches isolées dans différents contextes cliniques. En effet, nous avons déjà pu observer lors de nos travaux sur le cinnamaldéhyde, que la souche CF de référence LESB58 montrait une très grande sensibilité à ce composé, comparativement à PA14 ou à d'autres souches environnementales, probablement en raison d'une mutation inactivatrice dans l'opéron codant la pompe d'efflux MexEF-OprN (Tetard *et al.*, 2019).

Notre objectif, a été d'une part, de chercher à connaître quelle pouvait être la consommation des patients atteints de mucoviscidose (CF) en HEs et ensuite, de déterminer la sensibilité de souches CF de *P. aeruginosa* isolées au CHU de Besançon à quelques composés extraits d'HEs, afin de la rapporter au niveau de production des systèmes d'efflux.

3.4.1 Enquête sur la consommation d'huiles essentielles chez les patients CF du CRCM de Besançon.

Au cours de ce travail de thèse, une enquête nationale, soutenue par l'association VLM (*Vaincre la Mucoviscidose*) a été engagée en 2020 pour connaître la consommation de 500 patients CF de plusieurs CRCM français en huiles essentielles (porteur de projet, Florence Souard, Université Grenoble Alpes). N'ayant pas pu disposer des résultats de cette étude avant 2021, nous avons nous même réalisé une enquête locale auprès des patients adultes du CRCM (Centre de Ressources et de Compétences contre la Mucoviscidose) de Besançon (soit 110 patients CF, dont 80 adultes) en accord avec la DRCI de notre CHU (enquête ULTIMO, hUiles essenTielles et MucQviscidose : octobre 2019 – octobre 2020 prolongé en octobre 2021 en raison de l'épidémie de Covid-19) (**Figure 34**).

Utilisation d'huiles essentielles

Enquête **ULTIMO** auprès des patients du CRCM adultes de Besançon 2019-2020 (hors loi Jardé)

Enquêteur : Dr. Catherine Llanes (cllanesb@univ-fcomte.fr ; 03 63 08 22 76) URF SMP – Besançon

Médecin référent : Dr Bénédicte Richaud-Thiriez (bthiriezrichaud@chu-besancon.fr ; 03 81 66 86 41)

Date de la consultation :

Identifiant patient :

(2 premières lettres du nom de famille + première lettre du prénom. Ex, **CHA** pour Charlebois Aurélie)

Age :

Colonisation par *Pseudomonas aeruginosa* : Oui / Non

Consommez-vous des huiles essentielles ? (Vous pouvez préciser la fréquence)

- Jamais
- Parfois
- Souvent

Quelles huiles consommez-vous ? Par quelle voie ? (Vous pouvez indiquer la quantité, en flacons)

Nom des huiles essentielles	Voie d'absorption (massage, inhalation, orale, diffuseurs ambiants...)

Figure 34 : Fiche de renseignement adressée aux patients CF du CRCM adultes de Besançon, lors de leur visite de contrôle (enquête ULTIMO, 2019 – 2021 ; 098 DRC 210 MO03 001, Investigateur C. Llanes).

A ce jour, 49/80 patients adultes ont répondu à notre questionnaire. La consultation des dossiers cliniques à l'aide du logiciel *Axigate* nous a permis d'avoir accès aux données épidémiologiques (spirométrie : % du VEMS, *volume expiratoire maximal par seconde* par rapport au VEMS théorique) et l'utilisation de *MucoDoméos* nous a permis d'obtenir les données anthropométriques : âge, sexe, IMC, génétique, antécédents familiaux, co-infections, traitements antibiotiques. Seules les informations les plus pertinentes ont été rapportée ici. Les résultats de l'enquête révèlent que près d'un tiers des patients CF adultes consomment occasionnellement ou régulièrement des HEs, sans que cela s'accompagne toutefois d'une plus faible colonisation par *P. aeruginosa* (**Figure 35**).

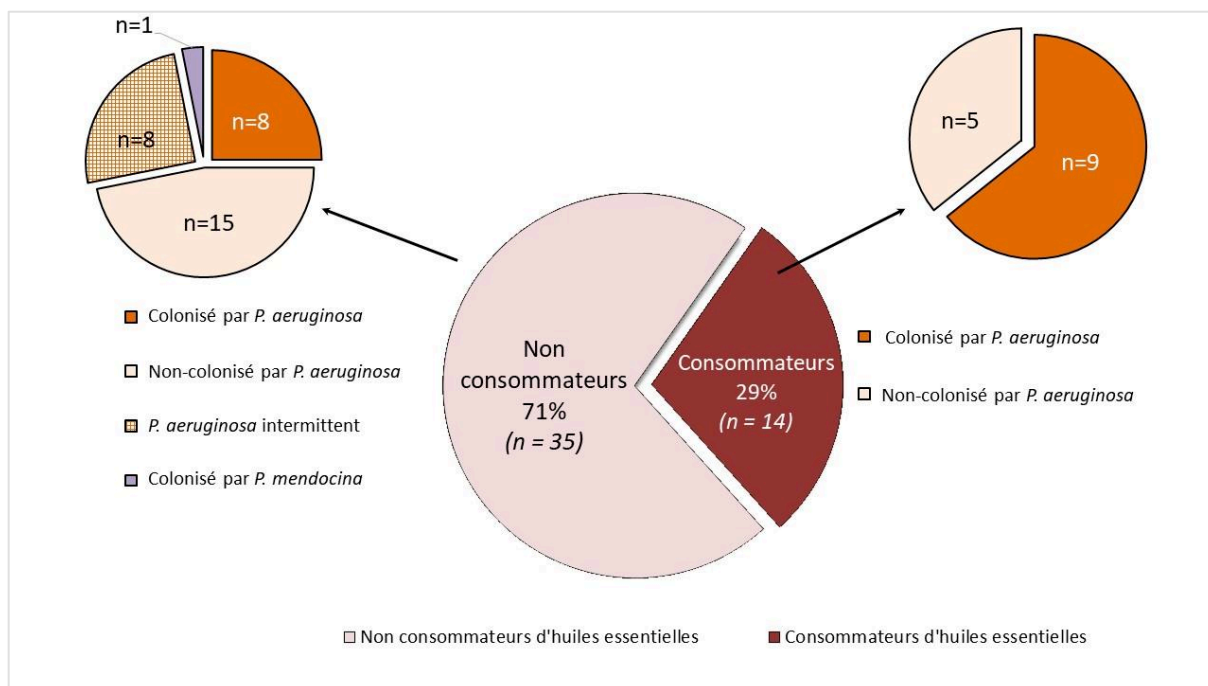


Figure 35 : Représentation graphique de la consommation d'huiles essentielles chez les patients suivis au CRCM en lien avec la colonisation bactérienne par *P. aeruginosa* (enquête ULTIMO, Besançon).

Les mesures de l'IMC et du % VEMS montrent des différences non significatives entre patients CF non-consommateurs et consommateurs d'HEs (respectivement en moyenne 21,3 versus 20,2 pour l'IMC et 73 versus 58 pour le % VEMS). Les HEs préférentiellement consommées par les patients CF de Besançon sont celles d'eucalyptus, de menthe et de citronnelle. Les composés majoritaires de ces huiles ont été présentés **Figure 36**. On y retrouve le citral, étudié dans ce travail de thèse, mais aussi d'autres composés (eucalyptol, thymol, ...) dont l'activité sur la résistance aux antibiotiques de *P. aeruginosa* devra être testée ultérieurement.

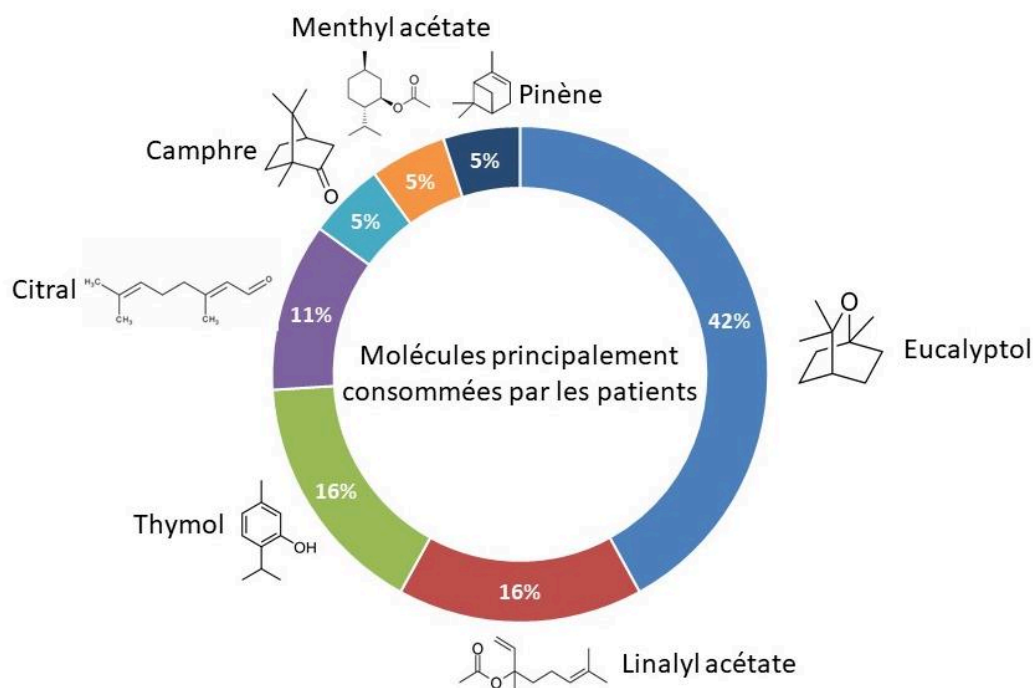


Figure 36 : Molécules extraites d'huiles essentielles préférentiellement consommées par les patients CF du CRCM de Besançon (enquête ULTIMO, Besançon 2019).

3.4.2 Evolution de la sensibilité des souches CF aux extraits d'huiles essentielles au cours du temps

Le laboratoire de Bactériologie médicale conserve les souches de *P. aeruginosa* des patients CF du CRCM de Besançon. Dans ce contexte, il dispose du suivi longitudinal des patients au cours de la colonisation chronique par *P. aeruginosa*. Parmi eux, le patient P6 a été colonisé par *P. aeruginosa* à l'âge de 11 ans. Son suivi médical a permis, à partir de ses expectorations, de collecter, entre 1998 et 2013, les isolats de *P. aeruginosa*, depuis la souche de primo-colonisation jusqu'aux souches tardives collectées après sa greffe pulmonaire en 2004 (Figure 37).

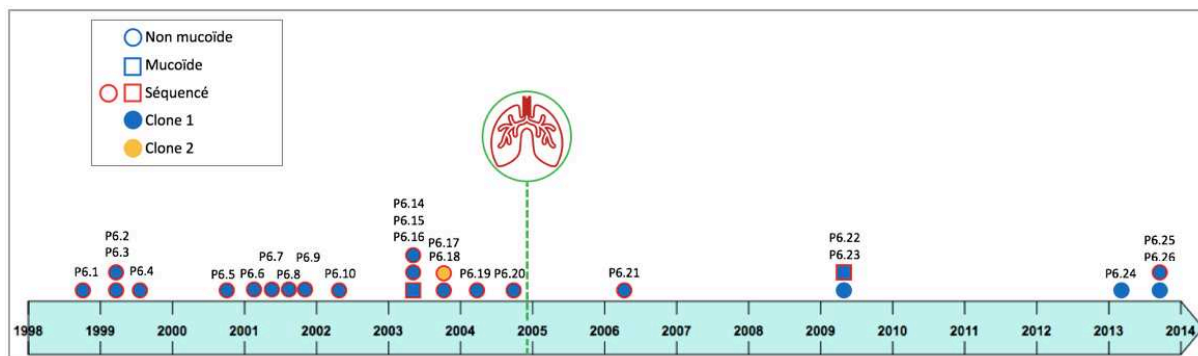


Figure 37 : Chronologie des isolats prélevés entre 1998 et 2014 chez le patient P6. Ce patient a subi une greffe pulmonaire en novembre 2004. L'analyse phylogénétique des génomes a montré que les souches dérivent presque toutes (à l'exception de P6.17) de LESB58. Deux souches (P6.16 et P6.22) sont mucoïdes.

Le phénotype de ces souches montre qu'elles acquièrent une résistance aux β -lactamines, fluoroquinolones et aminosides au cours du temps, une évolution qui tient (i) à la survenue de mutations dans les gènes qui régulent la synthèse du peptidoglycane (*ampR*, *ampC*, *rlpA*, *mpl*), (ii) à l'inactivation de la porine OprD, (iii) à la surproduction du système d'efflux MexXY/OprM, et (iv) à la perturbation de la synthèse protéique (*fusA1*, *fusA2*) ; ces mutations apparaissent chez des souches devenues hypermutatrices en raison l'inactivation de MutS, une protéine impliquée dans la réparation des mésappariements de l'ADN (Gaillot *et al.*, en préparation).

De façon intéressante, ces souches montrent une sensibilité croissante aux composés extraits d'HEs tels que le citral et le CNA (**Figure 38**) probablement due aux modifications de la paroi bactérienne qui laissent pénétrer ces composés naturels. En effet, la perte de l'antigène-O du LPS, observée lors de la colonisation chronique et qui empêche les bactéries d'être reconnues par les acteurs du système immunitaire tels que les récepteurs TLR4 (*Toll- Like Receptor 4*) (Hajjar *et al.*, 2002), fait perdre à la membrane externe sa partie la plus hydrophile et favorise probablement les interactions hydrophobes entre ces composés naturels et la membrane bactérienne.

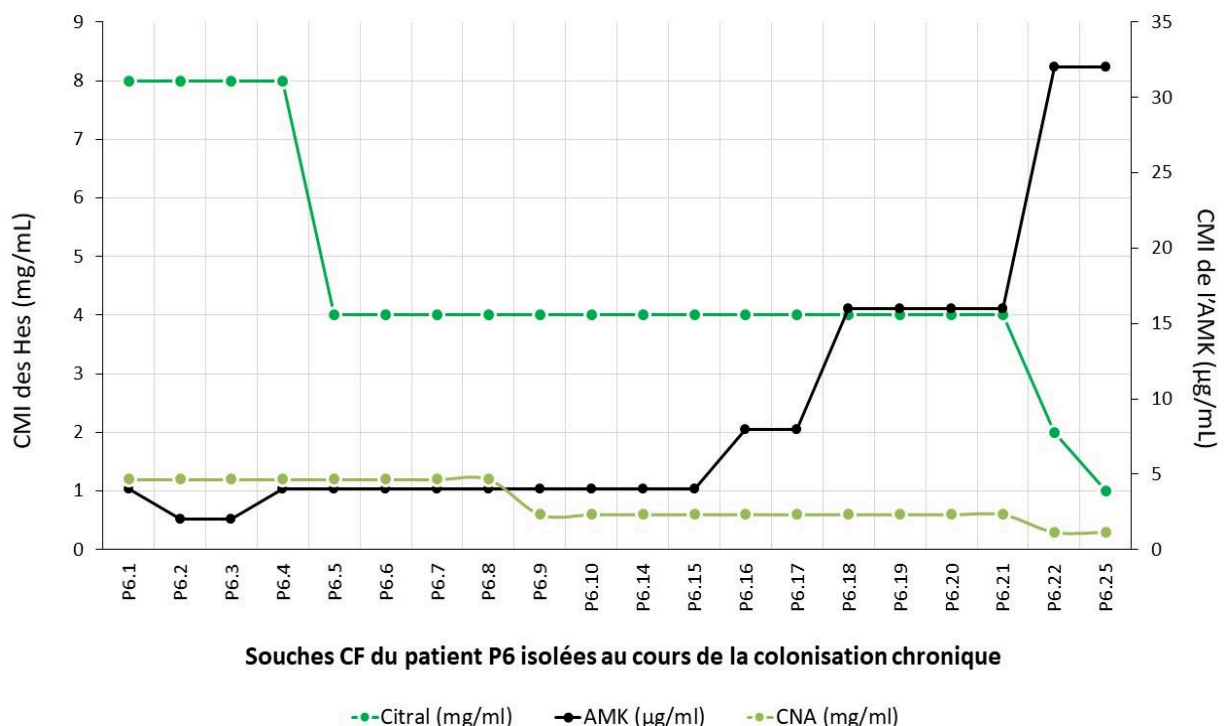


Figure 38 : Evolution de la résistance aux antibiotiques (exemple de l'amikacine, AMK), comparée à celle des huiles essentielles (citral et cinnaldéhyde, CNA) de 19 souches cliniques isolées chez le même patient P6 sur 15 années.

De plus, le système d'efflux MexAB-OprM, connu pour permettre une bonne tolérance des bactéries aux composés naturels, n'est pas du tout activé dans ces souches, les résultats de RT-qPCR montrant que le gène *mexB* est moins exprimé dans les souches CF que dans la souche sauvage PA14 (**Figure 39**). A l'inverse, l'opéron *mexXY* apparaît nettement surexprimé dès la souche P6.4, soit 1 an après la souche de primo-colonisation P6.1. Quant aux systèmes d'efflux MexEF-OprN (gène *mexE*) et MexCD-OprJ (*mexC*), ils ne sont pas surproduits dans ces souches (données non montrées).

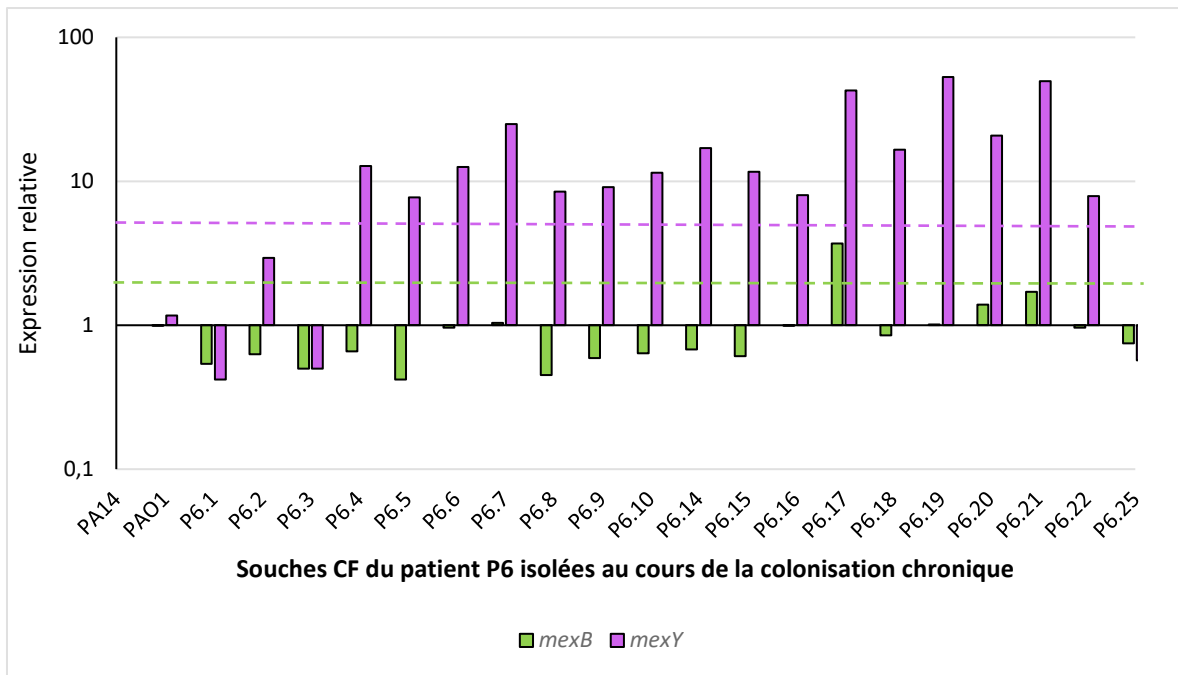


Figure 39 : Niveau d'expression relatif des gènes *mexB* et *mexY* des souches cliniques isolées du patient P6. Les niveaux de surexpression de *mexB* (>2) et de *mexY* (>5) sont indiqués en pointillés.

Au cours de la colonisation chronique, l'activation du système d'efflux MexXY/OprM au détriment de MexAB-OprM est courante. Ce phénomène peut être amplifié chez les souches CF TicHS (hypersensibles à la ticarcilline) dans lesquelles le système MexAB-OprM est inactif consécutivement à des mutations dans l'opéron d'efflux (chez près de 30% des isolats de *P. aeruginosa*) (Vettoretti *et al.*, 2009). Nous avons donc recherché dans nos collections des souches CF présentant ce phénotype TicHS et avons déterminé leur sensibilité aux CNA, comme attendu, chez toutes les souches l'inactivation de MexB conduit à une augmentation de la sensibilité au CNA (**Figure 40**). Afin d'avoir un élément de comparaison, nous avons également inclus des souches génétiquement proches (d'après les données de NGS) quand c'était possible (collection GERPA, Llanes *et al.*, 2013).

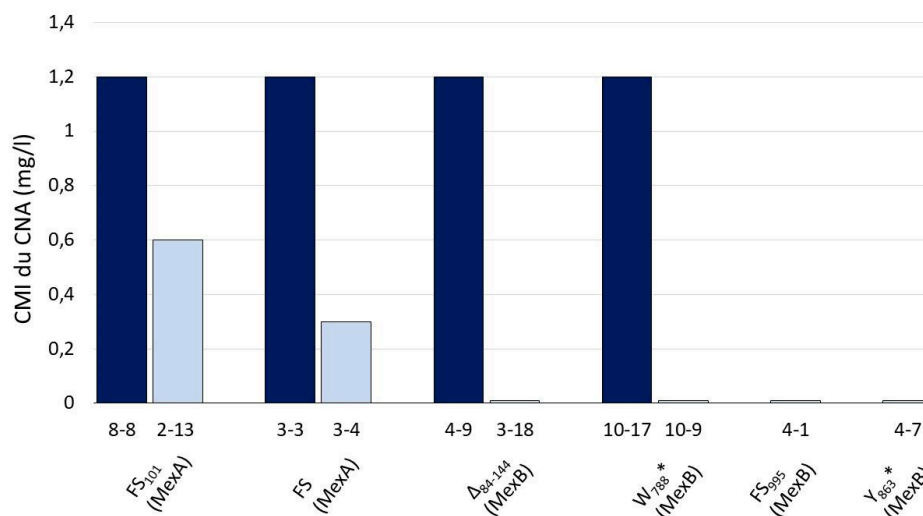


Figure 40 : Sensibilité au cinnaldéhyde de souches TicHS isolées de patients CF en comparaison à des souches non-TicHS génétiquement proches.

Nous constatons là encore que les souches inactivées dans MexAB-OprM ont perdu toute résistance au CNA (et probablement aux composés phénoliques naturels).

Ce travail a été réalisé avec Salomé Kiener (Master Signalisation Cellulaire et Moléculaire, UFR Sciences et Techniques, Besançon).

3.4.3 Sensibilité aux HEs de souches cliniques non-CF MexAB⁺

A l'inverse, nous avons testé la sensibilité aux HEs de souches cliniques non-CF montrant une sensibilité diminuée aux β -lactamines en raison de la surproduction de la pompe d'efflux MexAB-OprM (souches *mexAB*⁺). A Besançon, le Centre National de Référence (CNR) reçoit des souches de *P. aeruginosa* de toute la France afin d'apporter son expertise sur les mécanismes de résistance développés par cette bactérie. Depuis 2011, 72 souches isolées au CHU d'Ajaccio (Corse) ont été envoyées au CNR. De façon remarquable, près de 50% de ces souches (35/72) ont un profil de résistance qui évoque la surproduction de la pompe MexAB-OprM (*mexAB*⁺). En comparaison, les études effectuées ailleurs dans le monde sur des souches résistantes aux carbapénèmes ou à la ticarcilline (substrats de MexAB-OprM), montrent que le pourcentage de souches *mexAB*⁺ est inférieur, variant de 17% (Pan *et al.*, 2016) à 28% (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009) voire 46% (Hocquet *et al.*, 2007).

Or, la Corse est connue pour sa flore d'une exceptionnelle richesse avec de nombreuses espèces endémiques, dont le pin corse (*Pinus nigra ssp laricio var. Corsicana*), une espèce d'une grande importance à la fois écologique, mais aussi économique. L'analyse des molécules extraites du pin corse montre une abondance exceptionnelle de composés phénoliques, tels que l'eugénol et le créosol (Cannac *et al.*, 2007). Nous avons donc formulé l'hypothèse que les souches de *P. aeruginosa* isolées en Corse proviennent d'écosystèmes riches en plantes aromatiques productrices de molécules phénoliques qui exercent une pression de sélection pouvant expliquer la prévalence des souches MexAB⁺.

Partant du constat que la résistance au CNA de la souche de référence PA14 est associée à une surproduction de MexAB-OprM via NalC-ArmR, nous avons recherché des mutations inactivatrices dans le gène répresseur *nalC* et les avons corrélées avec des niveaux de résistance à différents composés phénoliques extraits d'HEs (CNA, eugénol, carvacrol, créosol).

La quantification relative des transcrits montre que l'expression du gène *mexB* est significativement supérieure au seuil (entre 2,5- et 6,3-fois celle de PA14) chez 33/35 des souches corses, confirmant leur caractère *mexAB*⁺. Ces souches présentent une résistance accrue au créosol (CMI de 3000 à 4000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) par rapport à PA14 (CMI de 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), alors que l'inactivation de MexAB-OprM (PA14 Δ AB) se traduit par baisse de la CMI (1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Ce constat est le même avec le CNA et le carvacrol, deux molécules phénoliques, dont la CMI passe respectivement de 700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chez PA14 à 900 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et plus de 3500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ chez les souches *mexAB*⁺ (alors qu'elle est de 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pour les deux molécules chez

PA14ΔAB). La CMI de l'eugénol n'a pas pu être établie car son manque de solubilité n'a pas permis de tester de concentrations supérieures à 3000 µg/mL (données non montrées).

Le séquençage du gène *nalC* a permis d'identifier un certain nombre de mutations par rapport à la souche de référence PA14, mais la plupart relevaient du polymorphisme génétique puisqu'elles étaient trouvées dans des souches non-surproductrices de MexAB-OprM (**Tableau 8**). Au final, seules 4/33 souches présentaient des mutations non-sens ou faux-sens dans *nalC*, suggérant que la surexpression de *mexAB-oprM* dans les souches corses est due à l'implication d'autres régulateurs.

Tableau 9 : Mutations dans la protéine NalC des souches corses. La séquence en acide aminés de la protéine NalC des souches cliniques est comparée à celle des souches sauvages (WT) PAO1 et PA14.

Nom/ Nombre	Acides aminés modifiés de NalC (de 1 à 213 aa)						Sensibilité au créosol (µg/mL)
	71	72	145	153	186	209	
Souches sauvages							
PA14	E	E	V	E	A	R	2500
PAO1	G	E	A	E	A	S	2500
PA14ΔABM	E	E	V	E	A	R	1500
Souches mexAB+							
<i>n</i> = 33							
23	E	E	A	Q	A	R	3000 - 3500
5	E	E	A	E	A	R	3000 - 3500
1	E	E	A	E	A	S	3000
1	E	E	A	D	T	S	4000
3	E	Stop	V	E	A	R	3000

En gris, substitutions non significatives (polymorphisme génétique) ; en rouge, substitutions inactivatrices de NalC ; en noir, substitutions jugées neutres par PROVEAN ; en gras, nombre de souches affectées dans *nalC*.

Un séquençage du génome complet sera réalisé afin de mettre en évidence les régulateurs impliqués, connus ou inconnus ; il permettra aussi de voir si certaines mutations peuvent être associées à des niveaux de résistance plus élevés aux extraits d'HEs. En effet, comme évoqué dans le chapitre précédent, paragraphe 3.2), bien qu'il soit clair que MexAB-OprM participe à la tolérance de *P. aeruginosa* à ces composés naturels, il est possible que les événements génétiques menant à cette surexpression aient des impacts différents.

4. Discussion

Le traitement des infections bactériennes reste encore aujourd'hui un problème majeur de santé publique qui demande le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Dans ce contexte, l'utilisation des huiles essentielles (HEs) peut sembler séduisante car certaines bactéries y sont particulièrement sensibles et des synergies ont pu être observées *in vitro* avec des antibiotiques. Toutefois, cette pratique semble moins adaptée pour lutter contre le pathogène opportuniste *P. aeruginosa*, naturellement résistant vis-à-vis de nombreux inhibiteurs présents dans l'environnement.

4.1 Rôle de l'efflux actif dans l'adaptation aux huiles essentielles

Les HEs renferment fréquemment des composés carbonylés (-CO-). Parmi ceux-ci, les aldéhydes cycliques et acycliques ont la plus forte activité antibactérienne car leur caractère fortement électrophile (déficients en électrons) leur permet de former des liaisons avec des composés nucléophiles (excédentaires en électrons). Dans ce travail, nous avons montré que le cinnamaldéhyde (cyclique) et le citral (acyclique) sont susceptibles d'avoir des effets antagonistes avec certains antibiotiques *in vitro*, impliquant des mécanismes chimiques et/ou biologiques. Cet antagonisme étudié chez *P. aeruginosa*, mais observé également avec d'autres bactéries Gram négatives et Gram positives, repose notamment sur (i) des interactions chimiques directes entre les groupements aldéhydes électrophiles et les fonctions amines de certains antibiotiques et/ou (ii) l'induction de systèmes d'efflux actif (MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN et/ou MexXY/OprM), lesquels s'opposent à l'accumulation intracellulaire des antibiotiques (Tetard *et al.*, 2019, 2021).

L'implication systématique des pompes d'efflux dans la réponse au stress provoqué par les molécules électrophiles d'origine végétale souligne le rôle de détoxification de ces systèmes de transport, déjà mentionné dans la littérature à propos de stress exogènes (exposition à des antibiotiques, des antiseptiques, des métaux lourds, des solvants...) ou endogènes (molécules antibiotiques chez les bactéries productrices, anthranilate) (Aendekerk *et al.*, 2005). Ainsi, grâce à leur polyspécificité, les pompes d'efflux sont un élément-clé de l'adaptation microbienne à des environnements variés (Martinez *et al.*, 2009). Il a été noté que le nombre de pompes d'efflux augmente avec la taille du génome et les capacités d'adaptation de l'espèce (Ren and Paulsen 2005) (**Figure 41**).

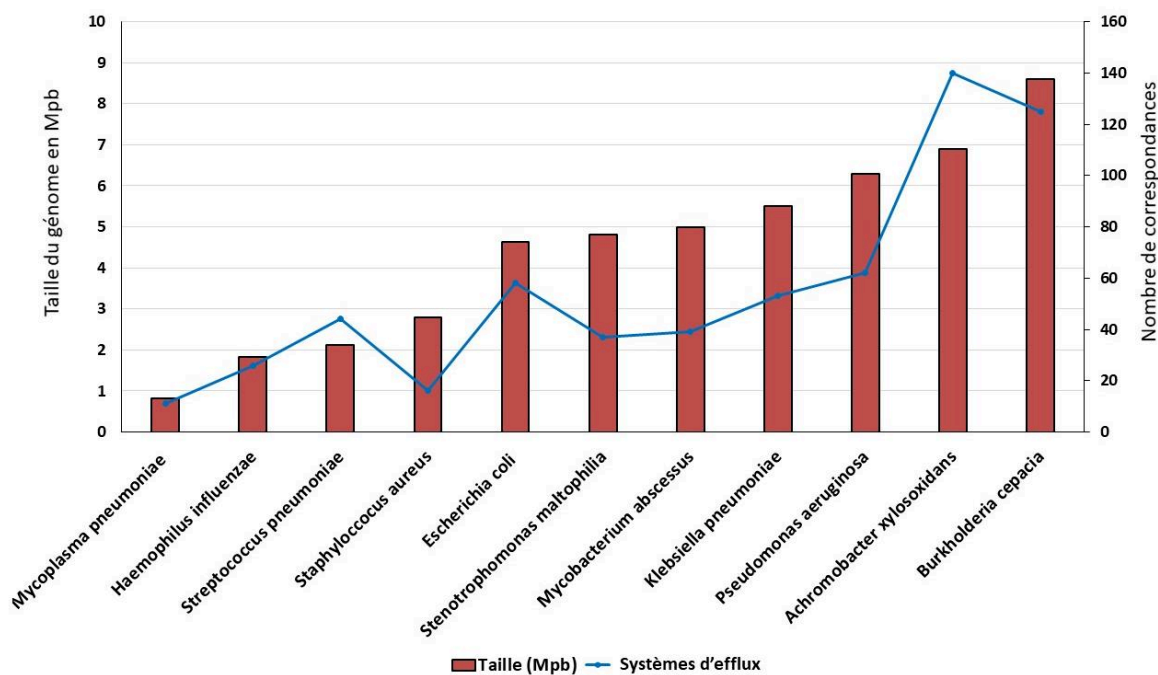


Figure 41 : Corrélation entre la taille du génome bactérien et le nombre d'opérons annotés comme étant des systèmes d'efflux. (Analyse réalisée par Benoit Vallot, plateforme B2ME - Biologie, Biologie Moléculaire, Ecophysiologie, Université de Franche-Comté).

La tolérance de nombreuses espèces microbiennes aux composés électrophiles d'origine végétale n'est pas en soi surprenante car les interactions bactéries-plantes sont courantes dans les écosystème aquatiques et terrestres, en particulier au niveau de la rhizosphère. Ainsi plusieurs travaux montrent que les pompes d'efflux participent au dialogue moléculaire avec les plantes, favorisant ainsi la colonisation bactérienne de ces organismes (Vargas *et al.*, 2011). Dans certains cas, les pompes assurent une première ligne de défense contre des inhibiteurs. Par exemple, le coumestrol, un isoflavonoïde à action antimicrobienne présent dans les exsudats racinaires, induit l'expression de l'opéron *ifeABR* chez le phytopathogène *Agrobacterium tumefaciens*, ce qui permet à la bactérie de coloniser et d'infecter plus facilement les racines (Palumbo *et al.*, 1998). Dans d'autres cas, ce ne sont pas des molécules toxiques qui activent la production des pompes d'efflux. C'est le cas de l'acide salicylique, un acide phénolique utilisé par les végétaux comme molécule de signalisation pour activer des processus de résistance aux infections. Ainsi, l'acide salicylique provoque la synthèse accrue des pompes AcrAB et EmrA chez la bactérie phytopathogène *Erwinia chrysanthemi* (Ravirala *et al.*, 2007). De même, l'acide salicylique induit l'expression d'opérons d'efflux chez *Burkholderia cepacia*, un pathogène de l'Homme dont le réservoir est environnemental (Nair *et al.*, 2004). Enfin, les interactions plantes/bactéries médiées par les systèmes d'efflux ne se déroulent pas que dans un contexte de virulence et d'infection, mais peuvent favoriser les relations symbiotiques, comme par exemple, en améliorant la production de nodules fixateurs d'azote. Des travaux ont montré qu'un mutant de *Rhizobium etli* ayant une pompe RmrAB inactive entraînait la formation d'un nombre plus faible de nodules (40%) chez le haricot *Phaseolus vulgaris*, comparativement à la souche parentale sauvage (González-Pasayo *et al.*, 2000).

Toutefois, les différentes pompes d'une espèce bactérienne ne sont pas toutes impliquées dans la défense contre des inhibiteurs d'origine végétale. Nous avons montré que MexEF-OprN et MexXY/OprM contribuent à la résistance aux aldéhydes, alors que MexAB-OprM joue un rôle majeur dans la tolérance aux molécules aromatiques chez *P. aeruginosa*. D'ailleurs l'implication de TtgABC, homologue de MexAB-OprM chez *P. putida*, est connue depuis longtemps pour permettre à cette espèce de résister aux hydrocarbures aromatiques tels que le toluène, un solvant organique très toxique qui cible la membrane bactérienne et y provoque des perturbations majeures (Ramos *et al.*, 2015, Molina-Santiago *et al.*, 2017, Henríquez *et al.*, 2020). Néanmoins, ces systèmes étant activés de façon transitoire, ils semblent constituer un premier mécanisme de défense avant l'activation de processus plus efficaces de détoxification impliquant des voies de dégradation. Ces voies restent à identifier chez *P. aeruginosa*, ainsi que les métabolites produits.

La compréhension des voies par lesquelles certains systèmes d'efflux sont activés est, elle aussi, incomplète à ce jour. Certains régulateurs ont été identifiés. Par exemple l'exposition de bactéries au CNA déclenche la surexpression de l'opéron *mexAB-oprM* via le répresseur NalC et l'anti-répresseur de MexR, dénommé ArmR. Toutefois, il n'est pas encore établi que le CNA se fixe sur la protéine NalC et lève de façon directe la répression du gène *armR*. D'autres molécules capables d'entraîner une augmentation de l'efflux chez *P. aeruginosa* pourraient interférer avec le chimiotactisme (Luu *et al.*, 2015) ou des systèmes à deux composants (*Two Components Systems*, TCS) (Housseini B Issa *et al.*, 2018). Ainsi, l'activation du TCS RocS2/RocA2 inhibe la production de MexAB-OprM dans un modèle biofilm (Sivaneson *et al.*, 2011), et celle de ParR/ParS cause la surproduction de MexEF-OprN et de MexXY/OprM (Muller *et al.*, 2011) ; il en est de même avec AmgR/AmgS et MexXY/OprM (Wang *et al.*, 2013) (**Tableau 10**). Les signaux moléculaires détectés par les TCS restent mal connus et certains pourraient avoir des similitudes avec des composés de plantes, notamment des substances volatiles. Pour explorer cette possibilité, il serait intéressant de construire des fusions transcriptionnelles entre le gène d'un régulateur de réponse (*ex, parR, amgR...*) et un gène rapporteur (opéron *luxCDABE*), et mesurer la luminescence produite par la bactérie lorsqu'elle est cultivée en présence de différentes molécules volatiles d'origine végétale.

Enfin, seuls quelques composés électrophiles extraits d'HEs ont été étudiés au cours de cette thèse et sélectionnés en raison de leur grande réactivité avec les membranes, les protéines ou même l'ADN. Cependant, les plantes produisent une vaste palette de métabolites secondaires en plus de ceux qui composent les HEs, qu'il faudrait pouvoir cribler afin de mieux appréhender leurs interactions avec des mécanismes de résistance aux antibiotiques. Ainsi, il a été rapporté que des flavonoïdes tels que la naringénine, la phlorétine, le coumestrol, la génistéine, l'apigénine et la quercétine. Des molécules phénoliques tricycliques végétales non-issues d'HEs, pouvaient activer chez *S. maltophilia* le système SmeDEF, et conférer une résistance accrue aux fluoroquinolones (García-León *et al.*, 2014).

Même si, comme nous l'avons démontré chez *P. aeruginosa*, une augmentation de l'efflux est systématiquement associée au stress généré par les électrophiles végétaux extraits des HEs, il est fort probable que d'autres mécanismes d'adaptation soient mis en œuvre par la bactérie. Des travaux ont montré que *E. coli*, *S. aureus* et *Salmonella enterica* tolèrent le thymol, le

carvacrol, le limonène, le CNA et/ou l'eugénol en diminuant la fluidité de leurs membranes, et le rapport acides gras insaturés/saturés (Di Pasqua *et al.*, 2007, He *et al.*, 2015). Toutefois aucune mesure de perméabilité n'a été effectuée pour confirmer le rôle de ces changements dans la résistance aux produits mentionnés. Pour mettre en évidence la diffusion de certaines de ces molécules (en particulier les terpénoïdes) à travers l'enveloppe bactérienne, on pourrait envisager d'utiliser leur fluorescence naturelle et de suivre leur effet sur les membranes par microscopie à fluorescence (Boschi *et al.*, 2011, Miao *et al.*, 2020).

4.2 Contraintes expérimentales

4.2.1 La solubilité

Il faut cependant noter que les HEs sont des mélanges complexes, peu solubles dans l'eau, dont l'activité antimicrobienne est difficile à évaluer. En conséquence, le choix des techniques de mesure (diffusion en milieu gélosé, dilution en milieu liquide ou phase vapeur), peut donner lieu à des résultats différents, sans compter les variations dues à la stabilité des constituants des HEs au cours du temps (Pauli *et al.*, 2010). Dans ce travail, les extraits d'HEs ont été aliquotés, conservés à l'abri de la lumière et à +4°C, mais l'évaporation des composés pendant les périodes d'incubation peut perturber les résultats. Nous avons donc favorisé les observations réalisées sur de courtes durées (maximum 6h) ou avons eu recours à des microplaques scellées pour la détermination des CMI sur 18h. Enfin, en raison de leur caractère très hydrophobe (**Tableau 11**), les extraits d'HEs ont une faible biodisponibilité en milieux aqueux, ce qui pourrait expliquer pourquoi des fortes concentrations (1000 fois supérieures aux quantités d'antibiotique) sont nécessaires pour observer des effets biologiques, la phase aqueuse des milieux de culture étant saturée et une partie des HEs restant à l'état de micelles. De plus, nous avons fait le choix de réduire au maximum les concentrations de produit « solubilisant » tel que le DMSO afin de ne pas interférer avec les mesures de sensibilité ou l'étude du caractère mutagène des HEs. En effet, il a été rapporté que la génotoxicité des HEs pourrait être sous-estimée par l'utilisation du DMSO comme solvant (Quintero *et al.*, 2012). On remarque que les CMI du CNA (700 µg/mL) et du citral (8000 µg/mL) pour la souche PA14 de *P. aeruginosa* sont proches des concentrations maximales pouvant être obtenues en phase aqueuse (**Tableau 11**). Il est par conséquent possible que des mutants plus résistants que ceux que nous avons isolés puissent être sélectionnés dans d'autres conditions, comme par exemple lors d'une exposition à des produits en phase gazeuse. Alternativement, nos mutants pourraient avoir une résistance plus élevée que celle déterminée en phase liquide puisque la gamme de concentrations testée est limitée par la solubilité maximale des produits.

Tableau 10 : Systèmes à deux composants impliqués dans la résistance aux antibiotiques chez *Pseudomonas* spp (d'après Francis, Stevenson, et Porter 2017).

Senseurs histidine kinase	Régulateurs de réponse	Molécules activatrices	Implications dans la résistance	Références
PA14_52260 (<i>gacS</i>)	PA14_30650 (<i>gacA</i>)	Solvants extracellulaires	Résistance au chloramphénicol, efflux PseABC (<i>P. syringe</i>)	(1)
PA14_12820 (<i>rocS1</i>)	PA14_12810/12780 (<i>rocR- rocA1</i>)	Inconnues	Induction de MexAB-OprM	(2)
PA14_59800 (<i>pvrS</i>)	PA14_59790 (<i>pvrR</i>)	Inconnues	Résistance aux antibiotiques liée à la formation du biofilm	(3)
PA14_38970 (<i>ercS</i>) PA14_38910 (<i>erbR</i>)	PA14_38930 (<i>erbR</i>) PA14_38900 (<i>eraR</i>)	Métabolites cytosoliques	Résistance aux antibiotiques liée à la formation du biofilm	(4)
PA14_49170 (<i>phoQ</i>)	PA14_49180 (<i>phoP</i>)	Mg ²⁺ (déplétion)	Induction de l'opéron <i>arn</i> (résistance aux polymyxines)	(5)
PA14_41270 (<i>parR</i>)	PA14_41260 (<i>parS</i>)	Peptides polycationiques	Induction de MexXY/OprM et résistance aux polymyxines <i>via arn</i>	(6)
PA14_24340 (<i>cprS</i>)	PA14_24350 (<i>cprR</i>)	Peptides antimicrobiens	Résistance aux polymyxines liée à PhoQ	(7)
PA14_56940 (<i>colS</i>)	PA14_56950 (<i>colR</i>)	Zn ²⁺	Résistance aux polymyxines liée à PhoQ	(8)
PA14_63160 (<i>pmrB</i>)	PA14_631450 (<i>pmrA</i>)	Mg ²⁺ (déplétion)	Résistance aux polymyxines <i>via</i> l'opéron <i>arn</i>	(9)
PA14_06070 (<i>creC</i>)	PA14_06060 (<i>creB</i>)	Inconnues	Induction du gène <i>ampC</i> et résistance aux β-lactamines	(10)
PA14_46370	PA14_46360	Signaux diffusibles	Résistance aux polymyxines par production de molécules de stress	(11)
PA14_31950 (<i>czcS</i>)	PA14_31960 (<i>czcR</i>)	Zn ²⁺ , Cd ²⁺ , Co ²⁺	Résistance aux carbapénèmes <i>via</i> la répression du gène <i>oprD</i>	(12)
PA14_29740 (<i>carS</i>)	PA14_29730 (<i>carR</i>)	Fe ²⁺	Régulation de gènes de résistance aux aminosides et polymyxines	(13)
PA14_27800 (<i>copS</i>)	PA14_27810 (<i>copR</i>)	Cu ²⁺	Résistance aux carbapénèmes par la répression du gène <i>oprD</i>	(14)
PA14_22730 (<i>cpxA</i>)	PA14_22760 (<i>cpxR</i>)	Inconnues	Induction de MexAB-OprM	(15)
PA14_62530 (<i>cbrA</i>)	PA14_62540 (<i>cbrB</i>)	Sources de carbones	Résistance aux polymyxines et aminosides, liée à PhoQ	(16)
PA14_68680 (<i>amgS</i>)	PA14_68700 (<i>amgR</i>)	Aminosides	Induction de MexXY/OprM (résistance aux aminosides)	(17)

(1)(Gooderham *et al.*, 2009) ; (2)(Sivaneson *et al.*, 2011) ; (3)(Drenkard *et al.*, 2002) ; (4)(Beaudoin *et al.*, 2012) ; (5)(Macfarlane *et al.*, 2000) ; (6)(Muller *et al.*, 2011) ; (7)(Gutu *et al.*, 2013) ; (8)(Gutu *et al.*, 2013) ; (9)(Bolard *et al.*, 2019), (10)(Ryan *et al.*, 2008) ; (11)(Zamorano *et al.*, 2014) ; (12)(Dieppois *et al.*, 2012) ; (13)(Kreamer *et al.*, 2015) ; (14)(Caille *et al.*, 2007) ; (15)(Tian *et al.*, 2016) ; (16)(Yeung *et al.*, 2011) ; (17)(Lau *et al.*, 2013).

4.2.2 Variabilité inter-souches

Un autre point important à rappeler ici est le fait que les résultats obtenus dans le cadre de notre thèse ont été obtenus *in vitro* avec la souche de *P. aeruginosa* PA14 ; ils ne peuvent donc pas être extrapolés au domaine clinique sans études complémentaires. Des premiers éléments indiquent que la sensibilité aux HEs varie entre les souches cliniques (CF ou non), les plus résistantes surproduisant en général le système MexAB-OprM et les moins résistantes, provenant des malades CF. Pour mieux analyser les antagonismes possibles entre antibiotiques et HEs, nous envisageons à l'avenir d'étudier une collection diversifiée de souches CF comme celle recueillie dans le cadre de l'étude multicentrique GERPA-Muco2 (subvention VLM 2019, porteur de projet Pr P. Plésiat) et de concentrer les recherches sur les HEs ayant un impact sur l'activité des β -lactamines, des aminosides et/ou des polymyxines.

Tableau 11 : Coefficient de partage et solubilité dans l'eau de molécules issues d'huiles essentielles comparés à ceux de molécules antibiotiques (soulignées). Les molécules indiquées en gras sont celles qui ont été utilisées lors de cette thèse.

Molécules	Coefficient de partage octanol/eau	Solubilité dans l'eau (g/L) à 25°C
Acétate de linalyl	+3,9	0,03
Citronellal	+3,0	0,07
Geraniol	+3,56	0,1
Citronellol	+3,41	0,2
Terpinène-4-ol	+3,26	0,4
Menthol	+3,15	0,5
Thymol	+3,3	0,9
Cinnamaldéhyde	+1,9	1,1
Carvacrol	+3,49	1,25
Citral	+2,76	1,34
Linalol	+2,97	1,6
Alcool cinnamique	+1,95	1,8
Coumarine	+1,39	1,9
Eugénol	+2,7	2,46
Eucalyptol	+2,5	3,5
Vanilline	+1,17	10,0
<u>Ampicilline</u>	+1,35	10,1
Créosol	+1,3	23,5
<u>Ciprofloxacine</u>	+0,28	36,0
<u>Tobramycine</u>	-6,2	1000

4.3 Utilisation et efficacité thérapeutique des HEs

L'évaluation de l'activité antibactérienne des HEs *in vivo* constitue une autre difficulté. L'aromathérapie, la branche de la phytothérapie qui consiste à soigner avec des HEs, attire un public à la recherche de solutions plus naturelles pour traiter les infections bénignes. En fait, très peu d'HEs ont satisfait aux exigences de demande d'AMM (par exemple, les HEs de grande

et de petite absinthe, d'armoise ou de sauge officinale ; *ansm.sante.fr*). D'un autre côté, les industriels les intègrent fréquemment dans des produits de ménage (Carolin multisurface aux HEs de jasmin et d'eucalyptus ; nettoyant multiusage Puryfitout ; nettoyant purifiant Jacques Briochin à l'HE d'eucalyptus...) et des cosmétiques (désinfectant Puresentiel ; shampoing l'Occitane aromachologie ; shampoing Le Petit Marseillais anti-pelliculaire à l'HE de cédrat...) ou comme complément alimentaire (confort gastro-intestinal aux HEs de chez LCA ; *organic defense mix* pour l'immunité à base d'HEs de chez Smart...) en raison de leurs qualités aromatiques ou antiseptiques. Le flou réglementaire concernant le statut des HEs et de leurs principaux composés est exploité par les pharmacies d'officine et les sites internet qui sont libres de référencer et de conseiller sans véritable cadre, diverses préparations qui en renferme, leur origine végétale leur conférant une image positive et rassurante. Or, ces mélanges complexes, peu contrôlés et souvent très concentrés, à base de substances chimiques liposolubles de faible masse moléculaire, sont capables de s'insérer aisément dans les membranes cellulaires, d'où un risque toxique potentiel.

4.3.1 Etudes pharmacologiques et toxicologiques

D'après les quelques études pharmacologiques disponibles, il est admis que les composés issus d'HEs peuvent agir par voie neurologique après inhalation et passage dans le mucus nasal (Bradley *et al.*, 2007), ou par voie sanguine après ingestion et absorption par la muqueuse intestinale (Friedl *et al.*, 2010). Dans un modèle murin, les concentrations de différentes HEs, mesurées dans le foie et le cerveau après nébulisation de 10 µl de produit par litre d'air, se sont avérées sensiblement les mêmes dans les deux organes (Satou *et al.*, 2013). Pour répondre à la question de l'écart qui pourrait exister entre les quantités administrées et celles retrouvées dans les organes, une étude a montré que l'aérosolisation de nérolidol (un alcool présent dans de nombreuses HEs) à raison de 1 g/kg d'animal, conduit à une concentration stable de produit pendant 3h égale à 0,24 µg par mL de plasma 30 min après l'administration (Saito *et al.*, 2015).

4.3.2 Etudes chez l'animal

Chez la souris, les composés extraits d'HEs persistent mieux dans l'organisme lorsqu'ils sont co-administrés. Par exemple, une concentration égale à 0,04 mg/g d'organe de pinène a été mesurée après une prise simple, contre 0,08 mg/g suite à l'administration simultanée d'un mélange avec du cymène, du limonène et du 1,8-cinéol, probablement en raison de la saturation des enzymes impliquées dans la métabolisation de ces molécules. L'efficacité anti-infectieuse des HEs reste quant à elle encore mal connue. Pourtant, leur utilisation pourrait se justifier par le fait qu'elles ne sont pas affectées par la plupart des mécanismes de résistance aux antibiotiques (sauf l'efflux) et qu'elles ont, *in vitro*, une activité équivalente sur les souches sensibles et les souches résistantes aux antibiotiques (ESBL, MRSA...) (Faleiro *et al.*, 2013). De plus, certaines ont un effet anti-inflammatoire indéniable démontré chez l'Homme et l'animal (Juergens *et al.*, 2003, Horváth *et al.*, 2015). A cela s'ajoute un effet anti-virulence potentiel (anti-biofilm, anti-*quorum sensing*), qui pourrait être utile dans certaines situations (**Tableau 12**).

Tableau 12 : Activité anti-virulence des HEs et de leurs principaux composés sur quelques bactéries pathogènes ou environnementales. Adapté de (Reichling 2020).

Huiles ou composés extraits d'huiles essentielles	Espèces végétales d'origine	Bactéries	Activité anti-virulence
Huiles de clou de girofle, cannelle, lavande, menthe	<i>Syzygium aromaticum, Cinnamomum zeylanicum, Lavandula angustifolia, Mentha piperita</i>	CV	IQS
Monoterpènes, phénylpropanes	—	CV	IQS
Huile de clou de girofle	<i>Syzygium aromaticum</i>	PA	IB, IFV
Huile de menthe, menthol	<i>Mentha piperita</i>	PA	IB, IFV
Eugénol	—	PA	IB, IFV
Huiles de clou de girofle, piment, baies, eugénol	<i>Laurus nobilis, Syzygium aromaticum, Pimento dioica</i>	EC	IB, IFV
Huiles d'origan, thym, carvacrol, thymol	<i>Origanum vulgare, Thymus vulgaris</i>	EC	IB
Huile d'arbre à thé	<i>Melaleuca alternifolia</i>	SA	IB, IFV
Huile de cyprès Hinoki	<i>Chamaecyparis obtusa</i>	SA	IB, IFV
Eugénol	—	SA, PA	IB, IFV
Eugénol	—	SA	IB, IFV
Carvacrol, citral, (+)-limonène	—	SA	IB
Huile de cannelle, cinnamaldéhyde	<i>Cinnamomum zeylanicum, Cinnamomum cassia</i>	SA, EC, PA	IB
Huile d'arbre à thé	<i>Melaleuca alternifolia</i>	SA	IB
Huile de melaleuca	<i>Melaleuca bracteata</i>	CV	IB, IFV
Huiles de thym, clou de girofle, eugénol, cinnamaldéhyde	<i>Thymus vulgaris, Syzygium aromaticum</i>	SA	IB
Huile d'origan, carvacrol, thymol	<i>Origanum vulgare</i>	SA	IB
Huile d'arbre à thé	<i>Melaleuca alternifolia</i>	SA	IB
Huile d'origan	<i>Origanum onites</i>	SA, EC	IB
Huile d'arbre à thé, lavande, citron, α -terpineol, terpinen-4-ol, linalool, linalyl acétate	<i>Melaleuca alternifolia, Lavandula angustifolia, Melissa officinalis</i>	SA, EC	IB
Huiles de clou de girofle, citronnelle	<i>Syzygium aromaticum, Cymbopogon citratus</i>	SA	IB
Huiles de cassie, baume du Pérou, thym	<i>Cinnamomum aromaticum, Myroxylon balsamum, Thymus vulgaris</i>	PA, SA	IB
Menthol	—	EC	IB, IFV
Huiles de sauge sclarée, genévrier, citron, α -pinène, limonène, linalool	<i>Juniperus communis, Citrus lemon, Salvia sclarea</i>	EC	IB
Huiles de cannelle, arbre à thé, palmier rose	<i>Cinnamomum zeylanicum, Melaleuca alternifolia, Cymbopogon martini</i>	PA	IB
Huile de thym	<i>Thymus vulgaris</i>	EC, PA	IB
Huile de citron	<i>Citrus reticulata</i>	PA	IB, IFV
Huiles d'arbre à thé, clou de girofle, cannelle	<i>Melaleuca alternifolia, Syzygium aromaticum, Cinnamomum zeylanicum</i>	SA, PA	IB
Huile d'eucalyptus, 1 8-cinéole	<i>Eucalyptus globulus</i>	SA	IB, IFV
Huile de citronnelle, géraniole	<i>Cymbopogon nardus</i>	SA	IB
Huile d'origan	<i>Origanum vulgare</i>	SA, PA	IB
Huile de cannelle, eugénol	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	SA, PA	IB
Huiles de romarin, origan, thym	<i>Thymus zygis, Rosmarinus officinalis, Origanum majorana</i>	EC	IB

Bactéries testées : SA, *S. aureus* ; EC, *E. coli* ; PA, *P. aeruginosa* ; CV, *Chromobacterium violaceum*.

Activité anti-virulence : IB : éradication ou inhibition de la formation du biofilm. IFV : Inhibition ou réduction des facteurs de virulence. IQS : perturbation du circuit de signalisation du *quorum sensing*. Seules les indications en **gras** font état d'études réalisées *in vivo*.

Selon nos informations, seules trois publications décrivent l'activité des HEs dans un modèle d'infection du ver *Caenorhabditis elegans* ou du rat. Les études ont montré une survie des nématodes de 60 et 70 % contre 0 % après inoculation avec *P. aeruginosa* (Husain *et al.*, 2013, 2015) et une diminution de 88 % de la colonisation des oreilles des rats (Yadav *et al.*, 2015).

4.1.1 Etudes cliniques

De la même façon, les études cliniques manquent et sont pour la plupart peu concluantes ; elles mettent en avant un intérêt prophylactique ou dans le traitement des infections superficielles (Ferley *et al.*, 1989). Par exemple, une étude clinique sur des infections fongiques cutanées a montré une meilleure efficacité d'une lotion d'HE d'*Artemisia sieberi* (5%) qu'un traitement conventionnel au clotrimazole (1%) (Mahboubi 2017). Dans une autre étude, un cocktail d'HEs utilisé en bain de bouche s'est avéré efficace sur la flore des espaces inter-dentaires, cause de gingivites (Charles *et al.*, 2000). Plus récemment, un mélange d'HEs de girofle, de lavande et de géranium a donné les mêmes résultats que la ciprofloxacine dans le traitement d'otites externe aiguës (Panahi *et al.*, 2014). Après 7 jours, la flore présente avait fortement diminué (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermis*, *Streptococcus spp.*). Chez les patients atteints de bronchite chronique, l'administration pendant un mois d'une capsule de 300 mg de Myrtol® (mélange d'HEs d'eucalyptus, de myrte, d'écorce d'orange et de citron) par voie orale a permis de réduire la prescription d'antibiotiques (Meister *et al.*, 1999), sans que les détails microbiologiques de cette observation soient connus. Enfin, une étude plus récente a montré que la nebulisation d'eucalyptus dans des sondes d'intubation de patients ventilés de réanimation permettait de réduire le développement de *Klebsellia pneumoniae* d'environ 70% (Amini *et al.*, 2016).

Au final, les études cliniques sur les HEs restent rares et aucun projet n'est mentionné dans le registre européen (<https://www.clinicaltrialsregister.eu>). L'absence de réglementation nationale ou internationale contraignante n'incite pas les industriels à entreprendre des études coûteuses dont les résultats pourraient leur être défavorables.

4.2 Huiles essentielles et mucoviscidose

Parmi les patients chez lesquels les HEs pourraient s'avérer bénéfiques, on peut citer ceux atteints de mucoviscidose (CF). En effet, ces derniers sont colonisés de façon chronique par *P. aeruginosa* et soumis à des cures itératives d'antibiotiques.

4.2.1 Enquête auprès des patients CF

A Besançon, notre enquête a révélé que près d'un tiers des malades CF du CRCM adultes, utilisent ou ont utilisé des HEs en automédication. L'association VLM est attentive à ces pratiques et souhaite que les recommandations soient plus claires (magazine « Vaincre », décembre 2019). Elle a d'ailleurs financé en 2019 une étude multicentrique pilotée par l'Université Grenoble-Alpes, dont les résultats partiels ont fait l'objet d'une thèse de Pharmacie (D. Freynet et M. Vivant, 2020 – encadrement Florence Souard). Le questionnaire,

diffusé aux patients (enfants et adultes) des CRCM de Grenoble, Rennes et Montpellier, a permis de recueillir 51 réponses entre le 8 avril et le 30 septembre 2019. Des données épidémiologiques et anthropométriques ont été recueillies (25 ans d'âge moyen ; sexe-ratio 1/1 ; IMC moyen des adultes 21,2 ; VEMS moyen 74%) ainsi que d'autres informations (fréquence des consultations, niveau d'études, traitements reçus, recours à des thérapies non-conventionnelles, sources d'informations...). Les résultats indiquent que sur 51 patients, 21 (41%) ont eu recours à des HEs de façon régulière ou occasionnelle (**Tableau 13**), ceci de leur propre initiative, après consultation de livres ou pages internet ou sur conseil de leur entourage, de leur pharmacien, voire d'un médecin. Il faut souligner que 70% des patients ont utilisé les HEs en même temps que les antibiotiques. Quant aux huiles utilisées, il s'agissait essentiellement de mélanges à visée respiratoire destinés à être appliqués sur la peau (tea-tree, niaouli, girofle et inule) ou en inhalation (eucalyptus, ravintsara et saro). Près de 80% des patients ayant ce type de pratique ont déclaré en retirer des bénéfices (espacement des cures d'antibiotiques ou augmentation de leur capacité respiratoire).

Tableau 13 : Pharmacopées complémentaires chez les patients CF des CRCM de Grenoble, Rennes et Montpellier en 2019. Extrait de la thèse de Pharmacie de Delphine Freynet et Marion Vivant, 2020 – encadrement F. Souard.

	Nombre de patients CF (%) ayant recours à des pharmacopées complémentaires aux traitements antibiotiques				
	<i>Quotidien</i>	<i>Hebdomadaire</i>	<i>Mensuel</i>	<i>< 1 /mois</i>	<i>Jamais</i>
Compléments alimentaires	23 (43,9%)	4 (8,3%)	2 (4,2%)	4 (8,3%)	15(31,3%)
Phytothérapie	1 (2,1%)	2 (4,2%)	4 (8,3%)	4 (8,3%)	37 (77,1%)
Huiles essentielles	4 (8,3%)	4 (8,3%)	3 (6,3%)	10 (21%)	27 (56,3%)
Homéopathie	1 (2,1%)	2 (4,2%)	8 (16,6%)	9 (18,8%)	28 (58,3%)
Probiotiques	5 (10,4%)	4 (8,3%)	8 (16,6%)	9 (18,8%)	22 (45,8%)

En caractère gras, les HEs.

4.2.2 Impact des HEs sur les flores microbiennes

Dans le poumon CF, les micro-organismes forment des communautés polymicrobiennes complexes. Les nouvelles techniques d'analyse (NGS) du microbiote pulmonaire ont mis en évidence un *core* microbiome formé par les genres *Streptococcus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Rothia*, *Actinomyces*, *Gemella*, *Granulicatella*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Atopobium* et *Porphyromonas*, auxquels s'ajoutent des virus, des bactériophages et des champignons (*Aspergillus* spp, *Candida* spp ou *Malassezia* spp) (Françoise *et al.*, 2020). Jusqu'à l'âge de 11 ans, la diversité microbienne est élevée mais lorsque la colonisation par *P. aeruginosa* ou par d'autres pathogènes (*Staphylococcus* spp, *Haemophilus* spp ou *Burkholderia* spp) devient chronique, celle-ci décroît. Les cures d'antibiotiques au long cours ont aussi un impact sur l'évolution du microbiome. Enfin, les flores pulmonaires peuvent être remodelées lors de l'administration de modulateurs du canal CFTR (Peleg *et al.*, 2018, Yi *et al.*, 2021). Dans quelle mesure l'utilisation d'HEs peut perturber l'écosystème pulmonaire et/ou intestinal reste à

évaluer (Enaud *et al.*, 2020). A ce sujet, les nouvelles techniques d'analyse du microbiote par NGS (Next-Generation sequencing) pourraient permettre de faire un état des lieux pré- et post-traitement afin de mieux évaluer l'impact de ces composés (Carney *et al.*, 2020). La plus grande sensibilité des bactéries à Gram positif aux produits volatils par rapport aux Gram négatifs pourrait être source de dysbiose. Les conséquences sur la colonisation par des espèces plus résistantes comme *P. aeruginosa* sont à considérer sérieusement (Pekmezovic *et al.*, 2016). Par conséquent, l'étude de l'impact des composés issus des HEs (CNA, carvacrol, citral, eugénol ...) sur des co-cultures d'agents microbiens apporterait des premiers éléments de réponse sur le risque potentiel de sélectionner des espèces pathogènes (par exemple, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *A. fumigatus*). De la même façon, l'étude des effets d'HEs sur des cultures complexes avec et sans antibiotique serait intéressante pour mieux appréhender des phénomènes d'antagonisme. Les perturbations engendrées par les HEs pourraient être analysées en dénombrant les bactéries cultivables ou celui des OTU (Operational taxonomic unit) si des expectorations de patients CF sont employées.

5. Conclusion

Nous avons conscience que nos travaux sont en marge de la tendance actuelle qui tend à promouvoir l'utilisation des HEs pour renforcer l'activité des antibiotiques contre les bactéries multirésistantes (Langeveld *et al.*, 2014) (**Tableau 4**, dans la synthèse bibliographique). L'effet antagoniste qu'exercent *in vitro* le CNA et le citral sur certains antibiotiques est retrouvé avec les HEs de cannelle et de citronnelle dont la composition renferme majoritairement ces molécules. La prudence est donc de mise pour une application thérapeutique. A ce jour, toutes les ressources naturelles en molécules thérapeutiques n'ont pas été exploitées. Malgré leur statut de non-médicaments les HEs peuvent trouver une place dans l'arsenal anti-infectieux sous réserve de démontrer leur efficacité clinique, leur innocuité et l'absence d'interaction néfaste avec les antibiotiques ou antifongiques. Le public d'une façon générale et les patients en particulier doivent être conscients du manque de connaissances dans ce domaine. Pour y pallier, il sera donc nécessaire d'entreprendre des recherches approfondies sur des bases scientifiques rigoureuses, en prenant soin de favoriser en tout premier lieu, les composés naturels plebiscités par les patients. De plus, bien que ce travail ait été principalement réalisé sur la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, il n'est pas impossible que les résultats obtenus puissent être transposés à d'autres espèces pathogènes de l'Homme.

6. Matériel et méthodes

6.1 Solutions de travail

Différentes solutions ont été utilisées lors de ces travaux. Le cinnamaldéhyde (CNA) et l'alcool cinnamique (CN-OH), (Sigma-Aldrich) à une concentration mère de 1 g/mL ont été dilués au 1/10^{ème} dans du DMSO pur (Sigma-Aldrich) pour une concentration finale de 100 mg/mL. Le citral 0.888 g/mL (Sigma-Aldrich) a été dilué au 1/6^{ème} dans de l'éthanol absolu pour une concentration finale de 146 mg/mL. Le malondialdéhyde (MDA), synthétisé par l'UMR CNRS 7242 (Gaetan Mislin, Equipe Métaux et microorganismes : biologie, chimie et applications, ULP Strasbourg) sous la forme d'une poudre de pureté 85%, a été dilué dans de l'eau distillée pour obtenir les différentes solutions de travail. Les solutions d'antibiotiques ont été préparées à partir de solutions commerciales liquides ou solides (**Tableau 9**).

6.2 Techniques de microbiologie

6.2.1 Milieux de culture, plasmides et souches bactériennes

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés dans ce travail ont été référencés dans le **Tableau 10**.

Différents milieux de culture bactérienne ont été utilisés sous la forme liquide (B, *Broth*) ou gélosée (A, *Agar*) : le milieu Mueller-Hinton (MH) dont les concentrations en cations divalents Ca²⁺ et Mg²⁺ ont été calibrées (respectivement 20-25 µg/mL et 10-12.5 µg/mL) (Becton Dickinson, le Pont de Claix, France), le milieu *Pseudomonas Isolation Agar* (PIA, Becton Dickinson), le milieu M9 (Solution mère 5X : hydrogénophosphate de sodium 0.21 M, phosphate de monopotassium 0.11 M, Chlorure d'ammonium 0.094 M, chlorure de sodium 0.043 M) complémenté de 5% de sucrose. Ces milieux ont été complémentés avec des antibiotiques selon les besoins.

Les souches bactériennes ont été conservées à -80°C dans du milieu cœur-cerveille glycérolé (50%).

6.2.2 Mesure de croissance bactérienne

A partir d'une culture de la nuit issue d'une colonie bactérienne, des suspensions bactériennes ont été réalisées ($A_{600nm} = 0.1$) dans 25 mL de milieu MHB frais, puis placées à 37°C sous agitation (250 rpm). Le développement bactérien a été évalué au cours du temps sur des échantillons de 200 µL par mesure de l'absorbance à 600 nm grâce au lecteur de plaques *Synergy H1 microplate reader* (Biotek Instrument, Winnoski, USA).

6.2.3 Détermination de la sensibilité aux antibiotiques avec ou sans composés

La sensibilité des bactéries aux antibiotiques a été déterminée par la technique de diffusion en milieu gélosé ou par leur mise en contact avec différentes concentrations d'antibiotiques. Dans les deux cas, les antibiotiques ont été utilisés seuls ou en combinaison avec des molécules électrophiles issues d'huiles essentielles.

6.2.4 Antibiogrammes

Les antibiogrammes ont été réalisés par la technique de diffusion en milieux gélosés selon les recommandations du CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, 2017). Une boîte de MHA a été inoculée en nappe avec une suspension bactérienne ajustée à 0,2 McFarland puis diluée au 1/100^{ème}. Un distributeur a été ensuite utilisé pour déposer des disques pré-imprégnés d'antibiotiques (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) ; des disques stériles imprégnés par des composés électrophiles extraits d'huiles essentielles ont également été utilisés pour déterminer la sensibilité de *P. aeruginosa* à ces molécules. La lecture des diamètres d'inhibition a été effectuée après 18 h d'incubation à 37°C.

L'antagonisme entre les antibiotiques et les composés électrophiles a pu être observé en ajoutant les molécules à tester directement sur les disques antibiotiques des antibiogrammes, ceci de façon à avoir : 1, 5 ou 10 mg d'alcool cinnamique ou de cinnamaldéhyde, 4.44 mg de citral ou 500 µg de malondialdéhyde. La diminution du diamètre d'inhibition autour des disques d'antibiotiques lorsqu'ils contenaient la molécule d'intérêt a été interprétée comme un antagonisme entre les deux molécules.

6.2.5 Test de rapprochement de disques

Des disques de papier filtre imprégnés par les molécules d'intérêt (selon les modalités décrites en 1.3.1) ont été déposés sur une boîte de MHAensemencée selon la technique de l'antibiogramme. Des disques chargés d'antibiotiques (Bio-Rad) ont été ajoutés à proximité de façon à obtenir (après incubation) un écart de 1-2 mm entre les deux zones d'inhibition. L'antagonisme entre la molécule d'intérêt et les antibiotiques se manifeste par un aplatissement unilatéral de la zone d'inhibition autour du disque d'antibiotique, du côté où la molécule d'intérêt a été déposée

6.2.6 Détermination de la CMI (concentration minimale inhibitrice)

La CMI des antibiotiques a été déterminée en milieu gélosé ou en milieu liquide complétement ou non par les molécules testées, ceci afin de quantifier l'antagonisme éventuel entre les antibiotiques (A) et les molécules d'intérêts (M). Un ratio $CMI_{A+M}/CMI_A \geq 4$ est indicateur d'un antagonisme (Utcharyakiat *et al.*, 2016).

6.2.7 CMI en milieux gélosé

Des boîtes de MHA ont été réalisées avec des concentrations d'antibiotiques croissantes selon une progression géométrique de raison 2. Un spot de 5 μL de chaque culture bactérienne calibrée à 0.5 McF puis diluée au $10^{\text{ème}}$ ($1,5 \cdot 10^7$ CFU/mL) a été déposé à la surface de la gélose. Les boîtes ont été incubées 18h à 37°C avant lecture de la CMI. Plusieurs séries ont été réalisées avec des géloses renfermant, en plus de l'antibiotique, une concentration fixe de la molécule supposée antagoniste (128, 256 ou 512 $\mu\text{g/mL}$ pour l'alcool cinnamique et le cinnamaldéhyde).

6.2.8 CMI en microplaque

Dans des plaques 96 puits, une gamme de concentrations d'antibiotique de raison 2 a été déposée à l'aide du robot pipeteur automate *Microplate Freedom EVO 75* (TECAN France, Lyon) piloté par le logiciel associé *Freedom EVO 75*. A partir d'une culture sur boîte, une solution bactérienne calibrée à 0,5 McF puis diluée au $100^{\text{ème}}$ ($1,5 \cdot 10^6$ CFU/ mL) a été ajoutée (pour $\frac{1}{2}$ du volume final). Les plaques ont été incubées 18 h à 37°C.

Afin de mesurer l'impact des composés électrophiles sur la valeur des CMI des antibiotiques, ils ont été ajoutés dans les puits des microplaques à différentes concentrations : 0, 1, 2 ou 4 mg/mL pour le citral et le malondialdéhyde (**Figure 42**).

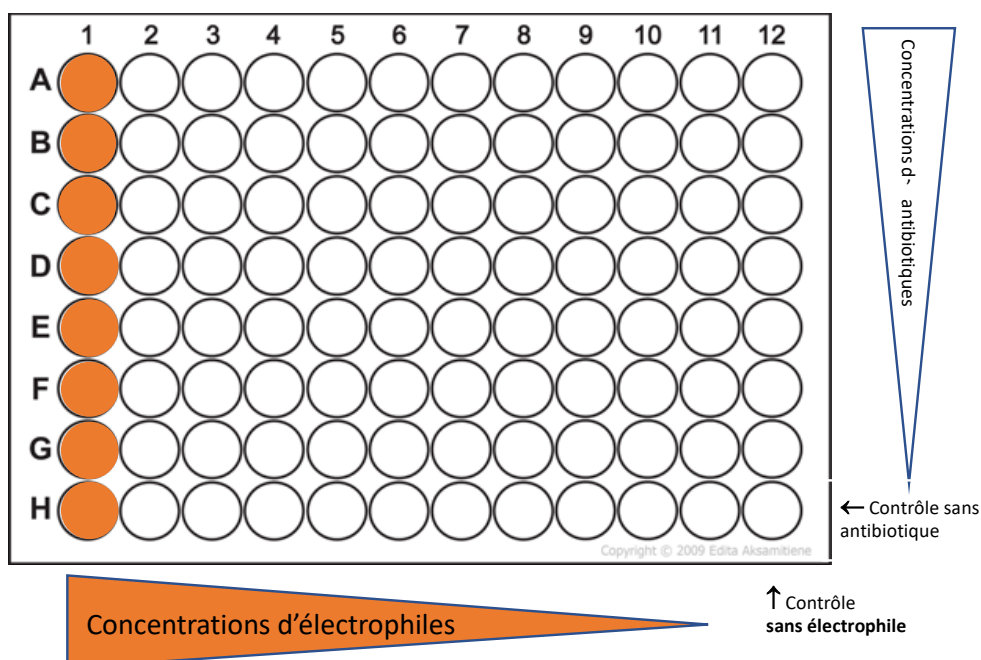


Figure 42 : Organisation des microplaques pour établir l'effet combiné des antibiotiques et des électrophiles.

6.2.9 CMI avec antibiotiques pré-incubés

Des CMI ont été réalisées avec des concentrations croissantes d'antibiotiques pré-incubés avec une concentration fixe de citral. Les antibiotiques (ticarcilline, tobramycine, gentamicine, colistine) et le citral ont été mis en contact dans les concentrations souhaitées dans du MH, puis placés à l'étuve pendant 3, 6 ou 24 heures (t_{3h} , t_{6h} , t_{24h}). Après cette pré-incubation, 100 μ l ont été déposés dans des puits d'une microplaque 96 puits auxquels ont été ajoutés 100 μ l de solution bactérienne calibrée à 0,65 McF puis diluée au 1/100^{ème}. En parallèle, un témoin sans pré-incubation préalable a été réalisé (t_{0h}), de même que des témoins utilisant les antibiotiques pré-incubés sans citral, ou du citral pré-incubé seul. Les CMI ont été lues après 18 h à 37°C.

6.2.10 Courbes de bactéricidies

La souche PA14 et les mutants dérivés (PA14 Δ mex) ont été rendus bioluminescents en transférant le plasmide pUC18T-MiniTn7-PI-lux selon la technique de conjugaison bactérienne (décrite en 7.2.11).

Une culture de la nuit des souches luminescentes a été calibrée ($A_{600nm} = 0.1$) dans 25 mL de milieu MH liquide puis incubée à 37°C sous agitation 250 rpm. La molécule bactéricide (CNA par exemple) a été ajoutée lorsque la densité optique atteignait $A_{600nm} = 0.8$. La lecture de la luminescence a été suivie au cours du temps dans des plaques 96 puits opaques (Corning, NY, USA) à l'aide du Synergy H1 microplate reader (Biotek Instruments, Winooski, USA) avec un gain de 150, une hauteur de lecture de 7 mm et un temps d'intégration de 1 s. Des expériences de calibration ont montré une relation linéaire entre la luminescence et le nombre de bactéries cultivables entre 4 et 9 \log_{10} UFC/mL selon l'équation :

$$\text{Log}_{10}(\text{UFC}) = 1.202 \times \text{log}_{10}(\text{RLU}) + 1,7843 \quad \text{et avec } R^2 = 0,9897$$

6.2.11 Tests d'induction avec des outils rapporteurs luminescents

6.2.11.1 Mesure en end point

La bioluminescence des souches rapportrices (PA14::*mexABM-lux* ou PA14::*armR/PA3720-lux*) a été suivie en *end-point* après 18 h de contact avec les molécules inductrices. Un disque buvard contenant 0,5, 1 ou 5 mg de composés extraits d'HEs a été déposé à la surface de MHA sur une culture bactérienne des souches rapportrices, calibrée à 0,5 McF et étalée en nappe. La luminescence a été détectée au *NightOWL WinLight 32 LB 981 Ultra Sens Backlit* (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Allemagne), après 18 h d'exposition.

6.2.11.2 Mesure en temps réel.

L'induction de l'expression des opérons *mexAB-oprM* et *armR-PA3720* a été mesurée en temps réel pendant la phase de croissance exponentielle. Les cultures de la nuit des souches luminescentes PA14::*mexABM-lux* et PA14::*armR/PA3720-lux* ont été diluées dans du MHB pour obtenir une A_{600} de 0,01. Les bactéries ont ensuite été incubées sous agitation (250 rpm) à 37°C pendant environ 4 h pour atteindre une A_{600} de 0,1, avant l'ajout des molécules

supposées inductrices, utilisées à des concentrations sub-inhibitrices. L'activité des deux fusions transcriptionnelles a été suivie dans des plaques blanches 96 puits (Thermo Scientific) à l'aide d'un lecteur de microplaques Synergy H1 (Biotek Instruments, Winooski, WI) avec un gain réglé à 150, une hauteur de lecture de 1 mm et un temps d'intégration de 5 s. En parallèle, les densités bactériennes ont été mesurées à 600 nm dans des plaques 96 puits à fond plat translucide (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne). L'activité du rapporteur, exprimée par le rapport entre la bioluminescence (Unités de Lumière Relative, RLU) et la densité bactérienne (A_{600}), a été mesurée sur une période de 6 heures. Les résultats ont été rapportés à la bioluminescence émise par le contrôle négatif traité au DMSO (0,5 à 2 %).

6.2.12 Tests de virulence

6.2.12.1 *Dosage spectrophotométrique de la capacité d'attachement à une surface*

La capacité d'attachement à une surface plastique est la première étape de la formation du biofilm. L'attachement initial a été évalué à partir de cultures bactériennes calibrées à 0,3 McFarland ($7,5 \cdot 10^7$ UFC/mL), puis diluées au $1/10^{\text{ème}}$, déposées en triplicat dans une plaque 96 puits à fond plat et incubées 20 h à 37°C. Des lavages à l'eau distillée ont permis de retirer les bactéries qui n'ont pas adhéré au support plastique. Le biofilm naissant a été coloré pendant 15 min à température ambiante avec 200 μ L de cristal violet 1 %. Après deux lavages à l'eau distillée, le cristal violet a été dissous par 300 μ L d'éthanol 99 % pendant 18 h à 4°C. L'absorbance des puits (traduisant la quantité de bactéries attachées à la surface plastique) a été mesurée à 600 nm par le Synergy H1 (Biotek).

6.2.12.2 *Détermination du swarming et swarming*

La capacité de se déplacer selon les modes « swarming » et « swimming » a été déterminée sur gélose. Les géloses ont été préparées à partir de milieu M8 (solution mère 5x : hydrogénophosphate de sodium 0,21 M, phosphate de monopotassium 0,11 M, chlorure de sodium 0,043 M) complété en glucose (0,2%) et casaminoacide (0,05%). La concentration d'agarose final étant calibrée à 0,5% pour le swarming et 0,2% pour le swimming. Le milieu a été porté à 60°C et les boîtes ont été coulées avant d'être refroidies précisément 20 min à température ambiante. Enfin, les bactéries ont été déposées à partir d'une colonie piquée dans la gélose à l'aide d'un cure-dent. Les boîtes ont été placées à 37°C dans une étuve contenant un bac d'eau afin de maintenir une atmosphère humide.

6.2.13 Obtention de mutant résistants au cinnamaldéhyde

Une culture liquide de 25 mL de la souche PA14 a été réalisée pendant 10 jours dans du milieu MHB additionné de CNA et incubée à 37°C sous agitation (250 rpm). Chaque jour, la culture bactérienne a été centrifugée à 6400 g pendant 15 min, le culot bactérien a été repris dans 25 mL de MHB frais additionné de CNA. En parallèle, chaque jour, un aliquot de 100 μ L a été étalé sur une boîte de MHB contenant 900 μ g/mL de CNA. Les mutants résistants au CNA collectés proviennent de deux cultures indépendantes (A) et (B) :

(A) Dans le premier cas, la quantité de CNA ajoutée dans le MHB frais était constante (900 μ g/mL).

(B) Dans ce deuxième cas, les concentrations de CNA ajoutées dans le MHB frais étaient croissantes, avec une augmentation de 50 µg/mL chaque jour (soit de 900 à 1400 µg/mL).

6.3 Techniques de biologie moléculaire

6.3.1 Extraction d'ADN bactérien

6.3.1.1 Extraction d'ADN plasmidique

Les plasmides ont été extraits et purifiés à l'aide du kit *Nucleo spin Plasmid* (Machery-Nalgel, Hoerd) en suivant les instructions du fabricant.

6.3.1.2 Extraction d'ADN génomique

L'extraction de l'ADN génomique bactérien a été effectuée à l'aide du kit *QIAmp® DNA Kit* (Qiagen, Courtabœuf, France) selon les recommandations du fournisseur. Dans cette technique, les bactéries sont lysées par des billes agitées au vortex, puis l'ADN est purifié par chromatographie échangeuse d'anions.

6.3.2 Polymerase chain reaction (PCR)

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un thermocycleur Veriti (Applied Biosystem, Foster City, USA) avec une première étape de dénaturation à 95°C pendant 3 min, suivie de 30 cycles composés chacun de 15 s de dénaturation à 95°C, 15 s d'hybridation à la température optimale des amorces (**Tableau 11**) et 1 min d'élongation à 72°C. Une étape finale d'élongation à 72°C a été effectuée pendant 5 min. La séquence des amorces (Eurogentec, Angers, France) a été établie en utilisant le logiciel *Primer3web* version 4.1.0.

6.3.3 Electrophorèse en gel d'agarose

Les fragments d'ADN ont été séparés selon leur taille par électrophorèse en gel d'agarose. Les gels ont été préparés dans du tampon TAE 1X (Tris-acétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) additionné de BET (0,5 µg/mL). Le temps de migration et le pourcentage d'agarose (0,8%, 1% ou 2%) ont été choisis en fonction de la taille des fragments. L'ADN a été visualisé sous lumière UV (302 nm) à l'aide du système ChemiDoc XRS, muni du logiciel QuantityOne® (BioRad, Marne-La-Coquette).

6.3.4 Purification des fragments d'ADN

Les fragments d'ADN ont été purifiés à partir du gel d'électrophorèse ou bien du produit de PCR à l'aide du kit *Gel and PCR clean up* (Qiagen) pour les étapes ultérieures de clonage.

6.3.5 Séquençage d'ADN

Le séquençage Sanger a été réalisé à l'aide d'amorces appropriées (**Tableau 11**) selon la méthode des didésoxyribonucléotides, par la plateforme « Séquençage - Analyse de Fragments » de l'UFR Santé de Besançon et celle du « pôle biologie » du CHRU de Besançon.

Le séquençage génomique à haut débit des mutants résistants au CNA a été réalisé à l'aide de la technologie *Illumina* en partenariat avec Mycosynth (Balgach, Suisse). Cette méthode est basée sur l'incorporation réversible de nucléotides fluorescents couplée à une lecture optique. Cette technique se décompose en 4 étapes : (1) la construction d'une banque d'ADN génomique de fragments d'environ 800-pb, (2) l'amplification de l'ADN en clusters, (3) le séquençage des amplicons par synthèse réversible et (4) l'analyse des données.

6.3.6 Clonage d'ADN

Les fragments ADN d'intérêt ont été amplifiés par PCR puis ligaturés dans le plasmide de clonage pCRBlunt commercialisé sous sa forme linéarisée (Invitrogen, St-Aubin, France). Le mélange réactionnel (pour un volume final de 10 µL) contenant l'insert (1,25 ng), le plasmide (25 ng pour un ratio insert:vecteur 20:1), 3 unités de T4 DNA ligase et du tampon 1X T4 (Promega, Charbonnières-les-Bains), a été incubé pendant 30 min à 25°C.

Par la suite, les plasmides recombinants pCRBlunt et le plasmide de sous-clonage pKNG101 ont été digérés pendant 2 h à 37°C avec les enzymes BamHI et XbaI (New England Biolabs, Evry, France) selon les recommandations du fournisseur. L'insert et le plasmide pKNG101 ont été ligaturés comme précédemment selon un ratio 5:1 (insert:vecteur).

6.3.7 Transformation bactérienne

Les cellules *E. coli Cloning Efficiency® DH5α Competent Cells* (Invitrogen) ou *E. coli CC118λpir*, rendues compétentes par un traitement au chlorure de rubidium (Hanahan 1983) ont été utilisées. Dans les deux cas, 100 µL de suspension bactérienne ont été mis en présence de 10 ng de produit de ligature, le tout placé dans la glace pendant 30 min. Après un choc thermique de 40 s à 42°C, les cellules ont été remises dans la glace pendant 2 min, puis cultivées 1 h à 37°C sous agitation (225 rpm) après dilution par 900 µL de MHB. Les cellules transformées par les plasmides recombinants pCRBlunt ou pKNG101 ont été sélectionnées sur des milieux MHA supplémentés respectivement par 50 µg/mL de kanamycine ou 50 µg/mL de streptomycine.

6.3.8 Conjugaison tri- et tétrapartite

Pour la conjugaison tripartite, 50 µL d'une culture de la nuit de (1) *E. coli CC118λpir*, la souche donneuse contenant le plasmide recombinant pKNG101, et de (2) *E. coli* HB101, contenant le plasmide *helper* pRK2013 qui permet d'assurer le transfert, ont été mélangés et déposés en spot de 50 µL à la surface d'une boîte de MHA. Après 2 h d'incubation à 37°C, ont été ajoutés

au dépôt initial 50 µL : (3) la souche receveuse *P. aeruginosa* PA14, préalablement cultivée pendant 2 h sans agitation à 42°C pour améliorer la fluidité membranaire. Après 4 à 8 h, le spot bactérien a été prélevé et mis en culture dans 1 mL de MHB à 37°C sous agitation (250 rpm) pendant 75 min. Les transconjugants ont été sélectionnés après 18 h de culture à 37°C sur PIA complémenté par 2000 µg/mL de streptomycine (pKNG101).

La conjugaison tétrapartite a été réalisée dans les mêmes conditions pour obtenir des bactéries luminescentes avec (1) la souche donneuse *E. coli* XL1Blue, contenant le plasmide pUC18T-MiniTn7-P1-*luxCDABE* porteur de l'opéron *luxCDABE* sous promoteur viral, (2) la souche mobilisatrice *E. coli* HB101(pRK2013) et (3) la souche *helper* de transposition *E. coli* DH5α contenant le plasmide pTNS3 codant pour une transposase. La souche receveuse PA14 ou ses mutants dérivés (4), cultivée pendant 2 h sans agitation à 42°C a été ajoutée par la suite sur le spot bactérien.

6.3.9 Délétion génique par recombinaison homologue

Pour inactiver un gène, deux fragments d'environ de 500 pb, situés en amont et en aval de la zone à supprimer, ont été amplifiés séparément par PCR. Le mélange réactionnel (50 µL) contenait 100 ng d'ADN génomique de la souche PA14, 25 µL de *Master Mix* contenant la Taq *iProof* (Bio-Rad), 3% de DMSO, et 1 µM de chaque amorce (**Tableau 11**). Une deuxième PCR dite « chevauchante » a ensuite été réalisée dans les mêmes conditions à partir de 0,5 µL de chacun des produits PCR obtenus précédemment et en utilisant les amorces -1 et -4 encadrant le gène. Les nouveaux fragments ont été clonés dans le plasmide PCRBlunt, puis sous-clonés dans le plasmide pKNG101 (cf. 2.6). Après transformation dans PA14 (cf. 2.7), les clones isolés sur PIA-streptomycine 2000 µg/mL ont été repiqués sur milieu M9 additionné de 5% de saccharose afin de provoquer l'excision du plasmide pKNG101. En effet, le vecteur pKNG101 possède le gène *sacB* codant une lévane sucrase qui hydrolyse le saccharose en un composé toxique. Les clones devenus sensibles à la streptomycine ont été sélectionnés par double criblage sur MHA avec et sans streptomycine 2000 µg/mL. La délétion des gènes d'intérêts a été confirmée par PCR puis par séquençage.

6.3.10 Quantification de l'expression génique par RT-qPCR

6.3.10.1 Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADNc

Une culture de la nuit de la souche PA14 ou de ses mutants dérivés a été diluée ($A_{600nm} = 0,02$) dans 20 mL de MHB frais et placée à 37°C sous agitation (250 rpm) jusqu'à une absorbance de $A_{600nm} = 0.2$. Les molécules inductrices (CNA, CN-OH, MDA ou citral) y ont été ajoutées à des concentrations sub-inhibitrices. Un contrôle « non traité » a été réalisé en parallèle avec le solvant seul : DMSO 1% (pour CNA et CN-OH), ETOH 2% (final) (citral). Après différents temps d'exposition (0 min, 15 min, 30 min et 60 min), 500 µL de culture ont été collectés et traités par 1 mL de RNA protect (Qiagen). Les culots ont été centrifugés (5 min à 10 000 g), séchés et conservés à -20°C. Les ARN totaux ont, par la suite, été extraits à l'aide du RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen) en suivant les recommandations du fabricant. De l'ADNase

(Qiagen) a été ajoutée aux ARN extraits pendant 45 min afin d'éliminer toute trace de contamination par de l'ADN génomique. Puis, les ARN ont été dosés dans un NanoDrop One (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette) et stockés à -80°C. Des ADNc ont été synthétisés à partir de ces échantillons en utilisant 2 µg d'ARN, 160 U de reverse transcriptase ImProm-II, 0,1 mM de dNTP, 40 U d'inhibiteur de RNAase Rnasin et 3,45 mM d'hexanucléotides aléatoires comme amorces, selon les recommandations du fournisseur (Promega). Après 1 h à 42°C, la rétrotranscription a été stoppée à 70°C pendant 15 min. Un témoin sans reverse transcriptase (NRT Non Reverse Transcriptase) a permis de vérifier l'absence de contamination par de l'ADN génomique. Les ADNc ont été conservés à -20°C.

6.3.10.2 Amplification des ADNc

Le niveau d'expression des gènes d'intérêt a été quantifié à l'aide de l'appareil Rotor-Gene RG6000 (Qiagen) grâce à des amorces spécifiques (**Tableau 11**). Chaque série a comporté un témoin NRT et une gamme de dilution (1/10^{ème}, 1/100^{ème} et 1/1000^{ème}) préparée à partir des ADNc de la souche de référence PA14. Le mélange réactionnel (15 µL) comprenait : 3 µL d'ADNc dilué au 1/10^{ème}, 7,5 µL de *QuantiFast SYBR green PCR* (Qiagen) et 1,5 mM de chaque amorce (Dumas *et al.*, 2006). L'amplification commençait par une dénaturation à 95°C pendant 5 min, suivie de 40 cycles constitués chacun de 5 s de dénaturation à 95°C, 10 s d'hybridation à 60°C et 20 s d'élongation à 72°C. La mesure de la fluorescence a été effectuée au cours de la phase d'hybridation.

6.3.10.3 Quantification relative des transcrits

Le niveau d'expression de chaque gène cible est dérivé de son CT (*cycle threshold*) ; cette valeur correspond au nombre de cycles d'amplification nécessaires pour que la courbe d'amplification croise la ligne de seuil placée au niveau de la phase exponentielle. La quantification a été normalisée en établissant un ratio entre l'expression du gène cible et celui d'un gène de ménage (*rpsL*) codant une protéine ribosomale dont l'expression est supposée constante dans les conditions expérimentales. Afin de tenir compte de l'efficacité d'amplification des gènes cible et de référence, la formule suivante a été utilisée (Pfaffl 2001) :

$$Ratio = \frac{(E_{cible})^{\Delta CT_{cible}(t_0-t_n)}}{(E_{rpsL})^{\Delta CT_{rpsL}(t_0-t_n)}} \quad \text{avec} \quad Efficacité(E) = 10^{-1/pente}$$

Les niveaux d'expression mesurés en duplicat sur deux manipulations indépendantes après différent temps de contact (t_{15min} , t_{30min} , t_{45min} , t_{60min}) avec les molécules inductrices ont été comparés à ceux du temps t_0 de l'induction. La surexpression des opérons d'efflux est significative si elle est supérieure de 3- (pour *mexAB-oprM*), 5- (*mexXY*) et 20-fois (*mexEF-oprN* et *mexCD-oprJ*) celle de bactéries sauvages non traitées (Llanes *et al.*, 2013).

6.4 Techniques analytiques physico-chimiques

6.4.1 Extractions des métabolites et détection par CCM

Les solutions standards contrôles (cinnamaldéhyde, alcool cinnamique, citral) ont été préalablement diluées dans du méthanol (sigma-Aldrich). Une culture bactérienne de la nuit a été calibrée à $A_{600nm} = 0.1$ dans un volume de 25 mL puis incubé sous agitation à 250 rpm 37°C. Une fois l'absorbance à $A_{600nm} = 0.8$ le cinnamaldéhyde a été ajouté pour une concentration finale de 512 µg/mL. Les bactéries ont été retirées par centrifugation et le surnageant a été filtré sur des filtres de 0.45 puis 0.2 µm. La fraction organique a été extraite avec 0.5 mL de dichlorométhane puis répété 5 fois (pour un volume final de 2.5 mL). Le produit d'extraction a été séché toute une nuit sous hotte chimique puis repris dans 50 µL de méthanol. Les fractions organiques et les contrôles ont été dilués (1:1000) dans du méthanol et filtrés sur des filtres PHENEX PTFE syringe de 0.2 µm (Phenomenex, Le Pecq, France).

La même expérimentation a été réalisée avec le citral à 2 ou 4mg/mL. Après séchage, la fraction a été reprise dans 50 µL de méthanol et diluée au 1:200^{ème} ; la solution standard a quant à elle été diluée au 1:2000^{ème}.

Pour déposer les échantillons sur la plaque, une fraction de 10 µl a été pulvérisée en bande de 8 mm sur des plaques de CCM (Alugram® Xtra SIL G UV254, Macherey-Nagel) en utilisant un pulvérisateur automatique (ATS4, Camag, Moirans, France) connecté au logiciel visionCATS Camag TLC V2.4. La migration dans de la phase mobile a été réalisé dans une chambre automatique (ADC 2, Camag) avec une phase mobile composée d'un mélange cyclohexane:acétate d'éthyle (7:2) sur une distance de 7 cm. Les dépôts ont été observés à l'aide d'une lampe UV à 254 nm (CV-415.LS, Uvitech, England).

Ces expérimentations ont été réalisées dans le laboratoire PEPITE (EA4267, UFR Santé, Besançon) avec l'aide de Andy Zedet et Corine Girard.

6.4.2 Mesure du potentiel Zeta des membranes bactériennes

Le potentiel de surface des bactéries, leur taille (rapportée à un volume sphérique), ainsi que l'indice de poly-dispersion ont pu être déterminés à l'aide du Zeta-mètre (Wilson *et al.*, 2001) sur des bactéries pré-incubées ou non avec du citral.

Sans pré-incubation avec le citral, les bactéries ont été cultivées en milieu MHB 18 h à 37°C sous agitation (250 rpm) puis centrifugées à 4500 g pendant 5 min. Le culot a été repris dans de l'eau distillée de façon à obtenir une concentration bactérienne de 4 McF. Le citral a été ajouté à une concentration finale de 4 mg/mL.

Pour pré-incuber les bactéries avec le citral, une culture bactérienne ($A_{600nm} = 0,1$) a été réalisée à partir d'une culture de la nuit dans 10 mL de MHB en présence de citral 4 mg/mL jusqu'à obtenir une absorbance de minimum 4 McF. Les bactéries ont ensuite été récupérées par centrifugation 4500 g pendant 5 min et suspendues dans de l'eau distillée à 4 McF ; le

citral (4 mg/mL) a été ajouté ou non. La taille et le potentiel zêta des bactéries ont ensuite été déterminés à l'aide du *Zetazsizer Nano90ZS* (Malvern, Malvern, UK). La taille des particules a été déterminée selon le diamètre z-moyen et l'indice de polydispersité (PDI) à un angle fixe de 90° à 25°C. Les mesures ont été réalisées en triplicat à la même température (25°C).

Ces expérimentations ont été réalisées dans le laboratoire PEPITE (EA4267, UFR Santé, Besançon) avec l'aide de Yann Pellequer.

6.4.3 Détection d'adduits par spectrométrie de masse

Les expériences de spectrométrie de masse à haute résolution par électro-ébulisaison (ESI-HRMS) ont été réalisées sur un instrument quadripolaire à temps de vol Agilent Accurate Mass QToF 6520 (Agilent Technologies, Les Ulis, France), couplé à un système de chromatographie liquide (système HPLC Agilent 1200). Les échantillons ont été préparés dans du méthanol et 0,8 µL a été injecté. Une colonne Zorbax SB Agilent C18 (50 mm x 2,1 mm i.d.) avec une taille de particule de 1,8 µm maintenue à 40°C a été utilisée. L'élution a été effectuée à l'aide d'un gradient de phase mobile de 0,5 mL/min composé de 0,05 % d'acide formique dans l'eau (A) et de 0,05 % d'acide formique dans l'acétonitrile (B), programmé comme suit (A:B) : 98:2 (t = 0 min), 0:100 (t = 8 min), 0:100 (t = 12,5 min), 98:2 (t = 12,6 min), 98:2 (t = 13 min). L'acquisition des spectres de masse a été réalisée en mode d'ionisation positive ESI (Electro-Spray Ionization) en utilisant une tension capillaire de 4000 V et les conditions suivantes : pression du gaz d'azote du nébuliseur, 30 psig ; débit du gaz de séchage, 8 L/min ; et température de séchage, 340°C. La gamme de balayage était m/z 100-2000 à 1 s/scan. L'acquisition des données a été effectuée à l'aide du logiciel MassHunter Qualitative Analysis (B.07.00, Agilent).

Ces expérimentations ont été réalisées dans le laboratoire Métaux et Microorganismes (UMR CNRS 7242, Strasbourg) par Gaétan Mislin avec le concours de Estefania Oliva de la Plateforme d'Analyse Chimique de Strasbourg-IIIkirch (PACSI, Faculté de Pharmacie de Strasbourg).

6.4.4 Détection d'adduits par spectrométrie Raman

Le spectromètre Raman a été utilisé comme décrit précédemment (Foley *et al.*, 2007). Il est équipé d'un laser de type Spectra Physics Nd/YAG (modèle LAB-170-10) délivrant des pulsations d'une durée de 5 ns à une fréquence de 10 Hz. L'équivalent, en termes d'énergie délivrée à l'échantillon, était de 30 mW.mm⁻² pour un faisceau d'un diamètre de 1 cm. Les spectres ont été enregistrés à l'aide de la longueur d'onde harmonique secondaire (532 nm) d'émission du laser. La lumière réfractée a été détectée à 90° d'angle à l'aide du système de spectroscopie Princeton Instrument, qui inclut (1) un monochromateur Acton Spectro Pro 2500i d'une résolution maximale de 0,035 nm et (2) une camera PIMAX-1024-RN CCD.

D'après la FWHM (*Full Width at Half Maximum*) du spectre Raman du N₂ dans l'air, la résolution spectrale du système est de 7 cm⁻¹. L'intensité du laser a été constamment contrôlée en mesurant l'intensité de la bande Raman du N₂ obtenue à partir du faisceau laser diffusé dans l'air. Tous les spectres ont ensuite été normalisés par rapport aux changements d'intensité du laser en les divisant par l'intensité de la bande Raman N₂ dans l'air, permettant

de rapporter les intensités des différents spectres Raman dans la même unité arbitraire et de les comparer.

L'étude de l'interaction entre le citral et les antibiotiques (tobramycine, colistine ou ticarcilline) a été initiée par le mélange rapide des deux solutions. La concentration de citral était de 40 mg/mL tandis que la concentration d'antibiotique était de 40 ou 20 $\mu\text{g/mL}$. La réaction a été surveillée pendant 6 heures en prenant les spectres Raman toutes les heures. La solution de citral-antibiotique a été maintenue à 37°C pendant toute la durée des mesures. La moyenne de chaque spectre a été calculée sur 1000 tirs laser et pour chaque section temporelle, une moyenne de trois expériences a été réalisée.

Tableau 14 : Liste des composés chimiques utilisés.

Nom	Concentration	Référence	Fournisseur
Composés d'huiles essentielles			
Alcool cinnamique	98% liquide	108197	
Carvacrol	99% liquide	W224511	
Cinnamaldéhyde	99% liquide	C80687	
Citral	95% liquide	C83007	
Citronellal	≥98% liquide	27470	Sigma-Aldrich
Citronellol	≥98% liquide	8.18378.0025	
Créosol	≥98% liquide	W267104	
Eugénol	≥98% liquide	W246700	
Geraniol	98% liquide	163333	
Vanilline	99% poudre	V1104	
Produits chimiques			
Acide cinnamique	≥99% poudre	C808557	
Acide hydrocinnamic	99% poudre	135232	
Dichlorométhane	≥99.9% liquide	650463	Sigma-Aldrich
Diméthyle sulfoxyde	>99% liquide	W387520	
Ethanol	≥99.8% liquide	51976	
Glutaraldehyde	25% dans H ₂ O liquide	66257	
Glyoxal	40% liquide		Santa Cruz biotechnologie
Malondialdéhyde	85% poudre		Synthèse laboratoire
Méthanol	>98% liquide	W246700	
Méthylglyoxal	40% liquide	M0252	Sigma-Aldrich
Tobracitryl	>90% poudre		Synthèse laboratoire
Antibiotiques			
Amikacine	Poudre		
Ampicilline	Poudre	A9518	Sigma-Aldrich
Aztreonam	Poudre		
Cefepime	Poudre		
Ceftazidime	Poudre		
Chloramphénicol	Poudre ≥ 99%		
Ciprofloxacine	Liquide 2mg/mL		Fresemius Kabi
Colistine	Poudre	17420	SERVA
Gentamicine	Liquide 10mg/mL		Panpharma
Imipeneme	Poudre	N.D	Mylan
Kanamycine	Poudre	K1377	
Meropeneme	Poudre		
Rifampicine	Poudre		
Streptomycine	Poudre	S6501	Sigma-Aldrich
Tetracycline	>95%	T3383	
Ticarcilline	Poudre	T5639	
Tobramycine	Liquide 10 mg/mL		Fresemius Kabi
Triméthoprime	98% poudre	738705	Arcos organics

Tableau 15 : Liste des souches bactériennes et des plasmides utilisés.

Souches	Description	Références
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PA14	Souche sauvage de référence, sensible et prototrophe	(Liberati <i>et al.</i> , 2006)
PA14ΔAB	Souche PA14 privée des gènes <i>mexAB</i>	(Tetard <i>et al.</i> , 2019)
PA14ΔEFN	Souche PA14 privée des gènes <i>mexEF-oprN</i>	(Juarez <i>et al.</i> , 2017)
PA14ΔXY	Souche PA14 privée des gènes <i>mexXY</i>	
PA14ΔABΔEFN	Souche PA14 privée de <i>mexAB</i> et de <i>mexEF-oprN</i>	
PA14ΔEFNΔXY	Souche PA14 privée de <i>mexEF-oprN</i> et <i>mexXY</i>	
PA14ΔABΔEFNΔXY	Souche PA14 privée de <i>mexAB</i> , <i>mexEF-oprN</i> et <i>mexXY</i>	
PA14ΔarmR	Souche PA14 privée du gène <i>armR</i>	
PA14- <i>lux</i>	Souche PA14 contenant le mini-Tn7-P1- <i>lux</i>	
PA14ΔAB- <i>lux</i>	Souche PA14ΔAB contenant le mini-Tn7-P1- <i>lux</i>	(Tetard <i>et al.</i> , 2019)
PA14ΔEFN- <i>lux</i>	Souche PA14ΔEFN contenant le mini-Tn7-P1- <i>lux</i>	
PA14ΔXY- <i>lux</i>	Souche PA14ΔXY contenant le mini-Tn7-P1- <i>lux</i>	
PA14ΔABΔEFN- <i>lux</i>	Souche PA14ΔABΔEFN contenant le mini-Tn7-P1- <i>lux</i>	
PA14ΔEFNΔXY- <i>lux</i>	Souche PA14ΔEFNΔXY contenant le mini-Tn7-P1- <i>lux</i>	
PA14ΔABΔEFNΔXY- <i>lux</i>	Souche PA14ΔABΔEFNΔXY contenant le mini-Tn7-P1- <i>lux</i>	
PA14mexAB+	Mutant dérivé de PA14, surproduisant MexAB-OprM	
PA14mexEF+	Mutant dérivé de PA14, surproduisant MexEF-OprN	(Richardot <i>et al.</i> , 2016)
PA14mexXY+	Mutant dérivé de PA14, surproduisant MexXY/OprM	(Tetard <i>et al.</i> , 2019)
PA14mexCD+	Mutant dérivé de PA14, surproduisant MexCD-OprJ	
PAO1	Souche clinique isolée d'une plaie (Melbourne)	Holloway
LESB58	Souche clinique isolée d'un patient CF (Liverpool)	Winstanley
1393	Souche environnementale isolée d'eau de surface (France)	
1349	Souche environnementale isolée d'eau de surface (France)	(Tetard <i>et al.</i> , 2019)
1429	Souche environnementale isolée d'eau de surface (France)	
PA14ΔpmrAB	Souche PA14 luminescente privée de <i>pmrAB</i>	K. Jeannot
PA14ΔparRS	Souche PA14 luminescente privée de <i>parRS</i>	K. Jeannot
PA14ΔphoPQ	Souche PA14 luminescente privée de <i>phoPQ</i>	K. Jeannot
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ ⁻	Invitrogen
CC118λpir	Δ(ara-leu) araD ΔlacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE (Am) recA1 lysogénisée par le phage λpir	(Herrero <i>et al.</i> , 1990)
HB101	subE44 subF58 hsdS3(r _B ⁻ m _B ⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1	(Lacks <i>et al.</i> , 1977)
DH5α(pTNS3)	Souche DH5α contenant le plasmide <i>helper</i> pTNS3 pour l'intégration chromosomique du Tn7, Amp ^R	(Choi <i>et al.</i> , 2008)
HB101(pRK2013)	Souche HB101 contenant le plasmide <i>helper</i> pRK2013 (<i>mob1</i> , <i>tra1</i> , <i>colE1</i> , Kan ^R)	
CC118λpir(pKNG101)	Souche CC118λpir contenant le vecteur suicide <i>oriR6K</i> , <i>sacB</i> , Sm ^R	(Kaniga <i>et al.</i> , 1991)
DH5α(Mini-CTX- <i>lux</i>)	Souche DH5α contenant le vecteur d'intégration Mini-CTX- <i>lux</i> , Ω-FRT-attP-MCS, <i>ori</i> , <i>int</i> , <i>oriT</i> , <i>luxCDABE</i> , Tet ^R	(Becher <i>et al.</i> , 2000)
XL1-Blue(pUC18T-MiniTn7-P1- <i>lux</i>)	Souche XL1-Blue contenant le plasmide pUC18T-MiniTn7- <i>luxCDABE</i> contenant le promoteur viral P1	(Damron <i>et al.</i> , 2013)
ATCC 25922	<i>E. coli</i> reference strain	(Minogue <i>et al.</i> , 2014)
Autres bactéries		
CIP 70.10	Souches de référence d' <i>Acinetobacter baumannii</i>	(Marchand <i>et al.</i> , 2004)
SA1	Souches clinique de <i>Staphylococcus aureus</i>	(Tetard <i>et al.</i> , 2021)
KT2440	Souche de référence de <i>Pseudomonas putida</i>	(Nelson <i>et al.</i> , 2002)

Tableau 16 : Liste des amorces utilisées.

Primer	Sequence (5' → 3')	Tm (°C)	Source	
Inactivation de gènes*				
<i>mexXY</i>				
iPA14 <i>mexXY</i> -1	CCAGCAAGAGGTAGGGAGAA	62		
iPA14 <i>mexXY</i> -2	GGCGCGACAGTAGCATATAA	59	(Tetard <i>et al.</i> , 2019)	
iPA14 <i>mexXY</i> -3	TGTCGCGCCGGCTATCCCTCGTTCAACCT	62		
iPA14 <i>mexXY</i> -4	AACAGCGGTACCAGGAACAC	62		
<i>mexAB</i>				
iPA14 <i>mexAB</i> -1	GGCGTTTTTCATTGTGCTTC	59	Smaltis	
iPA14 <i>mexAB</i> -2	ACCGATCGTTGCATAGCGTTGTCCTCA	72		
iPA14 <i>mexAB</i> -3	ATGCAACGATCGGTACCGCGTGAT	73		
iPA14 <i>mexAB</i> -4	GTAGCTGCGCTGGGTACG	59		
<i>mexXY</i>				
iPA14 <i>mexXY</i> -1	CCAGCAAGAGGTAGGGAGAA	62	(Tetard <i>et al.</i> , 2019)	
iPA14 <i>mexXY</i> -2	AGGGATAGCCGGCGCGACAGTAGCATATAA	59		
iPA14 <i>mexXY</i> -3	TGTCGCGCCGGCTATCCCTCGTTCAACCT	62		
iPA14 <i>mexXY</i> -4	AACAGCGGTACCAGGAACAC	62		
<i>fliE</i>				
<i>ifliE_1</i>	CGGAATTCCAGGTGATCAT	60	Ce travail	
<i>ifliE_2</i>	GCGCCGCGGAGAGCATTCCGAAAAGC	60		
<i>ifliE_3</i>	GCTCTCCGCGGCGGAGGATAACTA	60		
<i>ifliE_4</i>	GTTGTTCCAGGCTCGACACG	60		
<i>armR</i>				
iPA14 <i>armR</i> -1	CTGTTTTGGCAAGCACTTCC	60	(Tetard <i>et al.</i> , 2019)	
iPA14 <i>armR</i> -2	TCTGATAGCGTCAACGTTCCATCCCCGTC	59		
iPA14 <i>armR</i> -3	ACTGGTGACGCTATCAGATCCGCGCAGA	60		
iPA14 <i>armR</i> -4	GATTCCGCCTGCCATGAAG	60		
RT-qPCR				
<i>mexR-F</i>				
<i>mexR-F</i>	GAACTACCCCGTGAATCCCCG	60		
<i>mexR-R</i>				
<i>mexR-R</i>	CGGACCAGGTTTCTTCCCTC	60		
<i>cpxR-F</i>				
<i>cpxR-F</i>	TTGAGCAGTTCAGGCCG	60		
<i>cpxR-R</i>				
<i>cpxR-R</i>	GCTGTTGATCGACGATGACC	60		
<i>ampR-F</i>				
<i>ampR-F</i>	CTGTGTGACTCCTTCGACCG	60		
<i>ampR-R</i>				
<i>ampR-R</i>	GGTTGTTGTGGGTGGACAGG	60		
<i>nalD-F</i>				
<i>nalD-F</i>	AGATGCTCAACCAGGTACGC	60	(Tetard <i>et al.</i> , 2019)	
<i>nalD-R</i>				
<i>nalD-R</i>	GTTCCGCGTGAATTCGCAAC	60		
<i>nalC-F</i>				
<i>nalC-F</i>	CTTCCCTCACCAGCCTGCTC	60		
<i>nalC-R</i>				
<i>nalC-R</i>	ATCTCGAGAACTGGCAGGC	60		
<i>PA3720-F</i>				
<i>PA3720-F</i>	GATGCCTTTCCCTGGTCC	60		
<i>PA3720-R</i>				
<i>PA3720-R</i>	GCTGGCGATTTTCTTGAGC	60		
<i>armR-F</i>				
<i>armR-F</i>	CAACAAACCGTCCCGCACCGA	60		
<i>armR-R</i>				
<i>armR-R</i>	TCAGTAGAAGTGCTCGCCGTAGAGG	60		
<i>mexB1</i>				
<i>mexB1</i>	ATCCGCCAGACCATCGCCA	60	(Hocquet <i>et al.</i> , 2006)	
<i>mexB2</i>				
<i>mexB2</i>	CATCACCAGGAACACGAGGAGG	60		
<i>mexY1A</i>				
<i>mexY1A</i>	TTACCTCCTCCAGCGGC	60	(Jeannot <i>et al.</i> , 2005)	
<i>mexY1B</i>				
<i>mexY1B</i>	GTGAGGCGCGGTTGTG	60		
<i>mexC1</i>				
<i>mexC1</i>	TGCGGATTTCAACCAGACC	60	(Dumas <i>et al.</i> , 2006)	
<i>mexC2</i>				
<i>mexC2</i>	GGCCAAGGTGCCTTTCTTCA	60		
<i>mexE4</i>				
<i>mexE4</i>	CCAGGACCAGCACGAACT	60		
<i>mexE5</i>				
<i>mexE5</i>	CGACAACGCCAAGGGCGAGTTCACC	60		
<i>oprD1</i>				
<i>oprD1</i>	ACCAACCTCGAAGCCAAGTA	60	(Fournier <i>et al.</i> , 2013)	
<i>oprD2</i>				
<i>oprD2</i>	ACAGGATCGACAGCGGATAG	60		
<i>rpsL3</i>				
<i>rpsL3</i>	GCAACTATCAACCAGCTGGTG	60	(Dumas <i>et al.</i> , 2006)	
<i>rpsL5</i>				
<i>rpsL5</i>	GCTGTGCTCTTGACAGTTGTG	60		

Séquençage de gènes			
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC	60	Eurogentech
M13-F	CTGGCCGTCGTTTTA	60	
<i>mexZ1</i> -PA14	CAAGGTAGGCGGAGAAAACG	62	(Tetard <i>et al.</i> , 2019)
<i>mexZ2</i> -PA14	CATTGGATGTGCATGGGTGT	60	
<i>nfxB1</i> -PA14	CAAATCAGCCATGACACACC	60	
<i>nfxB2</i> -PA14	CATCAACAGGACCAGCAACA	60	
MexSch1	GAACAGGATCAGCAGGTTCA	55	(Richardot <i>et al.</i> , 2016)
MexSch2	CCACCGGGTGAGTACCT	58	
MexSch3	GTCTCGGCTTCGAACTGG	56	
MexSch4	GGTGAAATCCATCAGGCAGT	55	
MexSch5	GCAAGCTGGTGCTGTATGG	57	
MexSch6	GAAGGCGACTTCGTCTGG	56	

*Les séquences complémentaires nécessaires à la PCR chevauchante pour l'inactivation génique sont indiquées en couleur.

7. Bibliographie

- Aendekerk S., Diggle S.P., Song Z., Høiby N., Cornelis P., Williams P., Cámara M. 2005. The MexGHI-OpmD controls growth, antibiotic susceptibility and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* via 4-quinolone-dependent cell-to-cell communication. *Microbiology* 151: 1113–1125.
- Aires J.R., Köhler T., Nikaido H., Plésiat P. 1999. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 2624–2628.
- Aka S.T., Haji S.H. 2015. Sub-MIC of antibiotics induced biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of chlorhexidine. *Brazilian Journal of Microbiology* 46: 149–154.
- Alcalde-Rico M., Olivares-Pacheco J., Halliday N., Cámara M., Martínez J.L. 2020. The impaired quorum sensing response of *Pseudomonas aeruginosa* MexAB-OprM efflux pump overexpressing mutants is not due to non-physiological efflux of 3-oxo-C12-HSL. *Environmental Microbiology* 22: 5167–5188.
- Amini N., Rezaei K., Yazdani A. 2016. Effect of nebulized eucalyptus on contamination of microbial plaque of endotracheal tube in ventilated patients. *Iranian Journal of Nursing and Midwifery Research* 21: 165–170.
- Andrade J.C., Morais Braga M.F.B., Guedes G.M.M., Tintino S.R., Freitas M.A., Quintans L.J., Menezes I.R.A., Coutinho H.D.M. 2017. Menadione (vitamin K) enhances the antibiotic activity of drugs by cell membrane permeabilization mechanism. *Saudi Journal of Biological Sciences* 24: 59–64.
- Antus B., Drozdovszky O., Barta I., Kelemen K. 2015. Comparison of airway and systemic malondialdehyde levels for assessment of oxidative stress in cystic fibrosis. *Lung* 193: 597–604.
- Apolónio J., Faleiro M.L., Miguel M.G., Neto L. 2014. No induction of antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during continuous exposure to eugenol and citral. *FEMS Microbiology Letters* 354: 92–101.
- Auffray B. 2007. Protection against singlet oxygen, the main actor of sebum squalene peroxidation during sun exposure, using *Commiphora myrrha* essential oil. *International Journal of Cosmetic Science* 29: 23–29.
- Bagge N., Schuster M., Hentzer M., Ciofu O., Givskov M., Greenberg E.P., Høiby N. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and β -lactamase and alginate production. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 1175–1187.
- Bajpai V.K., Sharma A., Baek K.-H. 2013. Antibacterial mode of action of *Cudrania tricuspidata* fruit essential oil, affecting membrane permeability and surface characteristics of food-borne pathogens. *Food Control* 32: 582–590.
- Balasubramanian D., Schnepfer L., Merighi M., Smith R., Narasimhan G., Lory S., Mathee K. 2012. The regulatory repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -lactamase regulator AmpR includes virulence genes. *PLoS One* 7: e34067.
- Barber M., Waterworth P.M. 1966. Activity of gentamicin against *Pseudomonas* and hospital *Staphylococci*. *British Medical Journal* 1: 203–205.
- Bartoli M.L., Novelli F., Costa F., Malagrino L., Melosini L., Bacci E., Cianchetti S., Dente F.L., Di Franco A., Vagaggini B., Paggiaro P.L. 2011. Malondialdehyde in exhaled breath

- condensate as a marker of oxidative stress in different pulmonary diseases. *Mediators of Inflammation* 2011: 891752.
- Baucheron S., Mouline C., Praud K., Chaslus-Dancla E., Cloeckaert A. 2005. TolC but not AcrB is essential for multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium colonization of chicks. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55: 707–712.
- Beaudoin T., Zhang L., Hinz A.J., Parr C.J., Mah T.-F. 2012. The biofilm-specific antibiotic resistance gene *ndvB* is important for expression of ethanol oxidation genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology* 194: 3128–3136.
- Becher A., Schweizer H.P. 2000. Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal *lacZ* and *lux* gene fusions. *BioTechniques* 29: 948–950, 952.
- Belofsky G., Percivill D., Lewis K., Tegos G.P., Ekart J. 2004. Phenolic metabolites of *Dalea versicolor* that enhance antibiotic activity against model pathogenic bacteria. *Journal of Natural Products* 67: 481–484.
- Berdejo D., Chueca B., Pagán E., Renzoni A., Kelley W.L., Pagán R., Garcia-Gonzalo D. 2019. Sub-Inhibitory doses of individual constituents of essential oils can select for *Staphylococcus aureus* resistant mutants. *Molecules* 24.
- Blair J.M.A., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Piddock L.J.V. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology* 13: 42–51.
- Blanchet M., Borselli D., Rodalleg A., Peiretti F., Vidal N., Bolla J.-M., Digiorgio C., Morrison K.R., Wuest W.M., Brunel J.M. 2018. Claramines: A new class of broad-spectrum antimicrobial agents with bimodal activity. *ChemMedChem* 13: 1018–1027.
- Boesl R., Saarinen H. 2016. Essential oil education for health care providers. *Integrative Medicine* 15: 38–40.
- Bolard A., Schniederjans M., Haüssler S., Triponney P., Valot B., Plésiat P., Jeannot K. 2019. Production of norspermidine contributes to aminoglycoside resistance in *pmrAB* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63: e01044-19.
- Borselli D., Brunel J.M., Gorgé O., Bolla J.M. 2019. Polyamino-isoprenyl derivatives as antibiotic adjuvants and motility inhibitors for *Bordetella bronchiseptica* porcine pulmonary infection treatment. *Frontiers in Microbiology* 10.
- Boschi F., Fontanella M., Calderan L., Sbarbati A. 2011. Luminescence and fluorescence of essential oils. Fluorescence imaging *in vivo* of wild chamomile oil. *European Journal of Histochemistry* 55: e18.
- Bouhdid S., Abrini J., Amensour M., Zhiri A., Espuny M.J., Manresa A. 2010. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *Journal of Applied Microbiology* 109: 1139–1149.
- Božik M., Cejnar P., Šašková M., Nový P., Maršík P., Klouček P. 2018. Stress response of *Escherichia coli* to essential oil components – insights on low-molecular-weight proteins from MALDI-TOF. *Scientific Reports* 8.
- Brackman G., Defoirdt T., Miyamoto C., Bossier P., Van Calenbergh S., Nelis H., Coenye T. 2008. Cinnamaldehyde and cinnamaldehyde derivatives reduce virulence in *Vibrio spp.* by decreasing the DNA-binding activity of the quorum sensing response regulator LuxR. *BMC microbiology* 8: 149.

- Bradley B.F., Starkey N.J., Brown S.L., Lea R.W. 2007. Anxiolytic effects of *Lavandula angustifolia* odour on the *Mongolian gerbil* elevated plus maze. *Journal of Ethnopharmacology* 111: 517–525.
- Brownlee M.D. Michael. 1995. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annual Review of Medicine* 46: 223–234.
- Burt S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: A review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223–253.
- Bush K. 1988. Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clinical Microbiology Reviews* 1: 109–123.
- Butnariu M., Sarac I. 2018. Essential oils from plants. *Journal of Biotechnology and Biomedical Science* 1: 35.
- Caille O., Rossier C., Perron K. 2007. A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 189: 4561–4568.
- Cannac M., Pasqualini V., Greff S., Fernandez C., Ferrat L. 2007. Characterization of phenolic compounds in *Pinus laricio* needles and their responses to prescribed burnings. *Molecules* 12: 1614–1622.
- Cao L., Srikumar R., Poole K. 2004. MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of the *nalC* gene encoding a repressor of PA3720-PA3719. *Molecular Microbiology* 53: 1423–1436.
- Carney S.M., Clemente J.C., Cox M.J., Dickson R.P., Huang Y.J., Kitsios G.D., Kloepfer K.M., Leung J.M., LeVan T.D., Molyneaux P.L., Moore B.B., O'Dwyer D.N., Segal L.N., Garantziotis S. 2020. Methods in lung microbiome research. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 62: 283–299.
- Carson C.F., Hammer K.A., Riley T.V. 2006. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: A review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clinical Microbiology Reviews* 19: 50–62.
- Chan A.C., Ager D., Thompson I.P. 2013. Resolving the mechanism of bacterial inhibition by plant secondary metabolites employing a combination of whole-cell biosensors. *Journal of Microbiological Methods* 93: 209–217.
- Chang W., Small D.A., Toghrol F., Bentley W.E. 2005a. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* reveals induction of pyocin genes in response to hydrogen peroxide. *BMC Genomics* 6: 115.
- Chang W., Small D.A., Toghrol F., Bentley W.E. 2005b. Microarray analysis of toxicogenomic effects of peracetic acid on *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Science & Technology* 39: 5893–5899.
- Charles C.H., Pan P.C., Sturdivant L., Vincent J.W. 2000. *In vivo* antimicrobial activity of an essential oil-containing mouthrinse on interproximal plaque bacteria. *The Journal of Clinical Dentistry* 11: 94–97.
- Chen H., Hu J., Chen P.R., Lan L., Li Z., Hicks L.M., Dinner A.R., He C. 2008. The *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux regulator MexR uses an oxidation-sensing mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 13586–13591.
- Chen W., Wang D., Zhou W., Sang H., Liu X., Ge Z., Zhang J., Lan L., Yang C.-G., Chen H. 2016. Novobiocin binding to NalD induces the expression of the MexAB-OprM pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 100: 749–758.

- Chin J.N., Rybak M.J., Cheung C.M., Savage P.B. 2007. Antimicrobial activities of ceragenins against clinical isolates of resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 1268–1273.
- Choi K.-H., Mima T., Casart Y., Rholi D., Kumar A., Beacham I.R., Schweizer H.P. 2008. Genetic tools for select-agent-compliant manipulation of *Burkholderia pseudomallei*. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 1064–1075.
- Chouhan S., Sharma K., Guleria S. 2017. Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. *Medicines* 4.
- Coates A.R., Halls G., Hu Y. 2011. Novel classes of antibiotics or more of the same? *British Journal of Pharmacology* 163: 184–194.
- Colomb-Cotinat M., Lacoste J., Brun-Buisson C., Jarlier V., Coignard B., Vaux S. 2016. Estimating the morbidity and mortality associated with infections due to multidrug-resistant bacteria (MDRB), France, 2012. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 5: 56.
- Cox S.D., Markham J.L. 2007. Susceptibility and intrinsic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to selected plant volatile compounds. *Journal of Applied Microbiology* 103: 930–936.
- Cox S.D., Gustafson J.E., Mann C.M., Markham J.L., Liew Y.C., Hartland R.P., Bell H.C., Warmington J.R., Wyllie S.G. 1998. Tea tree oil causes K⁺ leakage and inhibits respiration in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 26: 355–358.
- Damron F.H., Goldberg J.B. 2012. Proteolytic regulation of alginate overproduction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 84: 595–607.
- Damron F.H., McKenney E.S., Barbier M., Liechti G.W., Schweizer H.P., Goldberg J.B. 2013. Construction of mobilizable Mini-Tn7 vectors for bioluminescent detection of Gram-negative bacteria and single-copy promoter *lux* reporter analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 4149–4153.
- D'Arrigo M., Ginestra G., Mandalari G., Furneri P.M., Bisignano G. 2010. Synergism and postantibiotic effect of tobramycin and *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Phytomedicine* 17: 317–322.
- Davies J.C. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. *Paediatric Respiratory Reviews* 3: 128–134.
- Davis B.D. 1982. Bactericidal synergism between beta-lactams and aminoglycosides: Mechanism and possible therapeutic implications. *Reviews of Infectious Diseases* 4: 237–245.
- De Groot A.C., Schmidt E. 2016. Essential oils, part III: Chemical composition. *Dermatitis* 27: 161–169.
- Dhifi W., Bellili S., Jazi S., Bahloul N., Mnif W. 2016. Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines* 3: 25.
- Di Pasqua R., Betts G., Hoskins N., Edwards M., Ercolini D., Mauriello G. 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4863–4870.
- Dieppois G., Ducret V., Caille O., Perron K. 2012. The transcriptional regulator CzcR modulates antibiotic resistance and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 7: e38148.
- Domadia P., Swarup S., Bhunia A., Sivaraman J., Dasgupta D. 2007. Inhibition of bacterial cell division protein FtsZ by cinnamaldehyde. *Biochemical Pharmacology* 74: 831–840.
- Dordević S., Petrović S., Dobrić S., Milenković M., Vucićević D., Zizić S., Kukić J. 2007. Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *Journal of Ethnopharmacology* 109: 458–463.

- Dortet L., Bonnin R., Jousset A., Gauthier L., Naas T. 2016. Émergence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries : une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance ! *Journal des Anti-infectieux* 18: 139–159.
- Doyle A.A., Stephens J.C. 2019. A review of cinnamaldehyde and its derivatives as antibacterial agents. *Fitoterapia* 139: 104405.
- Drenkard E., Ausubel F.M. 2002. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416: 740–743.
- Du D., Wang-Kan X., Neuberger A., Veen H.W. van, Pos K.M., Piddock L.J.V., Luisi B.F. 2018. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology* 16: 523–539.
- Duarte A., Ferreira S., Silva F., Domingues F.C. 2012. Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. *Phytomedicine* 19: 236–238.
- Dumas J.-L., van Delden C., Perron K., Köhler T. 2006. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS microbiology letters* 254: 217–225.
- El-Baky R.M.A., Hashem Z.S. 2016. Eugenol and linalool: Comparison of their antibacterial and antifungal activities. *African Journal of Microbiology Research* 10: 1860–1872.
- El’Garch F., Jeannot K., Hocquet D., Llanes-Barakat C., Plésiat P. 2007. Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 1016–1021.
- Enaud R., Prevel R., Ciarlo E., Beaufile F., Wieërs G., Guery B., Delhaes L. 2020. The gut-lung axis in health and respiratory diseases: A place for inter-organ and inter-kingdom crosstalks. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10: 9.
- Evans K., Adewoye L., Poole K. 2001. MexR repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of MexR binding sites in the *mexA-mexR* intergenic region. *Journal of Bacteriology* 183: 807–812.
- Fadli M., Chevalier J., Hassani L., Mezrioui N.-E., Pagès J.-M. 2014. Natural extracts stimulate membrane-associated mechanisms of resistance in Gram-negative bacteria. *Letters in Applied Microbiology* 58: 472–477.
- Fadli M., Saad A., Sayadi S., Chevalier J., Mezrioui N.-E., Pagès J.-M., Hassani L. 2012. Antibacterial activity of *Thymus maroccanus* and *Thymus broussonetii* essential oils against nosocomial infection - bacteria and their synergistic potential with antibiotics. *Phytomedicine* 19: 464–471.
- Faleiro M.L., Miguel M.G. 2013. Chapter 6 - Use of essential oils and their components against multidrug-resistant bacteria. In: Rai, M.K., Kon, K.V. (Eds.), *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components*, Academic Press, San Diego, p.65–94.
- Fargier E., Mac Aogáin M., Mooij M.J., Woods D.F., Morrissey J.P., Dobson A.D.W., Adams C., O’Gara F. 2012. MexT functions as a redox-responsive regulator modulating disulfide stress resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 194: 3502–3511.
- Farisa Banu S., Rubini D., Rakshitaa S., Chandrasekar K., Murugan R., Wilson A., Gowrishankar S., Pandian S.K., Nithyanand P. 2017. Antivirulent properties of underexplored *Cinnamomum tamala* essential oil and its synergistic effects with DNase against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms - An *in vitro* study. *Frontiers in Microbiology* 8: 1144.

- Ferley J.P., Poutignat N., Zmirou D., Azzopardi Y., Balducci F. 1989. Prophylactic aromatherapy for supervening infections in patients with chronic bronchitis. Statistical evaluation conducted in clinics against a placebo. *Phytotherapy research* 3: 97–100.
- Ferrer-Espada R., Shahrour H., Pitts B., Stewart P.S., Sánchez-Gómez S., Martínez-de-Tejada G. 2019. A permeability-increasing drug synergizes with bacterial efflux pump inhibitors and restores susceptibility to antibiotics in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Scientific Reports* 9: 1–12.
- Ferro T.A.F., Araújo J.M.M., dos Santos Pinto B.L., dos Santos J.S., Souza E.B., da Silva B.L.R., Colares V.L.P., Novais T.M.G., Filho C.M.B., Struve C., Calixto J.B., Monteiro-Neto V., da Silva L.C.N., Fernandes E.S. 2016. Cinnamaldehyde inhibits *Staphylococcus aureus* virulence factors and protects against infection in a *Galleria mellonella* model. *Frontiers in Microbiology* 7.
- Fetar H., Gilmour C., Klinoski R., Daigle D.M., Dean C.R., Poole K. 2011. *mexEF-oprN* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: Regulation by the MexT activator in response to nitrosative stress and chloramphenicol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55: 508–514.
- Fick R.B., Stillwell P.C. 1989. Controversies in the management of pulmonary disease due to cystic fibrosis. *CHEST* 95: 1319–1327.
- Fisher K., Phillips C.A. 2006. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology* 101: 1232–1240.
- Foley S., Enescu M. 2007. A Raman spectroscopy and theoretical study of zinc–cysteine complexation. *Vibrational Spectroscopy* 44: 256–265.
- Förster-Fromme K., Höschle B., Mack C., Bott M., Armbruster W., Jendrossek D. 2006. Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine/isovalerate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4819–4828.
- Fothergill J.L., White J., Foweraker J.E., Walshaw M.J., Ledson M.J., Mahenthalingam E., Winstanley C. 2010. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* genomic instability on the application of typing methods for chronic cystic fibrosis infections. *Journal of Clinical Microbiology* 48: 2053–2059.
- Fournier D., Richardot C., Müller E., Robert-Nicoud M., Llanes C., Plésiat P., Jeannot K. 2013. Complexity of resistance mechanisms to imipenem in intensive care unit strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68: 1772–1780.
- Francis V.I., Stevenson E.C., Porter S.L. 2017. Two-component systems required for virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters* 364: fnx104.
- Françoise A., Héry-Arnaud G. 2020. The microbiome in cystic fibrosis pulmonary disease. *Genes* 11: E536.
- Fraud S., Poole K. 2011. Oxidative stress induction of the MexXY multidrug efflux genes and promotion of aminoglycoside resistance development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55: 1068–1074.
- Fraud S., Campigotto A.J., Chen Z., 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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 4478–4482.

- Friedl S.M., Oedendorfer K., Kitzer S., Reznicek G., Sladek G., Heuberger E. 2010. Comparison of liquid-liquid partition, HS-SPME and static HS GC/MS analysis for the quantification of (-)-linalool in human whole blood samples. *Natural Product Communications* 5: 1447–1452.
- Frucci M., Poole K. 2018. Aminoglycoside-inducible expression of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of the envelope stress-responsive AmgRS two-component system. *PLoS One* 13.
- Fuller M.E., McClay K., Hawari J., Paquet L., Malone T.E., Fox B.G., Steffan R.J. 2009. Transformation of RDX and other energetic compounds by xenobiotic reductases XenA and XenB. *Applied Microbiology and Biotechnology* 84: 535–544.
- Gagneux S., Long C.D., Small P.M., Van T., Schoolnik G.K., Bohannon B.J.M. 2006. The competitive cost of antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 312: 1944–1946.
- García-León G., Salgado F., Oliveros J.C., Sánchez M.B., Martínez J.L. 2014. Interplay between intrinsic and acquired resistance to quinolones in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Environmental Microbiology* 16: 1282–1296.
- Garvey M.I., Piddock L.J.V. 2008. The efflux pump inhibitor reserpine selects multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains that overexpress the ABC transporters PatA and PatB. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52: 1677–1685.
- Ghosh C., Sarkar P., Issa R., Haldar J. 2019. Alternatives to conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance. *Trends in Microbiology* 27: 323–338.
- Gill A.O., Holley R.A. 2004. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 5750–5755.
- Girlich D., Naas T., Nordmann P. 2004. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 2043–2048.
- Giwerzman B., Meyer C., Lambert P.A., Reinert C., Høiby N. 1992. High-level beta-lactamase activity in sputum samples from cystic fibrosis patients during antipseudomonal treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 36: 71–76.
- Gomez N.O., Tetard A., Ouerdane L., Laffont C., Brutesco C., Ball G., Lobinski R., Denis Y., Plésiat P., Llanes C., Arnoux P., Voulhoux R. 2021. Involvement of the *Pseudomonas aeruginosa* MexAB-OprM efflux pump in the secretion of the metallophore pseudopaline. *Molecular Microbiology* 115: 84–98.
- González-Pasayo R., Martínez-Romero E. 2000. Multiresistance genes of *Rhizobium etli* CFN42. *Molecular plant-microbe interactions* 13: 572–577.
- Gooderham W.J., Hancock R.E.W. 2009. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Reviews* 33: 279–294.
- Govan J.R., Harris G.S. 1986. *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: Unusual bacterial adaptation and pathogenesis. *Microbiological Sciences* 3: 302–308.
- Guénard S., Muller C., Monlezun L., Benas P., Broutin I., Jeannot K., Plésiat P. 2014. Multiple mutations lead to MexXY-OprM-dependent aminoglycoside resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58: 221–228.
- Guerra F.Q.S., Mendes J.M., Sousa J.P. de, Morais-Braga M.F.B., Santos B.H.C., Melo Coutinho H.D., Lima E. de O. 2012. Increasing antibiotic activity against a multidrug-resistant

- Acinetobacter spp* by essential oils of *Citrus limon* and *Cinnamomum zeylanicum*. *Natural Product Research* 26: 2235–2238.
- Gullberg E., Cao S., Berg O.G., Ilbäck C., Sandegren L., Hughes D., Andersson D.I. 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathogens* 7: e1002158.
- Gupta P., Patel D.K., Gupta V.K., Pal A., Tandon S., Darokar M.P. 2017. Citral, a monoterpenoid aldehyde interacts synergistically with norfloxacin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytomedicine* 34: 85–96.
- Gustafson J.E., Liew Y.C., Chew S., Markham J., Bell H.C., Wyllie S.G., Warmington J.R. 1998. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 26: 194–198.
- Gutu A.D., Sgambati N., Strasbourger P., Brannon M.K., Jacobs M.A., Haugen E., Kaul R.K., Johansen H.K., Høiby N., Moskowitz S.M. 2013. Polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa phoQ* mutants is dependent on additional two-component regulatory systems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57: 2204–2215.
- Hächler H., Santanam P., Kayser F.H. 1996. Sequence and characterization of a novel chromosomal aminoglycoside phosphotransferase gene, *aph (3')-IIb*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40: 1254–1256.
- Haenni M., Hocquet D., Ponsin C., Cholley P., Guyeux C., Madec J.-Y., Bertrand X. 2015. Population structure and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from animal infections in France. *BMC Veterinary Research* 11.
- Hajjar A.M., Ernst R.K., Tsai J.H., Wilson C.B., Miller S.I. 2002. Human toll-like receptor 4 recognizes host-specific LPS modifications. *Nature Immunology* 3: 354–359.
- Hall C.W., Zhang L., Mah T.-F. 2017. PA3225 is a transcriptional repressor of antibiotic resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61.
- Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166: 557–580.
- Hancock R.E. 1998. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. *Clinical Infectious Diseases* 27 Suppl 1: S93–99.
- Hanson N.D., Sanders C.C. 1999. Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among *Enterobacteriaceae*. *Current Pharmaceutical Design* 5: 881–894.
- Hay T., Fraud S., Lau C.H.-F., Gilmour C., 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 J., Starr C.G., Wimley W.C. 2015. A lack of synergy between membrane-permeabilizing cationic antimicrobial peptides and conventional antibiotics. *Biochimica et Biophysica Acta* 1848: 8–15.
- He T.-F., Zhang Z.-H., Zeng X.-A., Wang L.-H., Brennan C.S. 2018. Determination of membrane disruption and genomic DNA binding of cinnamaldehyde to *Escherichia coli* by use of microbiological and spectroscopic techniques. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* 178: 623–630.
- Heacock-Kang Y., Sun Z., Zarzycki-Siek J., Poonsuk K., McMillan I.A., Chuanchuen R., Hoang T.T. 2018. Two regulators, PA3898 and PA2100, modulate the *Pseudomonas aeruginosa* multidrug resistance MexAB-OprM and EmrAB efflux pumps and biofilm formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62.

- Henríquez T., Stein N.V., Jung H. 2020. Resistance to bipyridyls mediated by the TtgABC efflux system in *Pseudomonas putida* KT2440. *Frontiers in Microbiology* 11: 1974.
- Herrero M., de Lorenzo V., Timmis K.N. 1990. Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in Gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 172: 6557–6567.
- Hirakawa H., Inazumi Y., Masaki T., Hirata T., Yamaguchi A. 2005. Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 55: 1113–1126.
- Hocquet D., Nordmann P., El Garch F., Cabanne L., Plésiat P. 2006. Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 1347–1351.
- Hocquet D., Berthelot P., Roussel-Delvallez M., Favre R., Jeannot K., Bajolet O., Marty N., Grattard F., Mariani-Kurkdjian P., Bingen E., Husson M.-O., Couetdic G., Plésiat P. 2007. *Pseudomonas aeruginosa* may accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 3531–3536.
- Hocquet D., Petitjean M., Rohmer L., Valot B., Kulasekara H.D., Bedel E., Bertrand X., Plésiat P., Köhler T., Pantel A., Jacobs M.A., Hoffman L.R., Miller S.I. 2016. Pyomelanin-producing *Pseudomonas aeruginosa* selected during chronic infections have a large chromosomal deletion which confers resistance to pyocins. *Environmental Microbiology* 18: 3482–3493.
- Horna G., López M., Guerra H., Saénz Y., Ruiz J. 2018. Interplay between MexAB-OprM and MexEF-OprN in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports* 8: 16463.
- Horváth G., Ács K. 2015. Essential oils in the treatment of respiratory tract diseases highlighting their role in bacterial infections and their anti-inflammatory action: A review. *Flavour and Fragrance Journal* 30: 331–341.
- Hossain S.M.Z., Bojko B., Pawliszyn J. 2013. Automated SPME-GC-MS monitoring of headspace metabolomic responses of *E. coli* to biologically active components extracted by the coating. *Analytica Chimica Acta* 776: 41–49.
- Housseini B Issa K., Phan G., Broutin I. 2018. Functional mechanism of the efflux pumps transcription regulators from *Pseudomonas aeruginosa* based on 3D Structures. *Frontiers in Molecular Biosciences* 5: 57.
- Husain F.M., Ahmad I., Asif M., Tahseen Q. 2013. Influence of clove oil on certain quorum-sensing-regulated functions and biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Biosciences* 38: 835–844.
- Husain F.M., Ahmad I., Khan M.S., Ahmad E., Tahseen Q., Khan M.S., Alshabib N.A. 2015. Sub-MICs of *Mentha piperita* essential oil and menthol inhibits AHL mediated quorum sensing and biofilm of Gram-negative bacteria. *Frontiers in Microbiology* 6: 420.
- Hyldgaard M., Mygind T., Meyer R.L. 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* 3.
- Ilin A.I., Kulmanov M.E., Korotetskiy I.S., Islamov R.A., Akhmetova G.K., Lankina M.V., Reva O.N. 2017. Genomic insight into mechanisms of reversion of antibiotic resistance in multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* induced by a nanomolecular Iodine-containing complex FS-1. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7.

- Inouye S., Takizawa T., Yamaguchi H. 2001. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47: 565–573.
- Jalal S., Ciofu O., Høiby N., Gotoh N., Wretling B. 2000. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44: 710–712.
- Jeannot K., Sobel M.L., El Garch F., Poole K., Plésiat P. 2005. Induction of the MexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction. *Journal of Bacteriology* 187: 5341–5346.
- Juan C., Maciá M.D., Gutiérrez O., Vidal C., Pérez J.L., Oliver A. 2005. Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 4733–4738.
- Juarez P., Jeannot K., Plésiat P., Llanes C. 2017. Toxic electrophiles induce expression of the multi-drug efflux pump MexEF-OprN in *Pseudomonas aeruginosa* through a novel transcriptional regulator, CmrA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*: AAC.00585-17.
- Juarez P., Broutin I., Bordi C., Plésiat P., Llanes C. 2018. Constitutive activation of MexT by amino acid substitutions results in MexEF-OprN overproduction in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62.
- Juergens U.R., Dethlefsen U., Steinkamp G., Gillissen A., Repges R., Vetter H. 2003. Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. *Respiratory Medicine* 97: 250–256.
- Jung K., Fabiani F., Hoyer E., Lassak J. 2018. Bacterial transmembrane signalling systems and their engineering for biosensing. *Open Biology* 8.
- 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.
- Karioti A., Vrahimi-Hadjilouca T., Droushiotis D., Rancic A., Hadjipavlou-Litina D., Skaltsa H. 2006. Analysis of the essential oil of *Origanum dubium* growing wild in Cyprus. Investigation of its antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Planta Medica* 72: 1330–1334.
- Karumathil D.P., Nair M.S., Gaffney J., Kollanoor-Johny A., Venkitanarayanan K. 2018. Trans-cinnamaldehyde and eugenol increase *Acinetobacter baumannii* sensitivity to β -lactam antibiotics. *Frontiers in Microbiology* 9.
- Katsu T., Nakagawa H., Yasuda K. 2002. Interaction between polyamines and bacterial outer membranes as investigated with ion-selective electrodes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 1073–1079.
- Kenward M.A., Brown M.R., Fryer J.J. 1979. The influence of calcium or manganese on the resistance to EDTA, polymyxin B or cold shock, and the composition of *Pseudomonas aeruginosa* grown in glucose- or magnesium-depleted batch cultures. *The Journal of Applied Bacteriology* 47: 489–503.
- Klyachko K.A., Schuldiner S., Neyfakh A.A. 1997. Mutations affecting substrate specificity of the *Bacillus subtilis* multidrug transporter Bmr. *Journal of Bacteriology* 179: 2189–2193.
- Koenitzer J.R., Freeman B.A. 2010. Redox signaling in inflammation: interactions of endogenous electrophiles and mitochondria in cardiovascular disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1203: 45–52.

- Köhler T., Michéa-Hamzehpour M., Henze U., Gotoh N., Curty L.K., Pechère J.C. 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 23: 345–354.
- Kreamer N.N., Costa F., Newman D.K. 2015. The ferrous iron-responsive BqsRS two-component system activates genes that promote cationic stress tolerance. *MBio* 6: e02549.
- Kuete V., Alibert-Franco S., Eyong K.O., Ngameni B., Folefoc G.N., Nguemeving J.R., Tangmouo J.G., Fotso G.W., Komguem J., Ouahouo B.M.W., Bolla J.-M., Chevalier J., Ngadjui B.T., Nkengfack A.E., Pagès J.-M. 2011. Antibacterial activity of some natural products against bacteria expressing a multidrug-resistant phenotype. *International Journal of Antimicrobial Agents* 37: 156–161.
- Kumari H., Balasubramanian D., Zincke D., Mathee K. 2014. Role of *Pseudomonas aeruginosa* AmpR on β -lactam and non- β -lactam transient cross-resistance upon pre-exposure to subinhibitory concentrations of antibiotics. *Journal of Medical Microbiology* 63: 544–555.
- Kung V.L., Ozer E.A., Hauser A.R. 2010. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74: 621–641.
- Kwon J.A., Yu C.B., Park H.D. 2003. Bacteriocidal effects and inhibition of cell separation of cinnamic aldehyde on *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology* 37: 61–65.
- Laan M. van der, Urbanus M.L., Hagen-Jongman C.M. ten, Nouwen N., Oudega B., Harms N., Driessen A.J.M., Luirink J. 2003. A conserved function of YidC in the biogenesis of respiratory chain complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 5801–5806.
- Laborda P., Alcalde-Rico M., Chini A., Martínez J.L., Hernando-Amado S. 2021. Discovery of inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* virulence through the search for natural-like compounds with a dual role as inducers and substrates of efflux pumps. *Environmental Microbiology*.
- Lacks S., Greenberg B. 1977. Complementary specificity of restriction endonucleases of *Diplococcus pneumoniae* with respect to DNA methylation. *Journal of Molecular Biology* 114: 153–168.
- Lambert P.A. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the Royal Society of Medicine* 95: 22–26.
- Lamers R.P., Cavallari J.F., Burrows L.L. 2013. The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PA β N) permeabilizes the outer membrane of Gram-negative bacteria. *PloS One* 8: e60666.
- Lange J.N., Wood K.D., Knight J., Assimos D.G., Holmes R.P. 2012. Glyoxal formation and its role in endogenous oxalate synthesis. *Advances in Urology* 2012: 819202.
- Langeveld W.T., Veldhuizen E.J.A., Burt S.A. 2014. Synergy between essential oil components and antibiotics: A review. *Critical Reviews in Microbiology* 40: 76–94.
- LaPlante K.L. 2007. *In vitro* activity of lysostaphin, mupirocin, and tea tree oil against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 57: 413–418.
- Lashéras A., Guisset O., Boulestreau H., Rogues A.-M., Fiore M., Szajner S., Beziau M.-C., Gabinski C., Gachie J.-P. 2006. Réservoirs et transmission de *Pseudomonas aeruginosa* en réanimation médicale. *Médecine et Maladies Infectieuses* 36: 99–104.
- Lau C.H.-F., Fraud S., Jones M., Peterson S.N., Poole K. 2012. Reduced expression of the *rplU-rpmA* ribosomal protein operon in *mexXY*-expressing pan-aminoglycoside-resistant

- mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56: 5171–5179.
- Lau C.H.-F., Fraud S., Jones M., Peterson S.N., Poole K. 2013. Mutational activation of the AmgRS two-component system in aminoglycoside-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57: 2243–2251.
- Lau C.H.-F., Krahn T., Gilmour C., Mullen E., Poole K. 2015. AmgRS-mediated envelope stress-inducible expression of the *mexXY* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *MicrobiologyOpen* 4: 121–135.
- Laws M., Shaaban A., Rahman K.M. 2019. Antibiotic resistance breakers: Current approaches and future directions. *FEMS Microbiology Reviews* 43: 490–516.
- Lee C., Park C. 2017. Bacterial responses to glyoxal and methylglyoxal: Reactive electrophilic species. *International Journal of Molecular Sciences* 18.
- Lee Y.R., Yeo S. 2020. Cefiderocol, a new siderophore cephalosporin for the treatment of complicated urinary tract infections caused by multidrug-resistant pathogens: Reclinical and clinical pharmacokinetics, pharmacodynamics, efficacy and safety. *Clinical Drug Investigation*: 1–13.
- Lerminiaux N.A., Cameron A.D.S. 2019. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology* 65: 34–44.
- Levy S.B. 2002. The 2000 Garrod lecture. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49: 25–30.
- Li T., He L., Li C., Kang M., Song Y., Zhu Y., Shen Y., Zhao N., Zhao C., Yang J., Huang Q., Mou X., Tong A., Yang J., Wang Z., Ji C., Li H., Tang H., Bao R. 2020. Molecular basis of the lipid-induced MucA-MucB dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Communications Biology* 3: 1–11.
- Li X.-Z., Plésiat P. 2016. Antimicrobial drug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. In: Li, X.-Z., Elkins, C.A., Zgurskaya, H.I. (Eds.), *Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Regulation and Clinical Implications*, Springer International Publishing, Cham, p.359–400.
- Li X.Z., Nikaido H., Poole K. 1995. Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39: 1948–1953.
- Li X.Z., Zhang L., Poole K. 2000. Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 45: 433–436.
- Li X.-Z., Plésiat P., Nikaido H. 2015. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* 28: 337–418.
- Li Y., Kong D., Wu H. 2013. Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC–MS and FTIR spectroscopy. *Industrial Crops and Products* 41: 269–278.
- Liang H., Deng X., Li X., Ye Y., Wu M. 2014. Molecular mechanisms of master regulator VqsM mediating quorum-sensing and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nucleic Acids Research* 42: 10307–10320.
- Liang Y., Li Y., Sun A., Liu X. 2019. Chemical compound identification and antibacterial activity evaluation of cinnamon extracts obtained by subcritical n-butane and ethanol extraction. *Food Science & Nutrition* 7: 2186–2193.
- Liao J., Schurr M.J., Sauer K. 2013. The MerR-like regulator BrlR confers biofilm tolerance by activating multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology* 195: 3352–3363.

- Liberati N.T., Urbach J.M., Miyata S., Lee D.G., Drenkard E., Wu G., Villanueva J., Wei T., Ausubel F.M. 2006. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 2833–2838.
- Lister P.D., Wolter D.J., Hanson N.D. 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clinical Microbiology Reviews* 22: 582–610.
- Llanes C., Hocquet D., Vogne C., Benali-Baitich D., Neuwirth C., Plésiat P. 2004. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 1797–1802.
- Llanes C., Pourcel C., Richardot C., Plésiat P., Fichant G., Cavallo J.-D., Mérens A., GERPA Study Group. 2013. Diversity of β -lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: A french multicentre study. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68: 1763–1771.
- López-Causapé C., Rubio R., Cabot G., Oliver A. 2018. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* aminoglycoside mutational resistome *in vitro* and in the cystic fibrosis setting. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62.
- Lorenzi V., Muselli A., Bernardini A.F., Berti L., Pagès J.-M., Amaral L., Bolla J.-M. 2009. Geraniol restores antibiotic activities against multidrug-resistant isolates from Gram-negative species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53: 2209–2211.
- Lou Z., Letsididi K.S., Yu F., Pei Z., Wang H., Letsididi R. 2019. Inhibitive effect of eugenol and its nanoemulsion on quorum sensing-mediated virulence factors and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Food Protection* 82: 379–389.
- Lu M., Dai T., Murray C.K., Wu M.X. 2018. Bactericidal property of oregano oil against multidrug-resistant clinical isolates. *Frontiers in Microbiology* 9.
- Lüddecke F., Wülfing A., Timke M., Germer F., Weber J., Dikfidan A., Rahnfeld T., Linder D., Meyerdierks A., Harder J. 2012. Geraniol and geraniol dehydrogenases induced in anaerobic monoterpene degradation by *Castellaniella defragrans*. *Applied and Environmental Microbiology* 78: 2128–2136.
- Lundgren B.R., Thornton W., Dornan M.H., Villegas-Peñaranda L.R., Boddy C.N., Nomura C.T. 2013. Gene PA2449 is essential for glycine metabolism and pyocyanin biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Bacteriology* 195: 2087–2100.
- Lüth H.-J., Ogunlade V., Kuhla B., Kientsch-Engel R., Stahl P., Webster J., Arendt T., Münch G. 2005. Age- and stage-dependent accumulation of advanced glycation end products in intracellular deposits in normal and Alzheimer's disease brains. *Cerebral Cortex* 15: 211–220.
- Luu R.A., Kootstra J.D., Nesteryuk V., Brunton C.N., Parales J.V., Ditty J.L., Parales R.E. 2015. Integration of chemotaxis, transport and catabolism in *Pseudomonas putida* and identification of the aromatic acid chemoreceptor PcaY. *Molecular Microbiology* 96: 134–147.
- Ma S., Wozniak D.J., Ohman D.E. 1997. Identification of the histidine protein kinase KinB in *Pseudomonas aeruginosa* and its phosphorylation of the alginate regulator AlgB. *Journal of Biological Chemistry* 272: 17952–17960.
- Macfarlane E.L.A., Kwasnicka A., Hancock R.E.W. 2000. Role of *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-PhoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides. *Microbiology* 146: 2543–2554.

- Mah T.F., O'Toole G.A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology* 9: 34–39.
- Mahboubi, Bidgoli F.G. 2010. Antistaphylococcal activity of *Zataria multiflora* essential oil and its synergy with vancomycin. *Phytomedicine* 17: 548–550.
- Mahboubi M. 2017. *Artemisia sieberi* besser essential oil and treatment of fungal infections. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 89: 1422–1430.
- Mahenthiralingam E., Campbell M.E., Foster J., Lam J.S., Speert D.P. 1996. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 1129–1135.
- Mainardi J.L., Gutmann L., Acar J.F., Goldstein F.W. 1995. Synergistic effect of amoxicillin and cefotaxime against *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39: 1984–1987.
- Mak S., Xu Y., Nodwell J.R. 2014. The expression of antibiotic resistance genes in antibiotic-producing bacteria. *Molecular Microbiology* 93: 391–402.
- Marchand I., Damier-Piolle L., Courvalin P., Lambert T. 2004. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 3298–3304.
- Martin R.G., Rosner J.L. 1995. Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to *mar* operator sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 5456–5460.
- Martinez J.L., Sánchez M.B., Martínez-Solano L., Hernandez A., Garmendia L., Fajardo A., Alvarez-Ortega C. 2009. Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS microbiology reviews* 33: 430–449.
- Maseda H., Sawada I., Saito K., Uchiyama H., Nakae T., Nomura N. 2004. Enhancement of the MexAB-OprM efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the *mexEF-oprN* efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48: 1320–1328.
- Masuda N., Gotoh N., Ishii C., Sakagawa E., Ohya S., Nishino T. 1999. Interplay between chromosomal beta-lactamase and the MexAB-OprM efflux system in intrinsic resistance to beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 400–402.
- Mathee K., Narasimhan G., Valdes C., Qiu X., Matewish J.M., Koehrsen M., Rokas A., Yandava C.N., Engels R., Zeng E., Olavarietta R., Doud M., Smith R.S., Montgomery P., White J.R., Godfrey P.A., Kodira C., Birren B., Galagan J.E., Lory S. 2008. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 3100–3105.
- McLamore E.S., Zhang W., Porterfield D.M., Banks M.K. 2010. Membrane-aerated biofilm proton and oxygen flux during chemical toxin exposure. *Environmental Science & Technology* 44: 7050–7057.
- McLaughlin H.P., Caly D.L., McCarthy Y., Ryan R.P., Dow J.M. 2012. An orphan chemotaxis sensor regulates virulence and antibiotic tolerance in the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 7: e42205.
- Meister R., Wittig T., Beuscher N., de Mey C. 1999. Efficacy and tolerability of myrtol standardized in long-term treatment of chronic bronchitis. A double-blind, placebo-controlled study. *Arzneimittelforschung* 49: 351–358.
- Mezzoug N., Elhadri A., Dallouh A., Amkiss S., Skali N.S., Abrini J., Zhiri A., Baudoux D., Diallo B., El Jaziri M., Idaomar M. 2007. Investigation of the mutagenic and antimutagenic

- effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 629: 100–110.
- Miao L., Liu W., Qiao Q., Li X., Xu Z. 2020. Fluorescent antibiotics for real-time tracking of pathogenic bacteria. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 10: 444–451.
- Mikkelsen H., Sivaneson M., Filloux A. 2011. Key two-component regulatory systems that control biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* 13: 1666–1681.
- Mingeot-Leclercq M.-P., Glupczynski Y., Tulkens P.M. 1999. Aminoglycosides: Activity and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 727–737.
- Minogue T.D., Daligault H.A., Davenport K.W., Bishop-Lilly K.A., Broomall S.M., Bruce D.C., Chain P.S., Chertkov O., Coyne S.R., Freitas T., Frey K.G., Gibbons H.S., Jaissle J., Redden C.L., Rosenzweig C.N., Xu Y., Johnson S.L. 2014. Complete genome assembly of *Escherichia coli* atcc 25922, a serotype O6 reference strain. *Genome Announcements* 2.
- Mislin G.L.A., Schalk I.J. 2014. Siderophore-dependent iron uptake systems as gates for antibiotic Trojan horse strategies against *Pseudomonas aeruginosa*. *Metallomics: Integrated Biometal Science* 6: 408–420.
- Moellering R.C., Weinberg A.N. 1971. Studies on antibiotic synergism against *Enterococci*. *Journal of Clinical Investigation* 50: 2580–2584.
- Mokarizadeh M., Kafil H.S., Ghanbarzadeh S., Alizadeh A., Hamishehkar H. 2017. Improvement of citral antimicrobial activity by incorporation into nanostructured lipid carriers: A potential application in food stuffs as a natural preservative. *Research in Pharmaceutical Sciences* 12: 409–415.
- Molina-Santiago C., Udaondo Z., Gómez-Lozano M., Molin S., Ramos J.-L. 2017. Global transcriptional response of solvent-sensitive and solvent-tolerant *Pseudomonas putida* strains exposed to toluene. *Environmental Microbiology* 19: 645–658.
- Montagu A., Joly-Guillou M.-L., Rossines E., Cayon J., Kempf M., Saulnier P. 2016. Stress conditions induced by carvacrol and cinnamaldehyde on *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology* 7: 1133.
- Moon S.-E., Kim H.-Y., Cha J.-D. 2011. Synergistic effect between clove oil and its major compounds and antibiotics against oral bacteria. *Archives of Oral Biology* 56: 907–916.
- Moradali M.F., Ghods S., Rehm B.H.A. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: A paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7.
- Morita Y., Sobel M.L., Poole K. 2006. Antibiotic inducibility of the MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of the antibiotic-inducible PA5471 gene product. *Journal of Bacteriology* 188: 1847–1855.
- Morita Y., Tomida J., Kawamura Y. 2012. Primary mechanisms mediating aminoglycoside resistance in the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate PA7. *Microbiology* 158: 1071–1083.
- Morita Y., Gilmour C., Metcalf D., Poole K. 2009. Translational control of the antibiotic inducibility of the PA5471 gene required for MexXY multidrug efflux gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 191: 4966–4975.
- Morita Y., Murata T., Mima T., Shiota S., Kuroda T., Mizushima T., Gotoh N., Nishino T., Tsuchiya T. 2003. Induction of *mexCD-oprJ* operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51: 991–994.

- Moskowitz S.M., Ernst R.K., 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. *Journal of Bacteriology* 186: 575–579.
- Mousavi F., Bojko B., Bessonneau V., Pawliszyn J. 2016. Cinnamaldehyde characterization as an antibacterial agent toward *E. coli* metabolic profile using 96-blade solid-phase microextraction coupled to liquid Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Proteome Research* 15: 963–975.
- Moussaoui F., Alaoui T. 2016. Evaluation of antibacterial activity and synergistic effect between antibiotic and the essential oils of some medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 6: 32–37.
- Moya B., Dötsch A., Juan C., Blázquez J., Zamorano L., Haussler S., Oliver A. 2009. β -lactam resistance response triggered by inactivation of a nonessential penicillin-binding protein. *PLoS Pathogens* 5: e1000353.
- Mulcahy H., Charron-Mazenod L., Lewenza S. 2008. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS Pathogens* 4: e1000213.
- Muller C., Plésiat P., Jeannot K. 2011. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55: 1211–1221.
- Muschel L.H., Gustafson L. 1968. Antibiotic, detergent, and complement sensitivity of *Salmonella typhi* after ethylenediaminetetraacetic acid treatment. *Journal of Bacteriology* 95: 2010–2013.
- Nair B.M., Cheung K.-J., Griffith A., Burns J.L. 2004. Salicylate induces an antibiotic efflux pump in *Burkholderia cepacia* complex genomovar III (*B. cenocepacia*). *The Journal of Clinical Investigation* 113: 464–473.
- Nazzaro F., Fratianni F., De Martino L., Coppola R., De Feo V. 2013. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals* 6: 1451–1474.
- Negi N., Prakash P., Gupta M.L., Mohapatra T.M. 2014. Possible role of curcumin as an efflux pump inhibitor in multi drug resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 8: DC04–DC07.
- Nelson K.E., Weinel C., Paulsen I.T., Dodson R.J., Hilbert H., Martins dos Santos V. a. P., Fouts D.E., Gill S.R., Pop M., Holmes M., Brinkac L., Beanan M., DeBoy R.T., Daugherty S., Kolonay J., Madupu R., Nelson W., White O., Peterson J., Khouri H., Hance I., Chris Lee P., Holtzapple E., Scanlan D., Tran K., Moazzez A., Utterback T., Rizzo M., Lee K., Kosack D., Moestl D., Wedler H., Lauber J., Stjepandic D., Hoheisel J., Straetz M., Heim S., Kiewitz C., Eisen J.A., Timmis K.N., Dusterhöft A., Tümmler B., Fraser C.M. 2002. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* 4: 799–808.
- Niu C., Afre S., Gilbert E.S. 2006. Subinhibitory concentrations of cinnamaldehyde interfere with quorum sensing. *Letters in Applied Microbiology* 43: 489–494.
- Nuryastuti T., van der Mei H.C., Busscher H.J., Irvati S., Aman A.T., Krom B.P. 2009. Effect of cinnamon oil on *icaA* expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 6850–6855.
- Obaidat M.M., Frank J.F. 2009. Inactivation of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on sliced and whole tomatoes by allyl isothiocyanate, carvacrol, and cinnamaldehyde in vapor phase. *Journal of Food Protection* 72: 315–324.

- Ochs M.M., McCusker M.P., Bains M., Hancock R.E. 1999. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 1085–1090.
- Opperman T.J., Kwasny S.M., Kim H.-S., Nguyen S.T., Houseweart C., D'Souza S., Walker G.C., Peet N.P., Nikaido H., Bowlin T.L. 2014. Characterization of a novel pyranopyridine inhibitor of the AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58: 722–733.
- Palma M., Zurita J., Ferreras J.A., Worgall S., Larone D.H., Shi L., Campagne F., 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. *Infection and Immunity* 73: 2958–2966.
- Palumbo J.D., Kado C.I., Phillips D.A. 1998. An isoflavonoid-inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots. *Journal of Bacteriology* 180: 3107–3113.
- Pan Y.-P., Xu Y.-H., Wang Z.-X., Fang Y.-P., Shen J.-L. 2016. Overexpression of MexAB-OprM efflux pump in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Archives of Microbiology* 198: 565–571.
- Panahi Y., Akhavan A., Sahebkar A., Hosseini S.M., Taghizadeh M., Akbari H., Sharif M.R., Imani S. 2014. Investigation of the effectiveness of *Syzygium aromaticum*, *Lavandula angustifolia* and *Geranium robertianum* essential oils in the treatment of acute external otitis: A comparative trial with ciprofloxacin. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection* 47: 211–216.
- Papadopoulos C.J., Carson C.F., Chang B.J., Riley T.V. 2008. Role of the MexAB-OprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* in tolerance to tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its monoterpene components terpinen-4-ol, 1,8-cineole, and alpha-terpineol. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 1932–1935.
- Pauli A., Schilcher H. 2010. *In vitro* antimicrobial activities of essential oils monographed in the European Pharmacopocia. In: *Handbook of Essential Oils : Science, Technology, and Applications*, 6th ed. K.H. Can Baser & G. Buchbauer CRC Press.
- Pearson J.P., Passador L., Iglewski B.H., Greenberg E.P. 1995. A second N-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 1490–1494.
- Peleg A.Y., Choo J.M., Langan K.M., Edgeworth D., Keating D., Wilson J., Rogers G.B., Kotsimbos T. 2018. Antibiotic exposure and interpersonal variance mask the effect of Ivacaftor on respiratory microbiota composition. *Journal of Cystic Fibrosis* 17: 50–56.
- Pennacchio A., Rossi M., Raia C.A. 2013. Synthesis of cinnamyl alcohol from cinnamaldehyde with *Bacillus stearothermophilus* alcohol dehydrogenase as the isolated enzyme and in recombinant *E. coli* cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 170: 1482–1490.
- Pereira L.A.S., Oliveira M.M.M. de, Martins H.H. de A., Vale L.A. do, Isidoro S.R., Botrel D.A., Piccoli R.H., Pereira L.A.S., Oliveira M.M.M. de, Martins H.H. de A., Vale L.A. do, Isidoro S.R., Botrel D.A., Piccoli R.H. 2019. Sanitizing cinnamaldehyde solutions against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms formed on stainless steel surfaces. *Brazilian Journal of Food Technology* 22.
- Pérez J.M., Arenas F.A., Pradenas G.A., Sandoval J.M., Vásquez C.C. 2008. *Escherichia coli* YqhD exhibits aldehyde reductase activity and protects from the harmful effect of lipid peroxidation-derived aldehydes. *Journal of Biological Chemistry* 283: 7346–7353.

- Pesingi P.V., Singh B.R., Pesingi P.K., Bhardwaj M., Singh S.V., Kumawat M., Sinha D.K., Gandham R.K. 2019. MexAB-oprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* offers resistance to carvacrol: A herbal antimicrobial agent. *Frontiers in Microbiology* 10.
- Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29: e45.
- Picone G., Laghi L., Gardini F., Lanciotti R., Siroli L., Capozzi F. 2013. Evaluation of the effect of carvacrol on the *Escherichia coli* 555 metabolome by using ¹H-NMR spectroscopy. *Food Chemistry* 141: 4367–4374.
- Pirnay J.-P., De Vos D., Mossialos D., Vanderkelen A., Cornelis P., Zizi M. 2002. Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* *oprD* gene from clinical and environmental isolates. *Environmental Microbiology* 4: 872–882.
- Poole K. 2005. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 479–487.
- Poole K., Fruci M. 2016. Antimicrobial drug efflux systems as components of bacterial stress responses. In: Li, X.-Z., Elkins, C.A., Zgurskaya, H.I. (Eds.), *Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Regulation and Clinical Implications*, Springer International Publishing, Cham, p.665–700.
- Poole K., Krebs K., McNally C., Neshat S. 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for involvement of an efflux operon. *Journal of Bacteriology* 175: 7363–7372.
- Poole K., Gotoh N., Tsujimoto H., Zhao Q., Wada A., Yamasaki T., Neshat S., Yamagishi J., Li X.Z., Nishino T. 1996. Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 21: 713–724.
- Pursell A., Fruci M., Mikalauskas A., Gilmour C., Poole K. 2015. EsrC, an envelope stress-regulated repressor of the *mexCD-oprJ* multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* 17: 186–198.
- Qiu J., Feng H., Lu J., Xiang H., Wang D., Dong J., Wang J., Wang X., Liu J., Deng X. 2010. Eugenol reduces the expression of virulence-related exoproteins in *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 5846–5851.
- Quale J., Bratu S., Gupta J., Landman D. 2006. Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50: 1633–1641.
- Queenan A.M., Bush K. 2007. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 20: 440–458.
- Quintero N., Stashenko E.E., Fuentes J.L. 2012. The influence of organic solvents on estimates of genotoxicity and antigenotoxicity in the SOS chromotest. *Genetics and Molecular Biology* 35: 503–514.
- Ramos J.-L., Sol Cuenca M., Molina-Santiago C., Segura A., Duque E., Gómez-García M.R., Udaondo Z., Roca A. 2015. Mechanisms of solvent resistance mediated by interplay of cellular factors in *Pseudomonas putida*. *FEMS microbiology reviews* 39: 555–566.
- de Rapper S., Viljoen A., van Vuuren S. 2016. The *in vitro* antimicrobial effects of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with conventional antimicrobial agents. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2016: 2752739.
- Rasamiravaka T., Labtani Q., Duez P., El Jaziri M. 2015. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed Research International* 2015: 759348.

- Ravirala R.S., Barabote R.D., Wheeler D.M., Reverchon S., Tatum O., Malouf J., Liu H., Pritchard L., Hedley P.E., Birch P.R.J., Toth I.K., Payton P., San Francisco M.J.D. 2007. Efflux pump gene expression in *Erwinia chrysanthemi* is induced by exposure to phenolic acids. *Molecular plant-microbe interactions* 20: 313–320.
- Ravishankar S., Zhu L., Reyna-Granados J., Law B., Joens L., Friedman M. 2010. Carvacrol and cinnamaldehyde inactivate antibiotic-resistant *Salmonella enterica* in buffer and on celery and oysters. *Journal of Food Protection* 73: 234–240.
- Reading C., Cole M. 1977. Clavulanic acid: A β -lactamase-inhibiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 11: 852–857.
- Reichling J. 2020. Anti-biofilm and virulence factor-reducing activities of essential oils and oil components as a possible option for bacterial infection control. *Planta Medica* 86: 520–537.
- Ren, Bedzyk L.A., Ye R.W., Thomas S.M., Wood T.K. 2004. Differential gene expression shows natural brominated furanones interfere with the autoinducer-2 bacterial signaling system of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 88: 630–642.
- Ren Q., Paulsen I.T. 2005. Comparative analyses of fundamental differences in membrane transport capabilities in prokaryotes and eukaryotes. *PLoS Computational Biology* 1: e27.
- Renau T.E., Léger R., Flamme E.M., Sangalang J., She M.W., Yen R., Gannon C.L., Griffith D., Chamberland S., Lomovskaya O., Hecker S.J., Lee V.J., Ohta T., Nakayama K. 1999. Inhibitors of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* potentiate the activity of the fluoroquinolone antibacterial levofloxacin. *Journal of Medicinal Chemistry* 42: 4928–4931.
- Richardot C., Juárez P., Jeannot K., Patry I., Plésiat P., Llanes C. 2016. Amino acid substitutions account for most MexS alterations in clinical *nfxC* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60: 2302–2310.
- Ríos J.-L. 2016. Chapter 1 - Essential oils: What they are and how the terms are used and defined. In: Preedy, V.R. (Ed.), *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, Academic Press, San Diego, p.3–10.
- Robert L., Penaranda F.S. 1954. Studies on aldehyde-protein interactions. I. Reaction of amino acids with lower aldehydes. *Journal of Polymer Science* 12: 337–350.
- Rodríguez-Martínez J.-M., Poirel L., Nordmann P. 2009. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53: 4783–4788.
- Ropy A., Cabot G., Sánchez-Diener I., Aguilera C., Moya B., Ayala J.A., Oliver A. 2015. Role of *Pseudomonas aeruginosa* low-molecular-mass penicillin-binding proteins in *ampC* expression, β -lactam resistance, and peptidoglycan structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59: 3925–3934.
- Rosato A., Vitali C., De Laurentis N., Armenise D., Antonietta Milillo M. 2007. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with norfloxacin. *Phytomedicine* 14: 727–732.
- Rosato A., Piarulli M., Corbo F., Muraglia M., Carone A., Vitali M.E., Vitali C. 2010. *In vitro* synergistic antibacterial action of certain combinations of gentamicin and essential oils. *Current Medicinal Chemistry* 17: 3289–3295.
- Rosenberg E.Y., Bertenthal D., Nilles M.L., Bertrand K.P., Nikaido H. 2003. Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. *Molecular Microbiology* 48: 1609–1619.

- Ryan R.P., Fouhy Y., Garcia B.F., Watt S.A., Niehaus K., Yang L., Tolker-Nielsen T., Dow J.M. 2008. Interspecies signalling via the *Stenotrophomonas maltophilia* diffusible signal factor influences biofilm formation and polymyxin tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 68.
- Saito A.Y., Sussmann R.A.C., Kimura E.A., Cassera M.B., Katzin A.M. 2015. Quantification of nerolidol in mouse plasma using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 111: 100–103.
- Salmi C., Loncle C., Vidal N., Letourneux Y., Fantini J., Maresca M., Taïeb N., Pagès J.-M., Brunel J.M. 2008. Squalamine: An appropriate strategy against the emergence of multidrug resistant Gram-negative bacteria? *PLoS One* 3: e2765.
- Sanz-García F., Alvarez-Ortega C., Olivares-Pacheco J., Blanco P., Martínez J.L., Hernando-Amado S. 2019. Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* aminoglycoside differential resistomes allows defining genes simultaneously involved in intrinsic antibiotic resistance and virulence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63.
- Sarwar Z., Lundgren B.R., Grassa M.T., Wang M.X., Gribble M., Moffat J.F., Nomura C.T. 2016. GcsR, a TyrR-like enhancer-binding protein, regulates expression of the glycine cleavage system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *MSphere* 1.
- Satou T., Takahashi M., Kasuya H., Murakami S., Hayashi S., Sadamoto K., Koike K. 2013. Organ accumulation in mice after inhalation of single or mixed essential oil compounds. *Phytotherapy research* 27: 306–311.
- Schaible B., Crifo B., Schaffer K., Taylor C.T. 2020. The putative bacterial oxygen sensor *Pseudomonas* prolyl hydroxylase (PPHD) suppresses antibiotic resistance and pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biological Chemistry* 295: 1195–1201.
- Schelz Z., Molnar J., Hohmann J. 2006. Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia* 77: 279–285.
- Selvaraj A., Valliammai A., Muthuramalingam P., Sethupathy S., Subramenium G.A., Ramesh M., Pandian S.K. 2020. Proteomic and systematic functional profiling unveils citral targeting antibiotic resistance, antioxidant defense, and biofilm-associated two-component systems of *Acinetobacter baumannii* to cucumber biofilm and virulence traits. *MSystems* 5.
- Senatore F. 1996. Influence of harvesting time on yield and composition of the essential oil of a thyme (*Thymus pulegioides*) growing wild in Campania (southern Italy). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1327–1332.
- Shahverdi A.R., Monsef-Esfahani H.R., Tavasoli F., Zaheri A., Mirjani R. 2007. Trans-cinnamaldehyde from *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil reduces the clindamycin resistance of *Clostridium difficile* in vitro. *Journal of Food Science* 72: S055–S058.
- Shapira R., Mimran E. 2007. Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants exhibiting altered response to thymol. *Microbial Drug Resistance* 13: 157–165.
- Sharma A., Gupta V.K., Pathania R. 2019. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: From bench to bedside. *The Indian Journal of Medical Research* 149: 129–145.
- Shi C., Song K., Zhang X., Sun Y., Sui Y., Chen Y., Jia Z., Sun H., Sun Z., Xia X. 2016. Antimicrobial activity and possible mechanism of action of citral against *Cronobacter sakazakii*. *PLoS One* 11.

- Shi J., Jin Y., Bian T., Li K., Sun Z., Cheng Z., Jin S., Wu W. 2015. SuhB is a novel ribosome associated protein that regulates expression of MexXY by modulating ribosome stalling in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 98: 370–383.
- Shin S.W. 2006. Anti-*Salmonella* activity of lemongrass oil alone and in combination with antibiotics. *Natural Product Sciences* 11: 160–164.
- Shlaes D.M. 2013. New β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations in clinical development. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1277: 105–114.
- Shorr A.F. 2009. Review of studies of the impact on Gram-negative bacterial resistance on outcomes in the intensive care unit. *Critical Care Medicine* 37: 1463–1469.
- Si H., Hu J., Liu Z., Zeng Z. 2008. Antibacterial effect of oregano essential oil alone and in combination with antibiotics against extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *FEMS immunology and medical microbiology* 53: 190–194.
- Sikkema J., de Bont J.A., Poolman B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews* 59: 201–222.
- Şimşek M., Duman R. 2017. Investigation of effect of 1,8-cineole on antimicrobial activity of chlorhexidine gluconate. *Pharmacognosy Research* 9: 234–237.
- Singh R., Shushni M.A.M., Belkheir A. 2015. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry* 8: 322–328.
- Siriyong T., Srimanote P., Chusri S., Yingyongnarongkul B., Suaisom C., Tipmanee V., Voravuthikunchai S.P. 2017. Conessine as a novel inhibitor of multidrug efflux pump systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 17: 405.
- Sivaneson M., Mikkelsen H., Ventre I., Bordi C., Filloux A. 2011. Two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*: An intricate network mediating fimbrial and efflux pump gene expression. *Molecular Microbiology* 79: 1353–1366.
- Sobel M.L., McKay G.A., Poole K. 2003. Contribution of the MexXY multidrug transporter to aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47: 3202–3207.
- Sobel M.L., Hocquet D., Cao L., Plesiat P., Poole K. 2005. Mutations in PA3574 (*nalD*) lead to increased MexAB-OprM expression and multidrug resistance in laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 1782–1786.
- Song Y.-R., Choi M.-S., Choi G.-W., Park I.-K., Oh C.-S. 2016. Antibacterial activity of cinnamaldehyde and estragole extracted from plant essential oils against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker disease in kiwifruit. *The Plant Pathology Journal* 32: 363–370.
- de Sousa A.C., Alviano D.S., Blank A.F., Alves P.B., Alviano C.S., Gattass C.R. 2004. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56: 677–681.
- Srikumar R., Li X.Z., Poole K. 1997. Inner membrane efflux components are responsible for beta-lactam specificity of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 179: 7875–7881.
- Starr L.M., Fruci M., Poole K. 2012. Pentachlorophenol induction of the *Pseudomonas aeruginosa* *mexAB-oprM* efflux operon: involvement of repressors NaIC and MexR and the antirepressor ArmR. *PloS One* 7: e32684.
- Stavri M., Piddock L.J.V., Gibbons S. 2007. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59: 1247–1260.

- Stermitz F.R., Cashman K.K., Halligan K.M., Morel C., Tegos G.P., Lewis K. 2003. Polyacylated neohesperidosides from *Geranium caespitosum*: bacterial multidrug resistance pump inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13: 1915–1918.
- Stewart P.S., Franklin M.J., Williamson K.S., Folsom J.P., Boegli L., James G.A. 2015. Contribution of stress responses to antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59: 3838–3847.
- Stover C.K., Pham X.Q., Erwin A.L., Mizoguchi S.D., Warrenner P., Hickey M.J., Brinkman F.S., Hufnagle W.O., Kowalik D.J., Lagrou M., Garber R.L., Goltry L., Tolentino E., Westbrook-Wadman S., Yuan Y., Brody L.L., Coulter S.N., Folger K.R., Kas A., Larbig K., Lim R., Smith K., Spencer D., Wong G.K., Wu Z., Paulsen I.T., Reizer J., Saier M.H., Hancock R.E., Lory S., Olson M.V. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959–964.
- Sun Y., Guo D., Hua Z., Sun H., Zheng Z., Xia X., Shi C. 2019. Attenuation of multiple *Vibrio parahaemolyticus* virulence factors by citral. *Frontiers in Microbiology* 10: 894.
- Swamy M.K., Akhtar M.S., Sinniah U.R. 2016. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: An updated review. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2016.
- Tacconelli E., Carrara E., Savoldi A., Harbarth S., Mendelson M., Monnet D.L., Pulcini C., Kahlmeter G., Kluytmans J., Carmeli Y., Ouellette M., Outterson K., Patel J., Cavaleri M., Cox E.M., Houchens C.R., Grayson M.L., Hansen P., Singh N., Theuretzbacher U., Magrini N., WHO Pathogens Priority List Working Group. 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases* 18: 318–327.
- Talwalkar J.S., Murray T.S. 2016. The approach to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Clinics in Chest Medicine* 37: 69–81.
- Tegos G., Stermitz F.R., Lomovskaya O., Lewis K. 2002. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 3133–3141.
- Telke A.A., Olaitan A.O., Morand S., Rolain J.-M. 2017. SoxRS induces colistin hetero-resistance in *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter cloacae* by regulating the AcrAB-TolC efflux pump. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72: 2715–2721.
- Tetard A., Zedet A., Girard C., Plésiat P., Llanes C. 2019. Cinnamaldehyde induces expression of efflux pumps and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63.
- Tetard A., Foley S., Mislin G.L.A., Brunel J.-M., Oliva E., Torrealba Anzola F., Zedet A., Cardey B., Pellequer Y., Ramseyer C., Plésiat P., Llanes C. 2021. Negative impact of citral on susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics. *Frontiers in Microbiology* 12: 709838.
- Tian Z.-X., Yi X.-X., Cho A., O’Gara F., 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 Pathogens* 12.
- Topa S.H., Palombo E.A., Kingshott P., Blackall L.L. 2020. Activity of cinnamaldehyde on quorum sensing and biofilm susceptibility to antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microorganisms* 8.
- Tozoni D., Zacaria J., Vanderlinde R., Longaray Delamare A.P. & E. 2010. Degradation of citronellol, citronellal and citronellyl acetate by *Pseudomonas mendocina* IBPse 105. *Electronic Journal of Biotechnology* 13.


- Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M.G., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G., Bisignano G. 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 2474–2478.
- Turner P.C., Miller E.N., Jarboe L.R., Baggett C.L., Shanmugam K.T., Ingram L.O. 2011. YqhC regulates transcription of the adjacent *Escherichia coli* genes *yqhD* and *dkgA* that are involved in furfural tolerance. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38: 431–439.
- Ultee A., Bennik M.H.J., Moezelaar R. 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1561–1568.
- Ultee A., Kets E.P., Alberda M., Hoekstra F.A., Smid E.J. 2000. Adaptation of the food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology* 174: 233–238.
- Utcharyiyakiat I., Surassmo S., Jaturanpinyo M., Khuntayaporn P., Chomnawang M.T. 2016. Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. *BMC complementary and alternative medicine* 16: 158.
- Utsui Y., Ohya S., Magaribuchi T., Tajima M., Yokota T. 1986. Antibacterial activity of cefmetazole alone and in combination with fosfomycin against methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 30: 917–922.
- Vargas P., Felipe A., Michán C., Gallegos M.-T. 2011. Induction of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 MexAB-OprM multidrug efflux pump by flavonoids is mediated by the repressor PmeR. *Molecular plant-microbe interactions* 24: 1207–1219.
- Venturi V. 2006. Regulation of quorum sensing in *Pseudomonas*. *FEMS microbiology reviews* 30: 274–291.
- Veras H.N.H., Rodrigues F.F.G., Colares A.V., Menezes I.R.A., Coutinho H.D.M., Botelho M.A., Costa J.G.M. 2012. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil of *Lippia sidoides* and thymol. *Fitoterapia* 83: 508–512.
- Vercammen K., Wei Q., Charlier D., Dötsch A., Haüssler S., Schulz S., Salvi F., Gadda G., Spain J., Rybtke M.L., Tolker-Nielsen T., Dingemans J., Ye L., Cornelis P. 2015. *Pseudomonas aeruginosa* LysR PA4203 regulator NmoR acts as a repressor of the PA4202 *nmoA* gene, encoding a nitronate monooxygenase. *Journal of Bacteriology* 197: 1026–1039.
- Vettoretti L., Plésiat P., Muller C., El Garch F., Phan G., Attrée I., Ducruix A., Llanes C. 2009. Efflux unbalance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53: 1987–1997.
- Visvalingam J., Hernandez-Doria J.D., Holley R.A. 2013. Examination of the genome-wide transcriptional response of *Escherichia coli* O157:H7 to cinnamaldehyde exposure. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 942–950.
- Visvalingam J., Palaniappan K., Holley R.A. 2017. *In vitro* enhancement of antibiotic susceptibility of drug resistant *Escherichia coli* by cinnamaldehyde. *Food Control* 79: 288–291.
- Voulgaridou G.-P., Anastopoulos I., Franco R., Panayiotidis M.I., Pappa A. 2011. DNA damage induced by endogenous aldehydes: Current state of knowledge. *Mutation Research* 711: 13–27.
- van Vuuren S.F., Suliman S., Viljoen A.M. 2009. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Letters in Applied Microbiology* 48: 440–446.

- Walker T.S., Bais H.P., Déziel E., Schweizer H.P., Rahme L.G., Fall R., Vivanco J.M. 2004. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. *Plant Physiology* 134: 320–331.
- Walsh D.J., Livinghouse T., Goeres D.M., Mettler M., Stewart P.S. 2019. Antimicrobial activity of naturally occurring phenols and derivatives against biofilm and planktonic bacteria. *Frontiers in Chemistry* 7.
- Wang, Seeve C., Pierson L.S., Pierson E.A. 2013. Transcriptome profiling reveals links between ParS/ParR, MexEF-OprN, and quorum sensing in the regulation of adaptation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC genomics* 14: 618.
- Wang Y., Zhou Z., Zhu J., Tang Y., Canady T.D., Chi E.Y., Schanze K.S., Whitten D.G. 2011. Dark antimicrobial mechanisms of cationic phenylene ethynylene polymers and oligomers against *Escherichia coli*. *Polymers* 3: 1199–1214.
- Weibel H., Hansen J. 1989. Penetration of the fragrance compounds, cinnamaldehyde and cinnamyl alcohol, through human skin *in vitro*. *Contact Dermatitis* 20: 167–172.
- Westfall L.W., Carty N.L., Layland N., Kuan P., Colmer-Hamood J.A., Hamood A.N. 2006. *mvaT* mutation modifies the expression of the *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux operon *mexEF-oprN*. *FEMS Microbiology Letters* 255: 247–254.
- Wilson W.W., Wade M.M., Holman S.C., Champlin F.R. 2001. Status of methods for assessing bacterial cell surface charge properties based on zeta potential measurements. *Journal of Microbiological Methods* 43: 153–164.
- Wińska K., Mączka W., Łyczko J., Grabarczyk M., Czubaszek A., Szumny A. 2019. Essential oils as antimicrobial agents—Myth or real alternative. *Molecules* 24.
- Winstanley C., O'Brien S., Brockhurst M.A. 2016. *Pseudomonas aeruginosa* evolutionary adaptation and diversification in cystic fibrosis chronic lung infections. *Trends in Microbiology* 24: 327–337.
- Wright G.D. 2003. Mechanisms of resistance to antibiotics. *Current Opinion in Chemical Biology* 7: 563–569.
- Wu M., Maier E., Benz R., Hancock R.E. 1999. Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38: 7235–7242.
- Yadav M.K., Chae S.-W., Im G.J., Chung J.-W., Song J.-J. 2015. Eugenol: A phyto-compound effective against methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical strain biofilms. *PLoS One* 10: e0119564.
- Yamamoto M., Ueda A., Kudo M., Matsuo Y., Fukushima J., Nakae T., Kaneko T., Ishigatsubo Y. 2009. Role of MexZ and PA5471 in transcriptional regulation of *mexXY* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 155: 3312–3321.
- Yeung A.T.Y., Bains M., Hancock R.E.W. 2011. The sensor kinase CbrA is a global regulator that modulates metabolism, virulence, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 193: 918–931.
- Yi B., Dalpke A.H., Boutin S. 2021. Changes in the cystic fibrosis airway microbiome in response to CFTR modulator therapy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 11: 548613.
- Zaika L.L. 1988. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination1. *Journal of Food Safety* 9: 97–118.
- Zamorano L., Moyà B., Juan C., Mulet X., Blázquez J., Oliver A. 2014. The *Pseudomonas aeruginosa* CreBC two-component system plays a major role in the response to β -

- lactams, fitness, biofilm growth, and global regulation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58: 5084–5095.
- Zaoui C., Overhage J., Löns D., Zimmermann A., Müsken M., Bielecki P., Pustelny C., Becker T., Nimitz M., Häussler S. 2012. An orphan sensor kinase controls quinolone signal production via MexT in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology* 83: 536–547.
- Zhang J., Sturla S., Lacroix C., Schwab C. 2018. Gut microbial glycerol metabolism as an endogenous acrolein source. *MBio* 9.
- Zheng T., Nolan E.M. 2014. Enterobactin-mediated delivery of β -lactam antibiotics enhances antibacterial activity against pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of the American Chemical Society* 136: 9677–9691.
- Zhou W., Wang Z., Mo H., Zhao Y., Li H., Zhang H., Hu L., Zhou X. 2019. Thymol mediates bactericidal activity against *Staphylococcus aureus* by targeting an aldo–keto reductase and consequent depletion of NADPH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67: 8382–8392.

8. Annexes

Involvement of the *Pseudomonas aeruginosa* MexAB–OprM efflux pump in the secretion of the metallophore pseudopaline

Nicolas Oswaldo Gomez¹ | Alexandre Tetard² | Laurent Ouerdane³ |
Clémentine Laffont⁴ | Catherine Brutesco⁴ | Geneviève Ball¹ | Ryszard Lobinski³ |
Yann Denis⁵ | Patrick Plésiat² | Catherine Llanes² | Pascal Arnoux⁴ | Romé Voulhoux¹ 

¹Laboratoire de Chimie Bactérienne (LCB) UMR7283, Institut de Microbiologie de la Méditerranée (IMM), CNRS, Aix-Marseille Université, Marseille, France

²Laboratoire de Bactériologie, UMR CNRS 6249 Chrono-Environnement, Faculté de Médecine-Pharmacie, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

³Université de Pau et des Pays de l'Adour, e2s UPPA, CNRS, IPREM-UMR5254, Hélioparc, Pau, France

⁴CEA, CNRS, Aix-Marseille Université, Institut de Biosciences et Biotechnologies d'Aix-Marseille, UMR, CEA Cadarache, Saint-Paul-lez-Durance, France

⁵CNRS, Aix-Marseille Université, Institut de Microbiologie de la Méditerranée (IMM), Marseille, France

Correspondence

Romé Voulhoux, Laboratoire de Chimie Bactérienne (LCB) UMR7283, Institut de Microbiologie de la Méditerranée (IMM), CNRS, Aix-Marseille Université, Marseille, France.

Email: voulhoux@imm.cnrs.fr

Funding information

Association Vaincre la Mucoviscidose, Grant/Award Number: 20160501495; Association Gregory Lemarchal, Grant/Award Number: 20160501495

Abstract

To overcome the metal restriction imposed by the host's nutritional immunity, pathogenic bacteria use high metal affinity molecules called metallophores. Metallophore-mediated metal uptake pathways necessitate complex cycles of synthesis, secretion, and recovery of the metallophore across the bacterial envelope. We recently discovered staphylopin and pseudopaline, two members of a new family of broad-spectrum metallophores important for bacterial survival during infections. Here, we are expanding the molecular understanding of the pseudopaline transport cycle across the diderm envelope of the Gram-negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. We first explored pseudopaline secretion by performing *in vivo* quantifications in various genetic backgrounds and revealed the specific involvement of the MexAB–OprM efflux pump in pseudopaline transport across the outer membrane. We then addressed the recovery part of the cycle by investigating the fate of the recaptured metal-loaded pseudopaline. To do so, we combined *in vitro* reconstitution experiments and *in vivo* phenotyping in absence of pseudopaline transporters to reveal the existence of a pseudopaline modification mechanism, possibly involved in the metal release following pseudopaline recovery. Overall, our data allowed us to provide an improved molecular model of secretion, recovery, and fate of this important metallophore by *P. aeruginosa*.

KEYWORDS

efflux pump, metallophore, MexAB–OprM, *Pseudomonas aeruginosa*, pseudopaline

1 | INTRODUCTION

The availability of a diversity of metals is essential to support a variety of essential biological functions and bacteria have evolved several mechanisms for their acquisition from environmental sources. For this purpose, bacteria deploy multiple systems that

govern both influx and efflux of transition metals allowing cells to maintain a meticulously regulated pool of metals in any circumstances. This is particularly relevant for pathogenic bacteria within a host, where the concentration of free metals is kept extremely low by the host's nutritional immunity framework, which has very likely evolved to limit the growth of microorganisms in infected tissues (Weinberg, 1975; Hood and Skaar, 2012). Under

such metal scarce conditions, the most common strategy used by pathogenic bacteria to import metals involves the synthesis and release of metallophores followed by the capture and import of the metal-metallophore complex (Johnstone and Nolan, 2015). Metallophores and their high metal affinity have also been reported as protecting against metal excess (Chaturvedi *et al.*, 2012; Robinson *et al.*, 2018). *Pseudomonas aeruginosa* is a versatile opportunistic human pathogen, well equipped for thriving in particularly metal limited environments (Gi *et al.*, 2015; Nguyen and Oglesby-Sherrouse, 2015). Indeed, this pathogen is able to survive under strong metal scarcity due to its ability to produce various metallophores. To date, our knowledge of the metallophore-mediated metal uptake capabilities of *P. aeruginosa* has been limited to two iron-specific siderophores, pyochelin, and pyoverdine (Schalk and Cunrath, 2016) and a recently discovered broad-spectrum metallophore named pseudopaline (Gi *et al.*, 2015; Lhospice *et al.*, 2017; Mastropasqua *et al.*, 2017; McFarlane and Lamb, 2017). Pseudopaline is distantly related to plant nicotianamine and belongs to the same opine-type broad-spectrum metallophore family as staphylopin and yersinopin synthesized by *Staphylococcus aureus* and *Yersinia pestis*, respectively (Ghssein *et al.*, 2016; McFarlane *et al.*, 2018; Laffont *et al.*, 2019). The *cntOLMI* genes of *P. aeruginosa* encode for the proteins involved in pseudopaline biosynthesis and transport (Lhospice *et al.*, 2017). They all cluster together in a single operon negatively regulated by zinc through the Zur repressor (Pederick *et al.*, 2015; Lhospice *et al.*, 2017). The first gene of the operon, *cntO* encodes for the OM component CntO, belonging to the TonB-Dependent Transporter (TBDT) family dedicated to pseudopaline recovery from the environment (Lhospice *et al.*, 2017; Mastropasqua *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019). The second and third genes of the operon, respectively *cntL* and *cntM*, encode the two cytoplasmic soluble enzymes CntL and CntM responsible for pseudopaline biosynthesis in a two steps process. The first step, in which CntL produces γ NA, a reaction intermediate presenting chemical homology with xNA (in staphylopin biosynthesis) and nicotianamine (NA) using S-adenosine methionine (SAM) and L-histidine as substrates, is followed by an NADH reductive condensation of the γ NA intermediate with a molecule of α -ketoglutarate (α KG), catalyzed by CntM to produce pseudopaline (Lhospice *et al.*, 2017; McFarlane and Lamb, 2017). The fourth gene of the *cnt* operon, *cntI*, encodes the IM protein CntI belonging to the EamA or drug/metabolite transporter (DMT) family involved in pseudopaline export from the cytoplasm to the periplasm after biosynthesis (Lhospice *et al.*, 2017).

CntI and CntO were shown to be essential for *P. aeruginosa* growth in Airway Mucus Secretion (AMS) (Gi *et al.*, 2015) and *P. aeruginosa*'s capacity to colonize mice (Mastropasqua *et al.*, 2017), respectively. Moreover, several transcriptomic analyses showed that *cnt* genes are up-regulated during lung infection (Palmer *et al.*, 2005; Son *et al.*, 2007). During chronic infection, polymorphisms within the promoter sequence of the *cnt* operon were reported, leading to an altered Zur binding site and less stringent repression (Hermansen *et al.*, 2018). Altogether, these pieces of information suggest that

the involvement of the Cnt machinery in zinc uptake in a scarce and chelated environment is crucial for *P. aeruginosa* survival during lung infections of cystic fibrosis patients.

Nonetheless, the complete pseudopaline export and recovery pathway remains to be fully elucidated. In particular, it remains unknown how pseudopaline crosses the OM to be released in the extracellular milieu. Several other metallophores rely on efflux pumps for their secretion through the OM including the pyoverdine with PvdRT-OpmQ in *P. aeruginosa* (Imperi *et al.*, 2009; Yeterian *et al.*, 2010) or enterobactin with the modular AcrAB-, AcrAD-, and MdtBC-TolC resistance-nodulation-division (RND) efflux pump in *Escherichia coli* (Bleuel *et al.*, 2005; Horiyama and Nishino, 2014). Multidrug efflux systems of the RND family are widespread among Gram-negative bacteria and catalyze the active efflux of a large diversity of molecules, including antibiotics, and thus significantly contribute to intrinsic and acquired resistance to these molecules (Li *et al.*, 2015). Despite their significance as determinants of antibiotic resistance, RND multidrug exporters also accommodate biocides, detergents (Poole, 2005), organic solvents (Ramos *et al.*, 2002), human or animal metabolic compounds such as bile salts (Thanassi *et al.*, 1997), toxic fatty acids (Shafer *et al.*, 1995), plant-derived antimicrobials like phytoalexins (Burse *et al.*, 2004), quorum-sensing effector molecules (Evans *et al.*, 1998), and virulence factors (Hirakata *et al.*, 2002).

In this study we are completing the understanding of the pseudopaline secretion pathway by demonstrating that, following its export across the IM by CntI, its translocation across the OM is accomplished by the tripartite RND efflux pump MexAB-OprM, thus revealing the existence of a two-step pseudopaline secretion system in *P. aeruginosa*. We have also observed that the impaired secretion of pseudopaline in absence of its dedicated efflux pump did not lead to pseudopaline accumulation, which contrasts with its cytoplasmic accumulation observed in the absence of the IM exporter. We are providing qualitative and quantitative experimental evidence supporting the existence of a pseudopaline modification mechanism. This yet unidentified pseudopaline modification mechanism could be involved in the physiological alteration of pseudopaline, possibly leading to the release of the metal after recovery of the metal-pseudopaline complex from the extracellular medium by CntO.

2 | RESULTS

2.1 | Pseudopaline is required for normal growth, biofilm formation, and full extracellular protease activity in minimal chelated media

Pseudopaline is essential for *P. aeruginosa* growth in Airway Mucus Secretion (AMS) and provides an advantage for mice colonization (Gi *et al.*, 2015; Mastropasqua *et al.*, 2017). Several transcriptomic approaches showed that the pseudopaline biosynthesis and transport machinery, encoded by the *cnt* operon, is upregulated by *P. aeruginosa* in the lungs of Cystic Fibrosis (CF) patients

(Palmer *et al.*, 2005; Son *et al.*, 2007). Similarly, growth in a minimal chelated medium (minimal succinate medium supplemented with 100 μ M EDTA, MCM) induces a significant expression of the *cnt* operon compared to the LB nutrient-rich medium (figure S1). We previously showed that pseudopaline was required for zinc uptake in MCM (Lhospice *et al.*, 2017). Altogether, these pieces of information indicate that during infection and growth in MCM, *P. aeruginosa* is starved for Zn, further validating MCM as a medium mimicking the host Zn shortage condition. In order to evaluate the implication of pseudopaline in physiological functions relevant for *P. aeruginosa*'s pathogenesis, we compared different fitness parameters between a wild type and a $\Delta cntL$ strain, deficient for pseudopaline biosynthesis, during growth in MCM. We have observed that both generation time and biofilm formation capacity are significantly affected in the $\Delta cntL$ strain in comparison with the wild type (Figure 1). We, therefore, suggest that the pseudopaline-dependent fitness phenotypes observed in MCM are also occurring during infection and therefore contribute to the pseudopaline requirement during infection. In addition to fitness deficiencies, we also observed a significant reduction in the global extracellular protease activity of the pseudopaline deficient strain (Figure 1C). Considering that around 6% of bacterial proteomes includes Zn metalloenzymes (Andreini *et al.*, 2006; Andreini *et al.*, 2008), involved in various cellular processes including translation, general metabolism or extracellular protease activities, we consider that the observed phenotypes are due to an impairment of Zn containing extracellular proteases. As a whole, these data indicate that several metalloenzymes important for infections rely on pseudopaline-mediated Zn uptake and justify the necessity of this metal uptake for *P. aeruginosa*'s fitness during lung infections occurring in cystic fibrosis patients. Therefore, any new additional information on the molecular mechanisms underlying this metal uptake pathway would be useful to understand it better and envisage its inactivation.

2.2 | Pseudopaline export across the bacterial OM is mediated by the MexAB–OprM efflux pump

We demonstrated elsewhere that pseudopaline was secreted in the medium during bacterial growth in MCM (Lhospice *et al.*, 2017). While pseudopaline is exported across the IM by CntI, the machinery involved in its export across the OM remains unknown. In a preliminary search for pseudopaline OM export candidates, we selected four relevant RND efflux pumps of *P. aeruginosa* which are known to accommodate a wide array of structurally unrelated antibacterial molecules, namely MexAB–OprM, MexCD–OprJ, MexEF–OprN, and MexXY/OprM (Poole, 2005). To test the possible involvement of the four selected efflux pumps in pseudopaline secretion, we measured and compared the extracellular pseudopaline levels in a set of PA14 cultures including a quadruple mutant strain lacking the four MexAB, CD, EF, and XY RND components, called PA14 Δ RNDs and additional control strains deficient in pseudopaline synthesis (PA14 $\Delta cntL$) or IM export (PA14 $\Delta cntI$) (Figure 2). The strains were grown in MCM and pseudopaline content was measured by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)–electrospray ionization mass spectrometry (ESI MS) in the culture supernatant. As already reported by Lhospice *et al.*, (Lhospice *et al.*, 2017), the PA14 $\Delta cntL$ strain lacking the CntI enzyme shows no detectable pseudopaline in the supernatant, while the PA14 $\Delta cntI$ strain lacking the pseudopaline IM exporter CntI displays a substantial 90% decrease of the extracellular pseudopaline content (Figure 2). Remarkably, the quadruple PA14 Δ RNDs mutant strain displays a similar major reduction of the extracellular pseudopaline content, thus, indicating a similar extent of impairment in pseudopaline secretion in absence of the four RND efflux pumps. Therefore, we conclude that at least one of the four RND components selected is involved in pseudopaline translocation through the OM. We then focused our investigations on MexAB–OprM since it is the major and the most ubiquitous, constitutively expressed, RND efflux pump of *P. aeruginosa*. We first tested the involvement of the

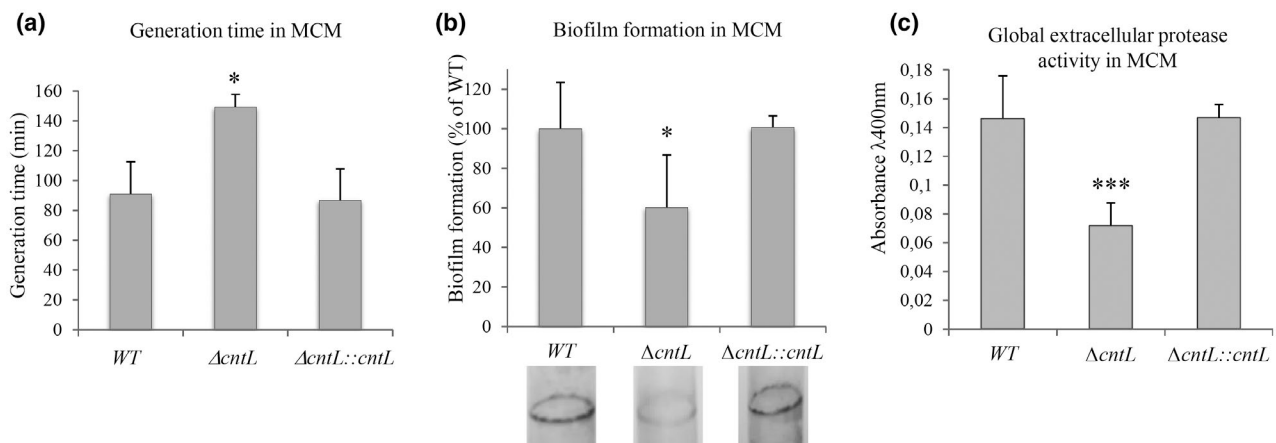


FIGURE 1 Impact of pseudopaline on generation time, biofilm formation capacity, and extracellular protease activity in MCM. PA14 wild-type (WT), mutant ($\Delta cntL$), and complemented ($\Delta cntL::cntL$) strains were grown in MCM. Generation time (a), biofilm formation capacity (b), and extracellular protease activity (c) were measured as described in the M&M section. A representative illustration of crystal violet rings obtained with the different strains during the biofilm formation assay is presented panel B. Errors bar, mean \pm standard deviation (sd) of at least two independent biological replicates. * $p < .05$, *** $p < .001$ as compared to the wild type (WT)

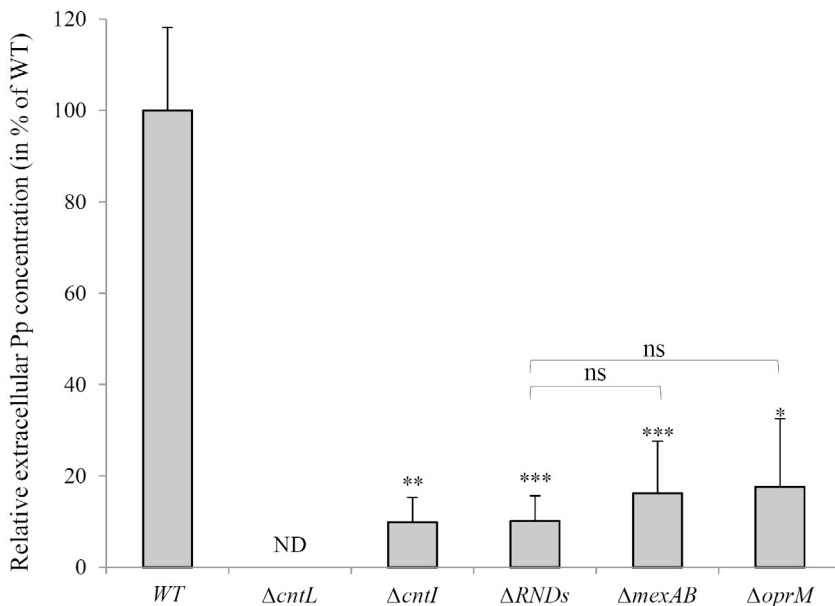


FIGURE 2 Extracellular pseudopaline content in absence of pseudopaline inner and outer membrane exporters. *P. aeruginosa* PA14 wild-type (WT) and mutant strains were grown for 10 h at 37°C in MCM. The relative levels of extracellular pseudopaline in the supernatant were measured by HILIC-ESI-MS. Errors bar, mean \pm SD of at least three independent biological replicates. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$, as compared to the WT; ND, not detectable; NS, not significant; Pp, pseudopaline

IM module of the pump, the MexAB RND component, by measuring extracellular pseudopaline content in the corresponding *mexAB* mutant strain (PA14 $\Delta mexAB$). This strain showed a comparable reduced pseudopaline content to the PA14 $\Delta cntI$ and PA14 $\Delta RNDs$ strains, indicating that the MexAB RND component of the tripartite efflux pump MexAB–OprM is required for pseudopaline secretion. To confirm the involvement of this RND efflux pump in pseudopaline secretion, we tested the contribution of its OM TolC-like component, OprM to the extracellular pseudopaline recovery. Data presented in Figure 2 indicate that, in the absence of OprM, pseudopaline secretion is impaired to the same extent than in the MexAB deficient strain. The similar impairment in pseudopaline secretion independently observed in strains lacking MexAB or OprM, known to form the tripartite MexAB–OprM RND efflux pump, revealed the involvement of this pump in pseudopaline secretion across the OM.

2.3 | The absence of pseudopaline OM exporter does not trigger intracellular pseudopaline accumulation

Pseudopaline is synthesized in the cytoplasm and then exported across the IM into the periplasm through CntI. Data presented in Figure 2 show that pseudopaline is taken in charge in the periplasm by the MexAB–OprM tripartite RND efflux pump to complete its secretion to the extracellular milieu; therefore, constituting the second step of the secretion process. As already noticed earlier and further confirmed by this study, the intracellular pseudopaline measurement in absence of its IM exporter CntI revealed an important cytoplasmic accumulation, which is associated with a toxic phenotype (Figure 3). We showed that this phenotype was a consequence of pseudopaline accumulation since it is suppressed in the double *cntL/cntI* mutant which does not produce pseudopaline (Figure 3B). In contrast, when pseudopaline OM export is impaired in strains lacking the MexAB

or the OprM component of the MexAB–OprM RND efflux pump involved in this process, we do not detect any cellular accumulation (Figure 3A) and do not observe any adverse effect on bacterial growth. (Figure 3B). Consequently, the combined secretion defect of a MexAB–OprM deficient strain without periplasmic accumulation suggests that the periplasm is a compartment that cannot accommodate pseudopaline accumulation. Two hypotheses, therefore, arise: (i) either there is a regulative effect with a negative feedback on pseudopaline synthesis or (ii) it exists specific periplasmic machinery preventing pseudopaline accumulation in this compartment.

2.4 | Absence of pseudopaline OM exporter does not affect *cnt* gene's expressions

The simultaneous decrease of the pseudopaline content in the supernatant of a PA14 $\Delta mexAB$ strain without a concomitant rise of pseudopaline's periplasmic content (Figures 2 and 3) raises the question of pseudopaline fate when it is not released in the milieu from the periplasm. In order to explore the hypothesis of a regulation mechanism of the *cnt* operon when RND efflux pumps are impaired, we examined the transcription level of the *cnt* operon in the different genetic backgrounds (Figure 4). We used qRT-PCR to measure the transcriptional level of *cntO* and *cntM* genes in the PA14, PA14 $\Delta cntI$, PA14 $\Delta mexAB$, and PA14 $\Delta RNDs$ strains after 10 h of growth at 37°C in MCM, a growth condition previously shown to induce pseudopaline production and secretion (figure S1). We found that the expressions of *cntO* and *cntM* genes of the *cnt* operon are not affected in the *cntI* mutant or in any RND efflux pump deletion combinations in comparison with the wild type. This allowed us to rule out the possibility of a negative feedback on the *cnt* genes expression when pseudopaline secretion is impaired. Moreover, the similar growth kinetics observed between the examined strains (figure S2), excludes the alternative possibility that the non-accumulation of pseudopaline

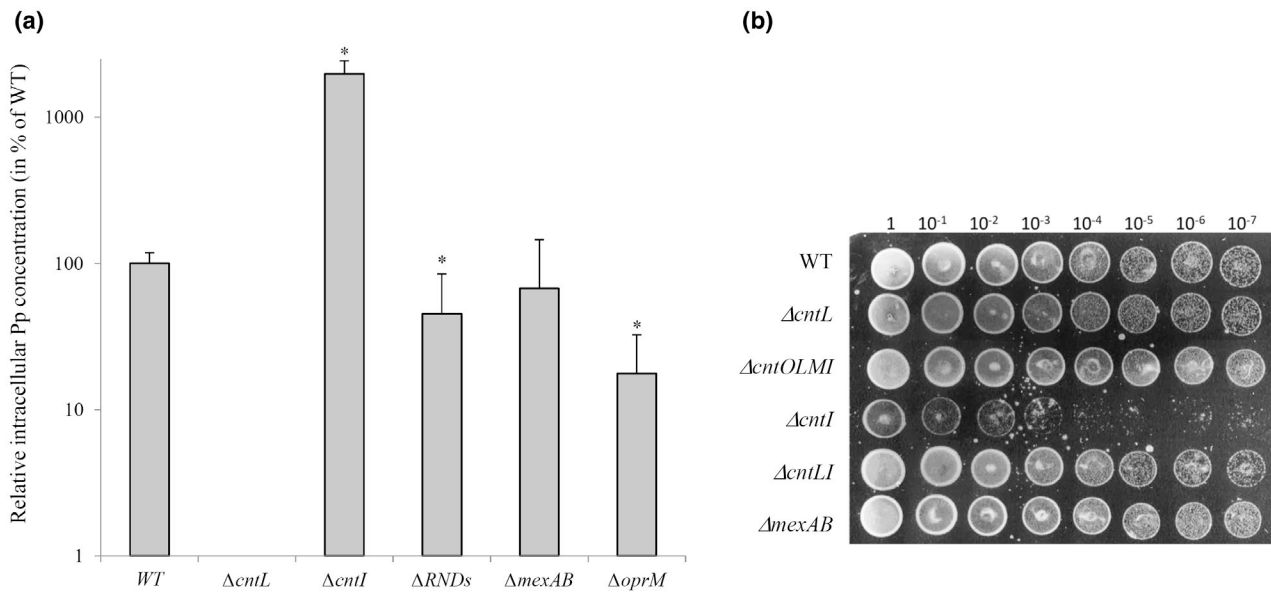


FIGURE 3 Intracellular pseudopaline content and phenotypes of *P. aeruginosa* PA14 strains lacking the pseudopaline inner and outer membrane exporters. (a) Detection of pseudopaline in the intracellular fractions of wild-type and mutant strains. Strains were grown for 10 h at 37°C in MCM. The relative levels of intracellular pseudopaline in the cell fraction were measured by HILIC–ESI-MS. Errors bar, mean \pm SD of at least three independent biological replicates. * $p < .05$ as compared to the wild type (WT); ND, not detectable. (b) Viability of PA14 WT and mutant strains assessed by serial dilutions spotted on 1.5% agar MCM plates

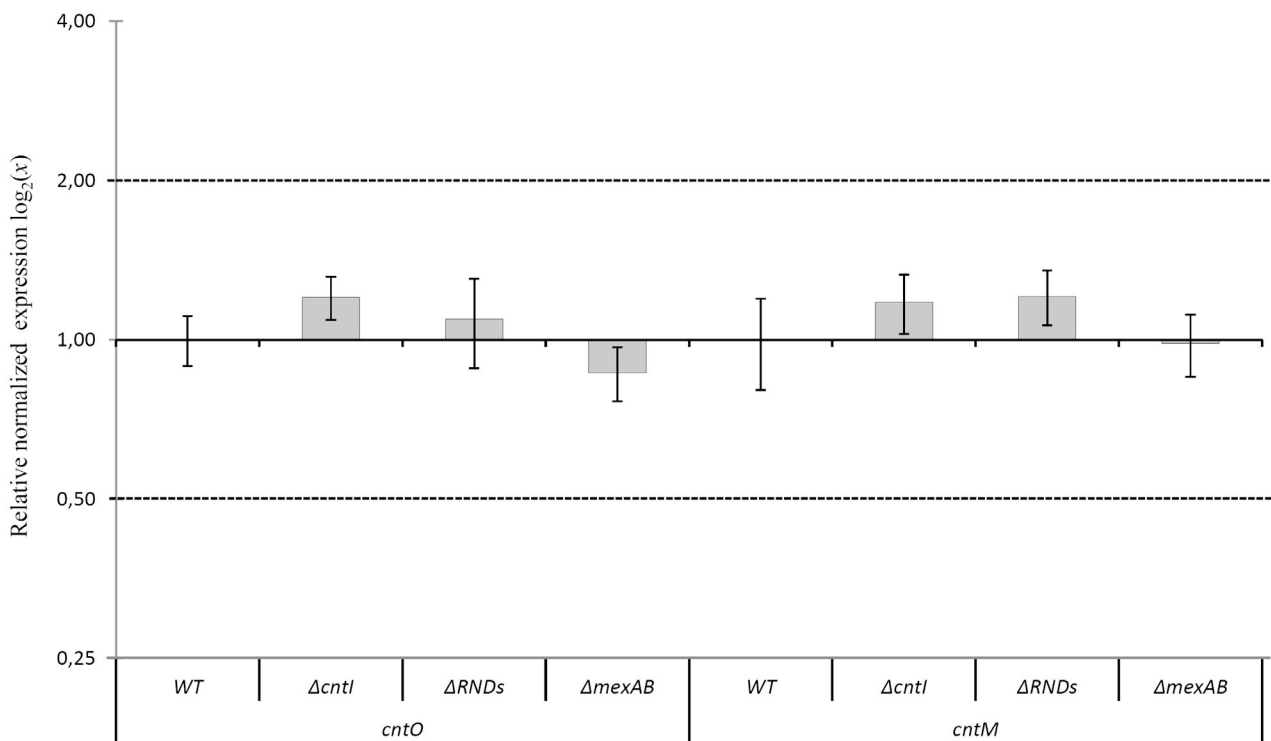


FIGURE 4 Expression of *cntO* and *cntM* genes in absence of pseudopaline inner and outer membrane exporters. Transcriptional activities were measured by qRT-PCR in PA14 wild-type (WT) and various mutant strains grown for 10 h at 37°C in MCM. The relative 16S RNA and *uvrD* normalized transcriptional expressions of *cntO* and *cntM* in various *cnt* and RNDs mutant strains compared to the WT strain is presented. The two dash lines indicate the up and down thresholds for a significant transcriptional effect. Experiments have been performed in three biological replicates each including three technical replicates

when its secretion was impaired was due to a growth defect of PA14 $\Delta mexAB$ and PA14 $\Delta RNDs$ strains. We, therefore, conclude that the pseudopaline production level is not affected by the deletion

of the genes involved in its export across the bacterial envelope and the lack of extracellular pseudopaline observed in absence of MexAB–OprM is truly due to a secretion defect.

2.5 | Evidence of an intracellular pseudopaline modification mechanism

Since we could not detect the periplasmic accumulation of pseudopaline when its export across the OM was impaired, we hypothesized that the non-secreted pseudopaline is either degraded or modified in the periplasm by a dedicated mechanism. To check this hypothesis, we took advantage of the reconstituted *in vitro* pseudopaline biosynthesis pathway previously developed (Lhospice *et al.*, 2017) to follow the fate of pseudopaline when exposed to PA14 cell lysates (Figure 5). We first used thin-layer chromatography (TLC) to separate and visualize the radiolabeled pathway intermediate yNA and pseudopaline when the radiolabeled substrate ^{14}C S-adenosyl-methionine (SAM) is incubated with defined substrate and enzymes (Figure 5A). We then followed by TLC the integrity of the *in vitro* synthesized radiolabeled pseudopaline upon incubation with various concentrations of PA14 WT cell lysate generated in MCM growth under *cnt* induction conditions. Data presented in Figure 5B reveal that the amount of radiolabeled pseudopaline gradually decreased upon the increasing amount of PA14 lysates, with a doubling of the band corresponding to pseudopaline (Figure 5B lines 5 to 7 and S3 lines 4, 5), which reflects the appearance of a modified form of pseudopaline. Since absent when PA14 lysate is incubated with ^{14}C -SAM

only (Figure 5B lines 1, 2), we exclude that this additional band derived from the non-specific degradation of the ^{14}C -SAM. Altogether, these data suggest the existence of a pseudopaline modification mechanism in the *P. aeruginosa* cellular soluble extracts. Importantly, no degradation was observed when a cell lysate of a PA14 strain grown in LB medium (known to repress *cnt* expression) is added to the reaction in the same proportions (Figure 5B lines 8, 9). This control experiment revealed that the pseudopaline modification mechanism is, like pseudopaline synthesis, induced under metal starvation, therefore, supporting its biological relevance.

In order to better characterize this mechanism, we designed and perform an additional *in vitro* quantitative mass spectrometry experiment, which consisted of measuring the amount of pseudopaline (synthesized *in vitro* using defined substrates and enzymes) recovered after incubation with PA14 lysates. Data presented in Figure 5C revealed that the amount of pseudopaline recovered after incubation with PA14 lysates generated in MCM-inducible conditions is seven times lower than the control amount recovered after incubation with PA14 lysates generated in *cnt*-repression conditions. This result confirms the qualitative TLC data and brings an additional quantitative dimension to the pseudopaline modification system.

Since pseudopaline accumulates in the cytoplasm in absence of IM exporter but does not accumulate in the periplasm in absence of

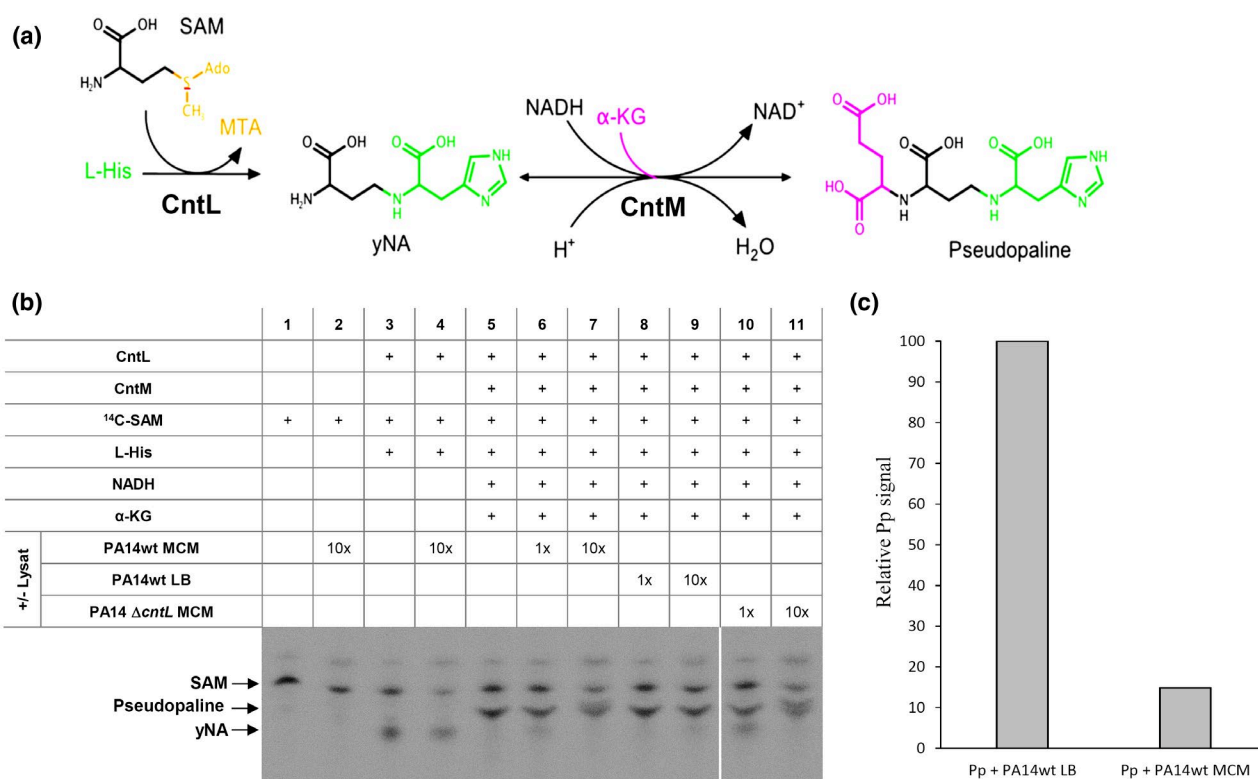


FIGURE 5 *In vitro* pseudopaline degradation by PA14 cell lysates. (a) Summary of the CntL/M-dependent biosynthesis pathway for the assembly of yNA and pseudopaline from L-his, SAM, NADPH and α -KG. (b) Thin-layer chromatography (TLC) separation of [^{14}C]-SAM (S-adenosyl methionine) and reaction products (yNA and pseudopaline) after 20 min incubation with defined enzymes, substrates, and cofactor, followed or not by a 20 min incubation with different concentrations of PA14 WT or PA14 $\Delta cntL$ cell lysates, either grown in MCM-inducible or in LB-repression conditions. (c) HILIC-MS/MS determination of remained pseudopaline (Pp) (relative Pp signal) after pseudopaline (enzymatically synthesized using defined enzymes and substrates) incubation with *P. aeruginosa* cell lysates (PA14 WT), either grown in LB or MCM

OM exporter, our observation suggests that the highlighted modification mechanism is restricted to the periplasmic compartment. Interestingly, the fact this modification is observed with both wild-type PA14, PA14 Δ cntL, and PA14 Δ mexAB lysates (figure S3 lines 4, 5; 6, 7 and 10, 11) suggests that this phenomenon is naturally occurring during pseudopaline machinery functioning, rather specifically induced upon pseudopaline accumulation in absence of its OM exporter. We, therefore, propose that this pseudopaline modification process also occurs under physiological conditions and is used for metal recovery from the pseudopaline-metal complex imported via the CntO outer membrane importer (see model, Figure 6).

2.6 | A model of pseudopaline secretion and recovery by *P. aeruginosa*

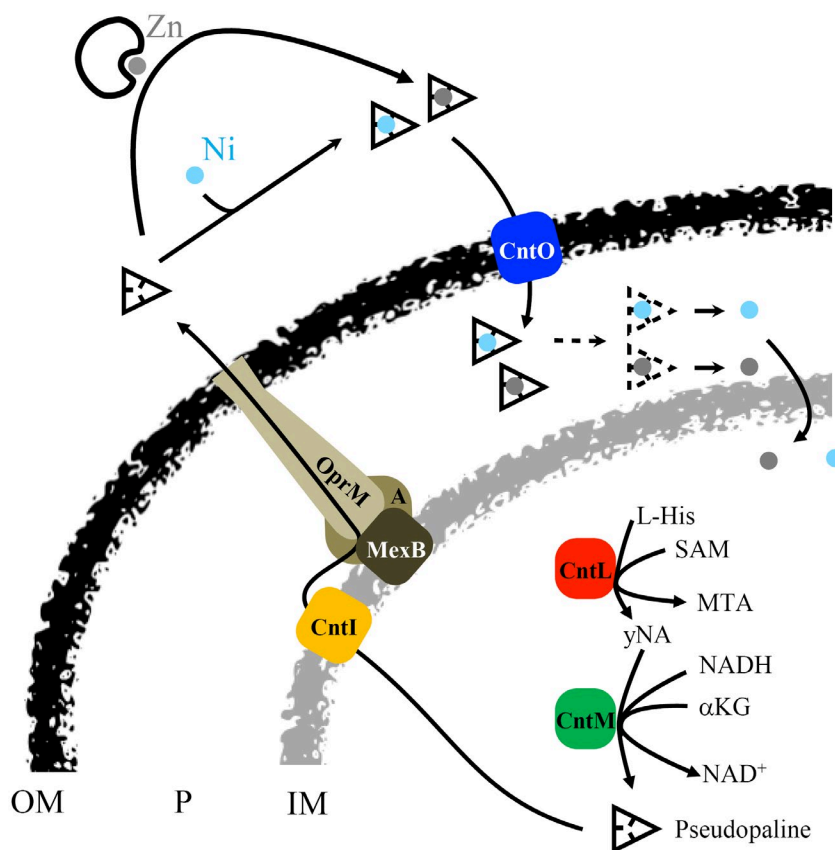
We described recently the metallophore pseudopaline, secreted by *P. aeruginosa*, and involved in zinc uptake under metal limiting conditions (Lhospice *et al.*, 2017). Owing to the data reported in this study on pseudopaline secretion and fate after recovery, we are now able to provide a detailed model of secretion and recovery of this important metallophore by *P. aeruginosa* (Figure 6). In this updated model, following the synthesis of pseudopaline in the cytoplasm by the CntL and CntM enzymes, the metallophore is then translocated into the periplasm through the CntI exporter. As demonstrated in this study, periplasmic pseudopaline uses the MexAB-OprM efflux pump for its final release in the extracellular milieu. MexAB-OprM,

therefore, constitutes, together with CntI, a two-step secretion system that exports pseudopaline from the site of its synthesis across the IM, periplasm and OM. Our data reveal the involvement of the MexAB-OprM efflux pump in the secretion of a natural compound made by the bacteria that may constitute one of its primary substrates. In the extracellular medium, pseudopaline binds Zn and Ni. It is then recognized by the OM TonB-dependent receptor CntO which allows its import into the periplasm. Additional results generated in this study strongly suggest the existence of a pseudopaline modification system involved in periplasmic pseudopaline homeostasis and possibly in metal liberation. The free metal will then be available to bacterial metalloproteins following its import into the cytoplasm by general importers such as ZnuA in the case of zinc (Pederick *et al.*, 2015).

3 | DISCUSSION

Pseudopaline is a metallophore synthesized and used by the opportunistic bacterial pathogen *P. aeruginosa* to recover metals from metal scarce environments. This metallophore plays an important role in bacterial survival during infection likely resulting from the lack of bio-available metals in the host. The pseudopaline metal uptake pathway utilizes a complex secretion and recovery cycle of the metallophore across the Gram-negative bacterial envelope. We showed previously that pseudopaline export across the inner membrane and import across the outer membrane is mediated by the CntI exporter

FIGURE 6 Model of pseudopaline synthesis, secretion, and metal uptake in *P. aeruginosa*. See text for details. Outer membrane (OM), periplasm (P), inner membrane (IM), L-histidine (L-His), S-adenosyl methionine (SAM), α -ketoglutarate (α -KG), and cofactor (NADH). The dashed triangle around pseudopaline symbolizes pseudopaline periplasmic degradation/modification



and the CntO TBDT, respectively, both encoded by the pseudopaline *cnt* operon together with the *cntL* and *cntM* biosynthetic genes. In this study, we are extending our previous characterization of the pseudopaline cycle by revealing the involvement of an RND efflux pump in this process. Our data demonstrate that the MexAB–OprM efflux pump is responsible for the final secretion step of the metallophore in the extracellular medium, therefore, filling an important gap in the pseudopaline cycle.

In the molecular mechanisms underlying pseudopaline secretion, MexAB–OprM forms together with CntI an unprecedented two-step secretion system that drives pseudopaline from the cytoplasm to the extracellular medium. The involvement of an efflux pump in the cellular release of a metallophore has already been reported but in combination with different IM exporters. The *E. coli* enterobactin is exported across the cytoplasmic membrane through the IM major-facilitator transporter EntS (Furrer *et al.*, 2002) and then exported across the OM from the periplasm through the OM channel TolC, an ortholog of the *P. aeruginosa* OprM (Bleuel *et al.*, 2005). Another example was reported in the closely related organism *Salmonella enterica* Sv Typhimurium where the salmochelin is exported to the medium through the IroC–TolC complex (Crouch *et al.*, 2008). This is also the case in *P. aeruginosa* where the siderophore pyoverdine is secreted through the PvdRT–OpmQ efflux pump (Imperi *et al.*, 2009; Yeterian *et al.*, 2010). Here we unravel an unprecedented combination involving an IM exporter belonging to the EamA or drug/metabolite transporter (DMT) family and the MexAB–OprM RND efflux pump and, therefore, extend the spectrum of efflux pump-associated two-step secretion systems involved in metallophores across Gram-negative envelopes. On the basis of structural and functional studies, it was previously described that the RND protein AcrB, a close homolog of the MexB protein, is a homotrimer acting as a peristaltic pump, able to load its substrate in the periplasmic compartment before secretion across the OM through the TolC channel (Tsutsumi *et al.*, 2019). However, whether efflux pump-dependent metallophores including pseudopaline are first exported to the periplasm, remains to be determined.

So far, MexAB–OprM efflux functions have mostly been dedicated to the release of exogenous toxic compounds such as antibiotics as well as a series of amphiphilic molecules, disinfectants, dyes, solvents or detergents (Li *et al.*, 2015). Additional data indicate that the MexAB–OprM efflux pump is also releasing non-permeable autoinducers involved in bacterial quorum sensing (Evans *et al.*, 1998; Pearson *et al.*, 1999). The present study highlights an additional function for the MexAB–OprM efflux pump in endogenous metallophore secretion. Such involvement of MexAB–OprM in the secretion of important small natural compounds has already been indirectly suggested following the observation that a *mexAB* mutant is unable to kill leukopenic mice, whereas the parent strain caused a fatal infection (Hirakata *et al.*, 2002). The finding that MexAB–OprM is essential for pseudopaline secretion, itself necessary to support *P. aeruginosa* growth in airway mucus secretions (Gi *et al.*, 2015) provides a possible additional explanation for the MexAB–OprM requirement in virulence.

While at least 12 different functional RND efflux pumps have been described in *P. aeruginosa*, our data reveal a specific recognition of pseudopaline by MexAB–OprM. The slight but not significant increase in extracellular pseudopaline recovery in the $\Delta mexAB$ or $\Delta oprM$ as compared to the ΔRND quadruple mutant (Figure 2) cannot, however, totally exclude a marginal contribution from another efflux pump to this process. In a recent study, Tsutsumi *et al.* revealed the structure of the complete MexAB–OprM complex in the presence or absence of drugs at near-atomic resolution and proposed precise mechanisms for substrate recognition and efflux supporting such specificity (Tsutsumi *et al.*, 2019). In addition, Ramaswamy *et al.* recently performed an exhaustive atomic-level comparison of the main putative effector recognition sites in the two RND modules MexB and MexY (Ramaswamy *et al.*, 2018). They pointed out specific signatures that may constitute selectivity filters such as mosaic-like lipophilic and electrostatic surfaces of the binding pockets of MexB and MexY proteins providing multifunctional binding sites for diverse substrates. Further structure–function investigations are necessary to understand MexB specificity toward pseudopaline. The question, whether the natural endogenous compound pseudopaline is recognized and exported in the same manner as the exogenous compounds, requires further investigations.

In contrast to pyoverdine (Imperi *et al.*, 2009; Yeterian *et al.*, 2010; Ramaswamy *et al.*, 2018) and enterobactin (Vega and Young, 2014), we observe neither subsequent accumulation, nor toxicity when pseudopaline export across the OM is impaired. We are providing experimental data, suggesting that the absence of pseudopaline accumulation in these conditions is due to pseudopaline modification by a dedicated and co-regulated modification system specific to *P. aeruginosa* which remains to be fully characterized. It is, however, important to note that, the HILIC–ESI–MS approach used to detect metal bound pseudopaline in cell or supernatant extracts is based on metal detection and is, therefore, unable to detect metal-free modified pseudopaline. Since no modified pseudopaline, naturally generated in the periplasm of a PA14 $\Delta mexAB$ or a PA14 $\Delta oprM$ mutant, could be detected by this technic (Figure 2 and related text), we consider that, if they exist, all modified variants of pseudopaline are metal-free, which also inform on one of the first pseudopaline modification steps probably consisting in metal liberation.

The presence and activity of the pseudopaline modification mechanism in other than abnormal pseudopaline periplasmic accumulation conditions, suggests a function for this machinery under physiological conditions in the wild-type bacteria. The absence of encoded specific machinery in the *cnt* operon to import the pseudopaline-metal complex through the IM into the cytoplasm (as found for example in the *cnt* operon in *S. aureus* and *Y. pestis* (Hajjar *et al.*, 2019)) is in line with the hypothesis of metal release from pseudopaline in the periplasm. We, therefore, propose that the pseudopaline-mediated metal import pathway ends in the periplasm, where the free metal will be distributed to various metalloproteases such as exoproteases that fold in the periplasm before secretion in the medium by the type II secretion system (Bleves *et al.*, 2010) or cytoplasmic metalloenzymes after metal transport

through pseudopaline-independent importers such as the Znu ABC transporter described for zinc import (Pederick *et al.*, 2015). Further experiments, out of the scope of this study, will be necessary to identify the determinants underlying pseudopaline's modification mechanism.

In the case of pyoverdine, it has been shown that this metallophore can bind and import in the periplasm a large array of metals with different affinities, (Hannauer *et al.*, 2012). In the same study, the authors demonstrated that the PvdRT-OpmQ machinery is involved in the secretion of unwanted siderophore-metal complexes, leading to specific integration of iron in the cellular pool. Therefore, we hypothesize that, similarly, MexAB-OprM could play a role in the selectivity of metals imported by pseudopaline. Investigation on this potential role would give an insight into the nature of metal physiologically targeted by this machinery. Indeed, if the import of zinc by pseudopaline is required for full extracellular metalloprotease activity (Figure 1), the physiological relevance underlying Ni and Co import by pseudopaline remains to be demonstrated.

Finally, other siderophores such as pyoverdine have been shown to be recycled (Greenwald *et al.*, 2007), and this could also be the case for pseudopaline. The absence of a recycling mechanism would lead to a constant production of pseudopaline during infection and would represent an important investment of cellular resources. More research is needed in order to determine whether the modification of pseudopaline we observed is reversible and allows recycling or, alternatively, whether pseudopaline is fully degraded after uptake.

4 | EXPERIMENTAL PROCEDURES

4.1 | Bacterial strains, plasmids, and liquid growth conditions

Bacterial strains, vectors, and plasmids used in this study are listed in Table 1. *E. coli* strains were grown aerobically with orbital shaking at 37°C in Luria-Broth (LB) with antibiotics as required (25 µg/ml of kanamycin (Kan), 25 µg/ml of tetracycline (Tc), 15 µg/ml of gentamicin (Gm), 30 µg/ml of streptomycin (Sm)). The *E. coli* strains CC118λpir and SM10 were used to propagate pKNG101 derivatives mutator plasmids. Recombinant plasmids were introduced into *P. aeruginosa* by triparental mating using pRK2013 and transconjugants selected on *Pseudomonas* isolation agar (PIA, Difco Laboratories) supplemented with antibiotics as required (500 µg/ml of carbenicillin (Cb), 150 µg/ml of Gm, 2000 µg/ml of Sm, 200 µg/ml of Tc). All *P. aeruginosa* strains used in this study were derivatives of the parental PA14 strain. *P. aeruginosa* strains were grown aerobically with horizontal shaking at 37°C with antibiotics as required (150 µg/ml of Cb, 50 µg/ml of Gm, 500 µg/ml of Sm, 50 µg/ml of Tc). Growths were performed rich LB medium and in minimal chelated medium (minimal succinate media (per liter: 30 g K₂HPO₄, 15 g KH₂PO₄, 5 g (NH₄)₂SO₄, 1 g MgSO₄, 20 g Succinic acid and 15.5 g NaOH, pH 7.0, MS) supplemented with 100 µM EDTA, MCM). MCM pre-culture of 20 ml were inoculated from fresh MCM, 1.5% agar plates, grown until late exponential phase in polycarbonate

Erlenmeyer flasks in order to avoid any metal contamination. Growth was monitored by OD₆₀₀ measurement.

4.2 | Plasmid constructions

All plasmids constructed in this study except pKNGΔ*oprM* were generated by the one-step sequence and ligation-independent cloning (SLIC) method described in (Jeong *et al.*, 2012). To construct the suicide plasmid pKNGΔ*oprM*, the Δ*oprM* fragment was cloned into plasmid pCR-Blunt according to manufacturer's instructions (Invitrogen) and then subcloned as BamHI/XbaI fragment into the suicide vector pKNG-101. All PCR primers employed for plasmid construction are listed in Table 2. Genomic DNA was isolated and purified with Pure Link genomic DNA Mini kit (Invitrogen). PCR reactions for cloning were performed by Q5® High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs, Inc (NEB) and all the products sequenced to verify the absence of any mutations (GATC-biotech).

4.3 | Construction of *P. aeruginosa* PA14 knock-out mutants

PA14Δ*oprM* was constructed from PA14 using overlapping PCRs with specific iPA14*mexOprM* primers described in Table 2. Homologous recombination was carried out between the 5' (512-bp) and 3' (539-bp) regions flanking *oprM* according to the protocol of (Kaniga *et al.*, 1991) modified by (Richardot *et al.*, 2015). The allelic exchange was verified by PCR and nucleotides sequencing experiments confirmed the deletion of 1415-bp in the *oprM* locus. To construct the pKNG101Δ*cntOLMI*, two DNA fragments corresponding to upstream and downstream regions of *cntO* and *cntI* were amplified from PA14 chromosomal DNA with PCR primers SL12/NG07 and NG08/SL22, respectively, Upstream (639-bp) and downstream (517-bp) regions were ligated by overlapping PCR and cloned into linearized pKNG101 by the SLIC method. The resulting constructs were transformed into *E. coli* CC118λpir and introduced into *P. aeruginosa* PA14 by conjugation. The strains in which the chromosomal integration event occurred were selected on *Pseudomonas* isolation agar Gm plates. Excision of the plasmid, resulting in the deletion of the chromosomal target gene was performed after selection on Luria-Bertani (LB) plates containing 6% sucrose. Clones that became sucrose resistant and Sm sensitive were confirmed to be deleted for the genes of interest by PCR analysis.

4.4 | Bacterial growth, generation time, biofilm formation, and extracellular protease activity measurements

Generation time in minutes defines the time required by the bacterium to perform one cycle of division. Generation time was calculated in the exponential phase from the growth curves of

Strains, vectors, and plasmids	Descriptions	References
<i>E. coli</i>		
CC118 λ pir	Δ (<i>ara-leu</i>) <i>araD</i> Δ <i>lacX74 galE galK phoA20 thi-1 rpsE rpoB argE</i> (Am) <i>recA1 RfR</i> (λ pir)	Kaniga <i>et al.</i> (1991)
SM10	<i>thi-1, thr, leu, lacY, supE, recA::RP4-2-Tc::Mu; Km^R</i>	Laboratory collection
K-12	MG1655 (<i>F</i> λ <i>mbda</i> <i>ilvG</i> ⁻ <i>rfb</i> 50 <i>rph</i> 1)	Laboratory collection
<i>P. aeruginosa</i>		
PA14	Wild type	Liberati <i>et al.</i> (2006)
PA14 Δ <i>cntL</i>	<i>cntL</i> (PA14_63940) deletion mutant	Lhospice <i>et al.</i> (2017)
PA14 Δ <i>cntL::cntL</i>	PA14 Δ <i>cntL</i> harboring a wild-type copy of <i>cntL</i> gene at <i>att</i>	Lhospice <i>et al.</i> (2017)
PA14 Δ <i>cntI</i>	<i>cntI</i> (PA14_63910) deletion mutant	Lhospice <i>et al.</i> (2017)
PA14 Δ <i>cntLI</i>	<i>cntL</i> & <i>cntI</i> deletion strain	Lhospice <i>et al.</i> (2017)
PA14 Δ <i>cntOLMI</i>	<i>cntO</i> (PA14_63960), <i>cntL</i> , <i>cntM</i> (PA14_63920) & <i>cntI</i> deletion strain	This work
PA14 Δ AB	<i>mexA</i> and <i>mexB</i> (PA14_05530 & PA14_05540) deletion mutant	Tetard <i>et al.</i> (2019)
PA14 Δ RNDs	<i>mexAB</i> , <i>mexCD-oprJ</i> , <i>mexEF-oprN</i> and <i>mexXY</i> deletion mutant	Tetard <i>et al.</i> (2019)
PA14 Δ <i>oprM</i>	<i>oprM</i> (PA14_05550) deletion mutant	This work
Vectors & plasmids		
pKNG101	Suicide vector <i>SmR</i> , <i>oriR6K</i> , <i>oriTRK2</i> , <i>mobRK2</i> , <i>sacBR</i> ⁺	Kaniga <i>et al.</i> (1991)
pKNG101 Δ <i>cntL</i>	Suicide plasmid for <i>cntL</i> deletion	Lhospice <i>et al.</i> (2017)
pKNG101 Δ <i>cntI</i>	Suicide plasmid for <i>cntI</i> deletion	Lhospice <i>et al.</i> (2017)
pKNG101 Δ <i>cntOLMI</i>	Suicide plasmid for <i>cnt</i> operon deletion	This work
pKNG101 Δ <i>oprM</i>	Suicide plasmid for <i>oprM</i> deletion	This work
pRK2013	Plasmid for triparental mating. <i>KmR</i> , <i>ColE1</i> , <i>Tra</i> + <i>Mob</i> ⁺	Figurski and Helinski (1979)
pET-TEV-Yp <i>cntL</i>	plasmid producing <i>CntL</i>	Synthetic DNA from GenScript
pET-TEV-Pm <i>cntM</i>	plasmid producing <i>CntM</i>	Laffont <i>et al.</i> (2019)

TABLE 1 Bacterial strains, vectors, and plasmids used in this study

three independent biological replicates. Each over-night cultures were inoculated at OD₆₀₀ of 0.05 in fresh MCM in polycarbonate Erlenmeyer flasks and grown aerobically with horizontal shaking at 37°C. Growth was recorded photospectrometrically at 600 nm until the late exponential phase. To follow bacterial growths, six independent biological replicates were recorded in clear, flat bottom, 96-well plates (Corning™ Costar 3596). Growth was recorded in a Tecan Spark Microplate Incubator/Reader (Thermo Fisher Scientific) for 10 hr at 37°C under continuous shaking and with 600 nm

absorbance readings every 15 min. All measures were corrected with the absorbance of non-inoculated media.

Biofilm formation was measured in the clear, flat bottom, 24-well plates (Corning™ Costar 3526). Each over-night cultures were inoculated at OD₆₀₀ of 0.2 in 1 ml of fresh MCM and incubated at 30°C for 24 hr. Following incubation, planktonic bacteria and media were rinsed away with non-sterile deionized water. The wells were filled with 0.1% crystal violet solution and sat for 15 min at RT and then washed with deionized water three times. Any crystal violet

Name	Sequence (5'-3')
NG1	CGGGCTGCAGGAATTCGGCTGGGCTGGTCGT
NG07	GTCGCGCCGGAGGCTCACATGGGAAATCGCACCAGAA
NG08	TTCTGGTGCATTTCCCATGTGAGCCTCCGGCGGACCGG
SL01	CAGGTCGACGGATCCCCGGGAAAAAGAAGAACGTGCTCACC
SL02	GGCCTTCTCCATGGCATGGCTTCTCTGGCG
SL03	GCCATGCCATGGAGAAGGCCGGTCGATGA
SL04	TATGCATCCGCGGGCCCGGAGGTAGACCCTGCGCTTGAC
SL05	CCTTCAAGCCCAACGGCGGT
SL06	ACCACAGCCGCCGCATGGCG
SL12	CAGGTCGACGGATCCCCGGGAAATGCAGCGGATCGAG
SL19	CAGGTCGACGGATCCCCGGGTCTACCCGGAGGGACCTATC
SL20	GGAGGCTCACTTCAGCAGGTCGAGCACCA
SL21	CTGCTGAAGTGAGCCTCCGGCGGACCGG
SL22	TATGCATCCGCGGGCCCGGGGCTGCTCTACAGCATCTCGAC
SL23	GACAGTTACCTGGACGTGGTC
SL24	CAAGCCTTTATCCGTTCCAA
iPA14 <i>mexOprM</i> -1	TACGAAAGCTGGTCGATTCC
iPA14 <i>mexOprM</i> -2	GCGATACCAGGAACGACAGCGGCTAC
iPA14 <i>mexOprM</i> -3	TTCTGTCTGATCGCCTCCGGCGCCATG
iPA14 <i>mexOprM</i> -4	ACTTCGACAATTCGGCAAC
qRT <i>cnt</i> OF	ACGAACTGATCCTGCGTAGC
qRT <i>cnt</i> OR	CGCCATTTCTCGTTGAACTC
qRT <i>cnt</i> MF	TACGTGCACAGTCCGTTCTT
qRT <i>cnt</i> MR	GCAACAGTTTCGCTCAGCTC
qRT16SF	CAGCTCGTGTCTGAGATGT
qRT16SR	GATCCGGACTACGATCGGTT
qRT <i>uvr</i> DF	CACGCCTCGCCCTACAGC
qRT <i>uvr</i> DR	GGATCTGGAAGTTCTGCTCAGC

TABLE 2 Oligonucleotides used in this study

staining on the bottom of the well was cleaned, and the plate was let to air-dry overnight at room temperature. Crystal violet rings were then solubilized in 30% glacial acetic acid. Adherent biofilm was quantified by measuring the optical density of all samples at 550 nm and normalized to WT mean absorbance. Photos used for biofilm illustration were made from biofilm experiments following the same method, but realized in borosilicate glass tubes for microbiological cultures.

Global extracellular protease activity: Pre-culture of PA14 strains are inoculated from a fresh 1.5% agar MCM plate, and incubated over day in 20 ml of MCM under horizontal shaking at 37°C. A 25 ml of culture of fresh MCM is then inoculated by the pre-culture at OD₆₀₀ of 0.05 and incubated for 10 hr under horizontal shaking at 37°C in polycarbonate baffled Erlenmeyer flask (Corning 431407). Culture was centrifuged at 13 000 ×g for 15 min at 4°C and supernatants were concentrated with Amicon Ultra-15 10000Da NMWL (Merk C7715) and normalized to cell density. Total extracellular proteolytic activity was determined using casein conjugated to an azo-dye as a substrate, following a modified procedure described by Kessler and

Safrin (2014). Briefly, 0.25 ml of concentrated and normalized supernatant was added to 0.75 ml of reaction buffer (0.05M Tris-HCl, 0.5 mM CaCl₂, pH 7.5, 3 mg/mL of Azocasein (Sigma A2765) pre-heated at 37°C and vortexed. The reaction mixture was incubated at 37°C for 15 min. The indigested substrate was precipitated by adding trichloroacetic acid to a final 3.3% and vortexed. The samples were then left at RT for 30 min and centrifuged at 10 000 ×g for 20 min. The absorbance was measured at 400 nm.

4.5 | Viability assay on a plate

Pre-culture of PA14 strains were performed overnight in MCM under horizontal shaking at 37°C. The next day, a culture of fresh MCM is inoculated by the pre-culture at OD₆₀₀ of 0.05 and incubated for 9 hr under horizontal shaking at 37°C. Cultures were then adjusted to OD₆₀₀ of 1 and subjected to 10% serial dilutions in fresh MCM. About 10 µl of culture samples were spotted on MS 1.5% agar or agarose plate and incubated 30h at 37°C.

4.6 | RNA preparation and reverse transcription

RNAs were prepared from 25 ml of PA14 cultures in LB or MCM in the exponential growth phase after 10 hr shaking at 37°C. The cells were harvested and frozen at -80°C. Total RNAs were isolated from the pellet using RNeasy mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions; an extra TURBO DNase (Invitrogen) digestion step was performed to eliminate the contaminating DNA. The RNA quality was assessed by the TapeStation 4200 system (Agilent). RNA was quantified spectrophotometrically at 260 nm (NanoDrop 1000; Thermo Fisher Scientific). For cDNA synthesis, 1 µg total RNA and 0.5 µg random primers (Promega) were used with the GoScript™ Reverse transcriptase (Promega) according to the manufacturer's instruction.

4.7 | Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

qRT-PCR analyses were performed on a CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, France). The reaction volume was 15 µl and the final concentration of each primer was 0.5 µM. The cycling parameters of the qRT-PCR were 98°C for 2 min, followed by 45 cycles of 98°C for 5 s, 60°C for 10 s. A final melting curve from 65°C to 95°C was added to check the specificity of the amplification. To determine the amplification kinetics of each product, the fluorescence derived from the incorporation of EvaGreen into the double-stranded PCR products was measured at the end of each cycle using the SsoFast EvaGreen Supermix 2X Kit (Bio-Rad). The results were analyzed using Bio-Rad CFX Manager software, version 3.1 (Bio-Rad). The *16S RNA* and *uvrD* genes were used as a reference for normalizations. For each point, a technical duplicate was performed. The amplification efficiencies for each primer pairs were comprised between 80% and 100%. All of the primer pairs used for qRT-PCR are shown in Table 2.

4.8 | Pseudopaline detection by HILIC-ESI-MS

All the *P. aeruginosa* strains were grown aerobically with horizontal shaking at 37°C in freshly made MCM. Cultures were then adjusted at OD = 0.05 in 25 ml of freshly made MCM and grown for 10 hr. After 10 hr, OD₆₀₀ was measured before cells were harvested by centrifugation (4 000 ×g, 30 min, 4°C). The supernatant was collected, filtered, and stored at -80°C. The pellet was washed three times with cold MCM and resuspended in 1.3 ml of cold MCM. OD₆₀₀ was measured and cells ruptured by successive sonication cycles (three times 30 s at 60% of maximal power, keeping the solution cold (Branson Sonifier 450 microtip)). The lysates were then centrifuged at 16 000 ×g for 30 min at 4°C and supernatants were collected, filtered at 0.22 µm, and stored at -80°C. These cell lysate and supernatant fractions were analyzed to detect pseudopaline using HILIC/ESI-MS as previously described (Lhospice *et al.*, 2017). Pseudopaline levels were determined using the relative intensity of the m/z corresponding to the pseudopaline-Ni complex in

extracellular or intracellular fractions saturated with nickel, in order to force nickel complex formation.

4.9 | In vitro pseudopaline modification monitoring by thin-layer chromatography (TLC)

Preparation of *P. aeruginosa* cell lysates. Pre-culture of PA14 strains are inoculated from a fresh MS or LB + 1.5% agar plate, and incubated over-day in 20 ml of MS medium under horizontal shaking at 37°C. The culture is then adjusted at OD₆₀₀ = 0.05 with 100 ml of fresh MCM or LB medium and incubated for 10 hr under horizontal shaking at 37°C. An aliquot corresponding to 100 OD₆₀₀ units of each bacterial culture was centrifuged for 10 min at 4 000 ×g. Cell pellets were resuspended in 10 ml of 100 mM Ammonium Acetate pH 7 and ruptured by successive sonication cycles (three times 30 s at 60% of maximal power, keeping the solution cold (Branson Sonifier 450 microtip)). The final lysate was centrifuged at 4 000 ×g for 15 min to remove unbroken cells and the supernatant was saved as total cell lysate fraction.

Radiolabeled yNA and pseudopaline are first produced with the reaction of the purified enzymes CntL (for yNA) or a mixture of CntL and CntM (for pseudopaline) with their substrates and then incubated with cell lysates. For the pseudopaline production reaction, we used CntL from *P. aeruginosa* (PaCntL) or *Yersinia pestis* (YpCntL) and CntM from *Paenibacillus mucilaginosus* (PmCntM) that have been shown to be more stable and effective than their equivalent from *Pseudomonas aeruginosa* (Laffont *et al.*, 2019). Cloning, expression, and purification of PmCntM have already been described (Laffont *et al.*, 2019). For YpCntL, the gene encoding the YpCntL protein was cloned in a pET-TEV plasmid (synthetic DNA from GenScript). After transformation, *E. coli* BL21 strains are aerobically cultivated with horizontal shaking in LB media supplemented with kanamycin at 50 µg/ml. These strains were grown at 37°C and, when the OD of the culture was ~0.6, IPTG was added at a final concentration of 0.1 mM for induction. After overnight growth at 16°C, cells were recovered by centrifugation at 5 000 ×g for 20 min at 4°C, resuspended in buffer (20 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, 15 mM Imidazole, pH 7) and disrupted using a Constant cell disruption system operating at 2 Kbar. Cell debris was removed by centrifugation at 8 000 ×g for 20 min and the supernatants were centrifuged at 100 000 ×g for 45 min at 4°C to remove cell wall debris and membrane proteins. The resulting soluble fraction was loaded on a nickel affinity column (HisTrap 1 ml column, G.E. Healthcare), and the protein was eluted stepwise with imidazole (50 mM for wash and 500 mM for elution). Elution fraction was adjusted to 1 mg/ml and cleaved by TEV protease in a ratio 1:80 w/w. After overnight incubation, the mixture was centrifuged at 10 000 ×g for 10 min and then loaded again on a nickel affinity column. YpCntL was recovered in the flow-through and then transferred into an imidazole-free buffer (20 mM Na₂HPO₄, 300 mM NaCl, glycerol 10%, pH 7).

For the TLC assays, the purified enzymes are incubated at a final concentration of 2.5 µM with carboxyl-[¹⁴C]-labeled SAM (2.5 µM),

L-histidine (10 μ M), NADPH (30 μ M), and α -KG (1 mM). The total volume was 100 μ l in ammonium acetate buffer (100 mM, pH = 7). The mixtures are incubated for 10 or 20 min at 28°C. Cell lysates at 10 mg/mL (1X) or 100 mg/mL (10X) (concentrated using 3kDa cut-off concentrators) are then added to the radiolabeled pseudopaline (50% of each, v/v), and these mixtures are incubated for another 20 or 45 min at 28°C. The same reaction is performed with the addition of only ammonium acetate buffer in the radiolabeled pseudopaline as a control. The reactions are finally stopped by adding ethanol to a final concentration of 50% (v/v). An aliquot of 10 μ l of the reaction mixtures is spotted on HPTLC (High-Performance TLC) Silica Gel 60 Glass Plates (Merck KGaA) after centrifugation at 16 000 \times g for 2 min. The products are then separated by thin-layer chromatography by developing plate with a phenol:n-butanol:formate:water (12:3: 2:3 v/v) solvent system. HPTLC plates were dried and exposed to a [¹⁴C]-sensitive imaging plate for 5 or 6 days. Imaging plates are then scanned on a Typhoon FLA 7,000 phosphorimager (GE Healthcare).

4.10 | In vitro quantitative pseudopaline measurement following incubation with PA14 cell lysates

PA14 cell lysates and pseudopaline mixture are produced following the procedure used for TLC experiments except that carboxyl-¹⁴C-labeled SAM is replaced by regular SAM in order to produce non-radioactive pseudopaline mixture (SAM, L-His and NADPH 300 μ M, α -KG 1 mM, CntL 25 μ M, CntM 20 μ M, final concentration of pseudopaline after total reaction is estimated to be 300 μ M). About 25 μ l of pseudopaline mixture is incubated for 30 min at 28°C with 100 μ l of 10 \times concentrated PA14 cell lysates generated in inducing (MCM) or repressing (LB) conditions. The reaction mixtures are filtered through a 3kDa cut-off concentrator (Millipore UFC5003) and the filtrates are subjected to pseudopaline quantification by HILIC-ESI-MS following the procedure presented in the "Pseudopaline detection by HILIC-ESI-MS" M&M section.

4.11 | Statistics

Statistics were determined using the Student's t-test function of excel using a bilateral model and assuming equal variance when the distribution of samples had normal distribution (Figure 1). For non-parametric data (Figures 2 and 3), a statistical significance was calculated using the Wilcoxon rank sum test.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully thank V. Pelicic, S. Lory, I. Broutin, and J.F. Collet for careful reading of the Manuscript. We also thank the whole RV group for constant support in the project. This work was supported by the grant 20160501495 from "Vaincre la Mucoviscidose" and "Gregory Lemarchal" associations allocated to RV, PA, and PP.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceive the experiments: Voulhoux, Arnoux, Plésiat, Ouerdane
Perform, analyze, and interpret the experiments: Gomez, Tetard, Ouerdane, Laffont, Brutesco, Ball, Denis, Lobinski Plésiat, Llanes, Arnoux, Voulhoux
Write the paper: Gomez, Voulhoux

ORCID

Romé Voulhoux  <https://orcid.org/0000-0002-5258-5958>

REFERENCES

- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I. and Rosato, A. (2006) Zinc through the three domains of life. *Journal of Proteome Research*, 5, 3173–3178.
- Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G.L. and Thornton, J.M. (2008) Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13, 1205–1218.
- Bleuel, C., Grosse, C., Taudte, N., Scherer, J., Wesenberg, D., Krauss, G.J., et al. (2005) TolC is involved in enterobactin efflux across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 187, 6701–6707.
- Bleves, S., Viarre, V., Salacha, R., Michel, G.P., Filloux, A. and Voulhoux, R. (2010) Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. *International Journal of Medical Microbiology*, 300, 534–543.
- Burse, A., Weingart, H. and Ullrich, M.S. (2004) The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17, 43–54.
- Chaturvedi, K.S., Hung, C.S., Crowley, J.R., Stapleton, A.E. and Henderson, J.P. (2012) The siderophore yersiniabactin binds copper to protect pathogens during infection. *Nature Chemical Biology*, 8, 731–736.
- Crouch, M.L., Castor, M., Karlinsey, J.E., Kalhorn, T. and Fang, F.C. (2008) Biosynthesis and IroC-dependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 67, 971–983.
- 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*. *Journal of Bacteriology*, 180, 5443–5447.
- Figurski, D.H. and Helinski, D.R. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76, 1648–1652.
- Furrer, J.L., Sanders, D.N., Hook-Barnard, I.G. and McIntosh, M.A. (2002) Export of the siderophore enterobactin in *Escherichia coli*: Involvement of a 43 kDa membrane exporter. *Molecular Microbiology*, 44, 1225–1234.
- Ghssein, G., Brutesco, C., Ouerdane, L., Fojcik, C., Izaute, A., Wang, S., et al. (2016) Biosynthesis of a broad-spectrum nicotianamine-like metallophore in *Staphylococcus aureus*. *Science*, 352, 1105–1109.
- Gi, M., Lee, K.M., Kim, S.C., Yoon, J.H., Yoon, S.S. and Choi, J.Y. (2015) A novel siderophore system is essential for the growth of *Pseudomonas aeruginosa* in airway mucus. *Scientific Reports*, 5, 14644.
- Greenwald, J., Hoegy, F., Nader, M., Journet, L., Mislin, G.L., Graumann, P.L., et al. (2007) Real time fluorescent resonance energy transfer

- visualization of ferric pyoverdine uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. A role for ferrous iron. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 2987–2995.
- Hajjar, C., Fanelli, R., Laffont, C., Brutesco, C., Cullia, G., Tribout, M., et al. (2019) Control by metals of staphylopin dehydrogenase activity during metallophore biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 141, 5555–5562.
- Hannauer, M., Braud, A., Hoegy, F., Ronot, P., Boos, A. and Schalk, I.J. (2012) The PvdRT-OpmQ efflux pump controls the metal selectivity of the iron uptake pathway mediated by the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 14, 1696–1708.
- Hermansen, G.M.M., Hansen, M.L., Khademi, S.M.H. and Jelsbak, L. (2018) Intergenic evolution during host adaptation increases expression of the metallophore pseudopaline in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 164, 1038–1047.
- Hirakata, Y., Srikumar, R., Poole, K., Gotoh, N., Suematsu, T., Kohno, S., et al. (2002) Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Experimental Medicine*, 196, 109–118.
- Hood, M.I. and Skaar, E.P. (2012) Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nature Reviews Microbiology*, 10, 525–537.
- Horiyama, T. and Nishino, K. (2014) AcrB, AcrD, and MdtABC multidrug efflux systems are involved in enterobactin export in *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 9, e108642.
- 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.
- Jeong, J.Y., Yim, H.S., Ryu, J.Y., Lee, H.S., Lee, J.H., Seen, D.S., et al. (2012) One-step sequence- and ligation-independent cloning as a rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 5440–5443.
- Johnstone, T.C. and Nolan, E.M. (2015) Beyond iron: Non-classical biological functions of bacterial siderophores. *Dalton Transactions*, 44, 6320–6339.
- 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.
- Kessler, E. and Safrin, M. (2014) Elastolytic and proteolytic enzymes. *Methods in Molecular Biology*, 1149, 135–169.
- Laffont, C., Brutesco, C., Hajjar, C., Cullia, G., Fanelli, R., Ouerdane, L., et al. (2019) Simple rules govern the diversity of bacterial nicotianamine-like metallophores. *The Biochemical Journal*, 476, 2221–2233.
- Lhospace, S., Gomez, N.O., Ouerdane, L., Brutesco, C., Ghsssein, G., Hajjar, C., et al. (2017) *Pseudomonas aeruginosa* zinc uptake in chelating environment is primarily mediated by the metallophore pseudopaline. *Scientific Reports*, 7, 17132.
- Li, X.Z., Plesiat, P. and Nikaido, H. (2015) The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 28, 337–418.
- Liberati, N.T., Urbach, J.M., Miyata, S., Lee, D.G., Drenkard, E., Wu, G., et al. (2006) An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 2833–2838.
- Mastropasqua, M.C., D'Orazio, M., Cerasi, M., Pacello, F., Gismondi, A., Canini, A., et al. (2017) Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in zinc poor environments is promoted by a nicotianamine-related metallophore. *Molecular Microbiology*, 106, 543–561.
- McFarlane, J.S., Davis, C.L., and Lamb, A.L. (2018) Staphylopin, pseudopaline, and yersinopine dehydrogenases: A structural and kinetic analysis of a new functional class of opine dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*, 293, 8009–8019.
- McFarlane, J.S. and Lamb, A.L. (2017) Biosynthesis of an opine metallophore by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, 56, 5967–5971.
- Nguyen, A.T. and Oglesby-Sherrouse, A.G. (2015) Spoils of war: Iron at the crux of clinical and ecological fitness of *Pseudomonas aeruginosa*. *BioMetals*, 28, 433–443.
- Palmer, K.L., Mashburn, L.M., Singh, P.K. and Whiteley, M. (2005) Cystic fibrosis sputum supports growth and cues key aspects of *Pseudomonas aeruginosa* physiology. *Journal of Bacteriology*, 187, 5267–5277.
- Pearson, J.P., Van Delden, C. and Iglewski, B.H. (1999) Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *Journal of Bacteriology*, 181, 1203–1210.
- Pederick, V.G., Eijkelkamp, B.A., Begg, S.L., Ween, M.P., McAllister, L.J., Paton, J.C., et al. (2015) ZnuA and zinc homeostasis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, 5, 13139.
- Poole, K. (2005) Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 20–51.
- 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*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1144.
- Ramos, J.L., Duque, E., Gallegos, M.T., Godoy, P., Ramos-Gonzalez, M.I., Rojas, A., et al. (2002) Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 56, 743–768.
- Richardot, C., Plesiat, 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. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 45, 529–532.
- Robinson, A.E., Lowe, J.E., Koh, E.I. and Henderson, J.P. (2018) Uropathogenic enterobacteria use the yersiniabactin metallophore system to acquire nickel. *Journal of Biological Chemistry*, 293, 14953–14961.
- Schalk, I.J. and Cunrath, O. (2016) An overview of the biological metal uptake pathways in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology*, 18, 3227–3246.
- Shafer, W.M., Balthazar, J.T., Hagman, K.E. and Morse, S.A. (1995) Missense mutations that alter the DNA-binding domain of the MtrR protein occur frequently in rectal isolates of *Neisseria gonorrhoeae* that are resistant to faecal lipids. *Microbiology*, 141(Pt 4), 907–911.
- Son, M.S., Matthews, W.J. Jr, Kang, Y., Nguyen, D.T. and Hoang, T.T. (2007) In vivo evidence of *Pseudomonas aeruginosa* nutrient acquisition and pathogenesis in the lungs of cystic fibrosis patients. *Infection and Immunity*, 75, 5313–5324.
- Tetard, A., Zedet, A., Girard, C., Plesiat, P. and Llanes, C. (2019) Cinnamaldehyde induces expression of efflux pumps and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(10), e01081–e1119.
- Thanassi, D.G., Cheng, L.W. and Nikaido, H. (1997) Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 179, 2512–2518.
- Tsutsumi, K., Yonehara, R., Ishizaka-Ikeda, E., Miyazaki, N., Maeda, S., Iwasaki, K., et al. (2019) Structures of the wild-type MexAB-OprM tripartite pump reveal its complex formation and drug efflux mechanism. *Nature Communications*, 10, 1520.
- Vega, D.E. and Young, K.D. (2014) Accumulation of periplasmic enterobactin impairs the growth and morphology of *Escherichia coli* tolC mutants. *Molecular Microbiology*, 91, 508–521.
- Weinberg, E.D. (1975) Nutritional immunity. Host's attempt to withhold iron from microbial invaders. *JAMA*, 231, 39–41.
- Yeterian, E., Martin, L.W., Guillon, L., Journet, L., Lamont, I.L. and Schalk, I.J. (2010) Synthesis of the siderophore pyoverdine in *Pseudomonas aeruginosa* involves a periplasmic maturation. *Amino Acids*, 38, 1447–1459.

Zhang, J., Zhao, T., Yang, R., Siridechakorn, I., Wang, S., Guo, Q., *et al.* (2019) De novo synthesis, structural assignment and biological evaluation of pseudopaline, a metallophore produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem Sci*, 10, 6635–6641.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Gomez NO, Tetard A, Ouerdane L, *et al.* Involvement of the *Pseudomonas aeruginosa* MexAB-OprM efflux pump in the secretion of the metallophore pseudopaline. *Mol Microbiol.* 2020;00:1–15.
<https://doi.org/10.1111/mmi.14600>



Titre : Induction de la résistance aux antibiotiques chez la bactérie *Pseudomonas aeruginosa* par les molécules électrophiles.

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa*, résistance aux antibiotiques, huiles essentielles

Résumé : *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie pathogène opportuniste de l'Homme qui, en raison de sa capacité à résister aux antibiotiques, pose un réel problème de santé publique. L'utilisation de thérapeutiques alternatives telles que les huiles essentielles (HEs) étant plébiscitée par les patients, nous avons cherché à comprendre quel pouvait être l'impact de ces composés sur la résistance aux antibiotiques en ciblant deux molécules électrophiles naturelles : le cinnamaldéhyde (CNA) et le citral. Nous avons pu ainsi démontrer que le CNA, bien qu'ayant une activité bactéricide sur la bactérie *P. aeruginosa*, induit à des concentrations subinhibitrices, la surproduction fugace de certains systèmes d'efflux conduisant à la résistance à de nombreux antibiotiques utilisés de pompes d'efflux pouvant augmenter jusqu'à 8-fois les niveaux de résistance à de nom-

en clinique (β -lactamines, aminosides, fluoroquinolones et colistine). De plus, le traitement prolongé de *P. aeruginosa* avec du CNA provoque des mutations conduisant à une résistance constitutive à ces mêmes antibiotiques. Le citral quant à lui, bien que peu toxique pour la bactérie, induit également la surproduction systèmes d'efflux ; de plus, par sa fonction aldéhyde, il réagit spontanément avec les antibiotiques aminés (aminosides et colistine) créant des complexes totalement inactifs. Ces résultats montrent le manque de connaissances sur l'activité de ces molécules naturelles lorsqu'elles sont utilisées en combinaison avec les antibiotiques et incitent à formuler des recommandations sur leur usage.

Title: Induction of antibiotics resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by electrophilic compound.

Keys words: *Pseudomonas aeruginosa*, antibiotic resistance, essentials oils

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogenic bacterium which poses a real public health problem due to its ability to resist antibiotics. The use of alternative therapies such as essential oils (EOs) being popular with patients, we sought to understand what is the impact of these compounds on antibiotic resistance. We use two natural electrophilic molecules: cinnamaldehyde (CNA) and citral. We were thus able to demonstrate that the CNA, although having a bactericidal activity on the bacterium *P. aeruginosa*, induces at subinhibitory concentrations, the overproduction of certain efflux systems leading to resistance to many antibiotics used in clinically field (β -lactams, aminoglycosides, fluoroquinolones and colistin).

In addition, prolonged treatment of *P. aeruginosa* with CNA causes mutations leading to constitutive resistance to these same antibiotics. Citral meanwhile, although not very toxic to bacteria, also induces overproduction of efflux systems; moreover, by its aldehyde function, it reacts spontaneously with amino antibiotics (aminoglycosides and colistin) creating completely inactive complexes. These results show the lack of knowledge about the activity of these natural molecules when used in combination with antibiotics and encourage recommendations on their use.