



Caractérisation de variants ADC et de mécanismes impliqués dans la résistance au céfidérocol et aux carbapénèmes chez *Acinetobacter baumannii*

Susie Gaillot

► To cite this version:

Susie Gaillot. Caractérisation de variants ADC et de mécanismes impliqués dans la résistance au céfidérocol et aux carbapénèmes chez *Acinetobacter baumannii*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Bourgogne Franche-Comté, 2023. Français. ⟨NNT : 2023UBFCE022⟩. ⟨tel-04860605⟩

HAL Id: tel-04860605

<https://theses.hal.science/tel-04860605v1>

Submitted on 1 Jan 2025

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.



HAL Authorization



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

PREPAREE A L'UFR SCIENCES DE LA SANTE DE BESANCON

Laboratoire Chrono-environnement – UMR 6249 CNRS

Ecole doctorale n°554 « ENVIRONNEMENTS-SANTE »

Doctorat de Science de la Vie et de la Santé

Par

Mme. Gaillot Susie

**Caractérisation de variants ADC et de mécanismes impliqués dans la
résistance au céfidérocol et aux carbapénèmes chez *Acinetobacter baumannii***

Thèse présentée et soutenue à Besançon, le 11 décembre 2023

Composition du Jury :

Pr Laurent Dortet	Université de Paris-Saclay	Président
Pr Emmanuelle Dé	Université de Rouen	Rapporteur
Pr Richard Bonnet	Université Clermont Auvergne	Rapporteur
Pr Katy Jeannot	Université de Bourgogne Franche-Comté	Directeur de thèse
Dr Anaïs Potron	Université de Bourgogne Franche-Comté	Codirecteur de thèse

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les **Pr Emmanuelle Dé** et **Pr Richard Bonnet**, qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Merci pour le temps que vous avez accordé à l'évaluation de ce travail. Je souhaite également remercier le **Pr Laurent Dortet**, en qualité d'examineur de ce travail et en tant que président de ce jury. Votre présence à tous dans ce jury a permis de rendre la discussion enrichissante. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma gratitude.

Je souhaite également adresser mes remerciements aux **Dr Rémy Bonnin** et **Dr Sylvie Chevalier** pour leur participation annuelle au comité de suivi de thèse, leurs conseils et leur bienveillance.

Je souhaite remercier particulièrement mes directrices de thèse. Merci au **Pr Katy Jeannot**, pour ses retours au cours de ces travaux, pour le temps qu'elle a consacré à ce travail et ses conseils. Merci au **Dr Anaïs Potron** pour tous les échanges que nous avons pu avoir au cours de ces trois années et plus. Travailler avec toi a été un véritable plaisir et ton soutien précieux.

Mes remerciements vont également au **Dr Catherine Llanes**. Merci d'avoir été la personne grâce à qui cette aventure a commencé et de m'avoir donné ma chance malgré qu'au premier entretien de M1 avec vous, je « ne payais pas de mine ». J'espère que vous continuerez de penser à moi en voyant des brookies pendant encore de nombreuses années.

Je souhaite remercier le **Pr Patrick Plésiat**, pour son accueil au sein du laboratoire à mes débuts, et de m'avoir proposé un sujet de stage passionnant pour mon année de Master 2.

Je tiens à remercier les stagiaires qui ont activement participé à l'obtention de résultats présentés dans ce travail et qui ont rédigé des rapports très utiles au court de l'écriture de ce manuscrit. **Salomé, Anna-Louise, Eva**, merci de votre intérêt et des bons moments passés, et que j'espère partagés (et si ce n'était pas le cas, il est malheureusement trop tard pour des réclamations).

Chloé, bactériologiste de cœur et mon amie, merci pour ton soutien si précieux tout au long de la thèse. Merci d'avoir contribué à la réussite de mes manip en étant simplement présente dans la même pièce que moi (il faudra me donner ton secret un jour). Même si ça a été du coup moins pratique pour réussir la suite après ton départ du labo, ta présence m'a manqué, mais car tu es une belle personne, et c'est toujours un plaisir de passer des moments avec toi.

Ma petite **Eline** (avais-je d'autres choix que d'utiliser ce surnom ?), merci pour tes coups de mains au labo, tes coups de palme à la piscine (qui m'ont permis de rester motivé pour y aller, au moins de temps en temps...) et nos discussions animées. Accroche-toi et travail bien (mais pas trop !) car j'ai hâte de pouvoir apprendre plein de choses sur Pyo, mon premier amour, grâce à toi !

Zélie, de passer le concours de l'ED au même moment à soutenir nos thèses à deux jours d'intervalle, en validant nos premiers articles en premier· auteur respectif à 10 jours près, on peut dire que nous avons été synchro sur le déroulement de nos thèses ! Merci pour ce hasard incroyable et surtout pour ta présence pendant tout ce temps.

Julie C., merci pour ces moments passés depuis cinq ans, que ce soit des séances de platage de boîtes à 21h ou bien covoiturage sur Lady Gaga, je garde de bons souvenirs de nos péripéties !

Confrérie de la krieg, merci de votre soutien au laboratoire et en dehors, je garde de précieux souvenirs de nos aventures depuis le master 1.

Aya, merci pour les échanges que nous avons pu avoir au cours de ces trois ans, et de nous avoir fait découvrir un peu le Liban (surtout sous forme de nourriture, la plus appréciée au laboratoire... !).

Lison, tu n'es pas là depuis si longtemps, mais tu as apporté de nombreux changements qui ont bénéficiés à tous au laboratoire. Je ne doute pas du fait que je pars d'ici en le laissant entre de bonnes mains.

Je souhaite remercier **Alexandre**, mon « mentor de paillasse », pour la pédagogie et la patience dont il a fait preuve en me formant pendant mon premier stage et pour les conseils qui se sont avérés utiles pour toutes ces années passées. **Loïs**, merci également à toi pour les nombreux coups de main pendant mes premières années au labo. **Soumaya**, merci pour ta gentillesse constante, et ton aide discrète mais remarquée et appréciée. Ce fut un plaisir de travailler avec toi depuis ton arrivée en M1.

Merci au reste de la (très petite) « *Team Acineto* ». **Jean-Baptiste**, merci d'avoir initié des manips qui m'ont été utiles pour la thèse. **Ani**, merci pour ta gentillesse constante. Echanger sur pourquoi *Acineto* ne voulait pas faire ce qu'on souhaitait à été ludique (je n'irai pas jusqu'à dire un plaisir au vu des nombreux jours, semaines et plus qu'il a fallu pour qu'enfin les manips marchent !).

Je souhaite remercier également les membres du CNR pour leur aide à de nombreuses reprises : **Maxime, Pauline, Emma, Léa**.

Mes remerciements vont aussi à l'équipe de Parasito-mycologie : **Audrey G., Audrey L., Coralie, Adeline, Julie R.** Merci pour votre aide ou vos conseils précieux.

Benoit, merci pour ton aide au cours des différents projets menés depuis mon arrivée au laboratoire. A défaut d'être suffisamment grande par la taille selon toi, j'espère au moins ne pas être trop petite dans ton estime.

Merci également aux « anciens » du labo : **Daniel, Charles, Sandra, Charlotte**. Vous apportiez de la bonne humeur au labo et c'était toujours sympa de discuter avec vous !

Je tiens à remercier **l'équipe RESIST** du Kremlin-Bicêtre pour leur accueil chaleureux au cours de ces deux mois de stage/formation en enzymologie, et particulièrement **Saoussen** pour sa pédagogie, sa patience et sa gentillesse.

Je tiens à remercier également **Djazia, Estelle** et **Isabelle** sans qui cette aventure parisienne n'aurait pas été possible.

Je souhaite remercier mes amis pour leur soutien. **Ilona** et **Charline**, merci de me supporter (dans tous les sens du terme) depuis déjà 15 ans. On ne se voit pas tant que ça concrètement, mais tous les moments que nous partageons sont précieux pour moi.

Merci à la *Dream Team* du FJC 2023, d'avoir permis de réaliser un beau Forum dans la joie et la bonne humeur : **Eline, Jonathan, Sophie, Zélie, Célian, Clara, Jeanne, Charles-F, Chloé, Bernard et Célestin.**

Je souhaite remercier **Mes parents** pour leur soutien au cours de cette thèse mais aussi depuis le début de mes études. Merci de m'avoir laissée partir aussi loin (tout est relatif) et pour les passes droits sur le ménage en période de rédaction. Merci à mon frère **Hugo** d'avoir aussi été un soutien, peut-être malgré toi parfois, mais tu es la personne avec la plus grande capacité de dédramatisation que je connaisse. La thèse et le reste a peut-être fait que j'ai été moins présente, mais je ne suis pas moins fière de la personne que tu deviens.

Je souhaite aussi remercier **Martine Gautheron**, véritable pilier pour les doctorants bisontins de l'ED-ES, ainsi que **Nadine Bernard** et **Philippe Cayo**, pour leur implication auprès des doctorants. Mes remerciements vont aussi au personnel de l'ED.

*A tout ceux qui ont contribué à cette thèse, en apportant une idée, un soutien ou un sourire,
Merci mille fois*

*A mon confident à 4 pattes, qui a vu naître mon amour pour la biologie mais dont la
dernière page s'est tournée avant celle de cette thèse*

Table des matières

Remerciements	2
Liste des communications et publications	9
Poster	9
Communications orales	9
Publications	10
Table des Figures	11
Table des tableaux	12
Abréviations.....	13
Acides aminés.....	14
Antibiotiques	14
Introduction.....	15
I. <i>Acinetobacter baumannii</i>	15
1. Le genre <i>Acinetobacter</i>	15
1.1. Taxonomie	15
1.2. Identification des espèces	15
1.3. Caractères bactériologiques	17
1.4. Réservoir naturel	18
1.5. Virulence et pathogénicité	19
2. Infections par <i>A. baumannii</i>	24
2.1. Infections associées aux soins	24
2.2. Infections communautaires.....	28
3. Epidémiologie	29
3.1. Typage	29
3.2. Distribution clonale de <i>A. baumannii</i>	32
II. Antibiotiques	34
1. Les β -lactamines	37
1.1. Généralités	37
1.2. Les pénicillines.....	37
1.3. Les céphalosporines	38
1.4. Les carbapénèmes.....	40
1.5. Les monobactames.....	40
1.6. Les inhibiteurs	40
2. Mode d'action des β -lactamines	42

2.1. Entrée des antibiotiques dans la bactérie	43
2.2. La cible des β -lactamines : les PLPs et mécanisme d'action	47
III. Résistance aux antibiotiques	51
1. Résistance aux β -lactamines	51
1.1. Les β -lactamases.....	53
1.2. Cas des antibiotiques couplés à des sidérophores.....	62
2. Epidémiologie des clones résistants de <i>A. baumannii</i>	65
Objectifs scientifiques	70
Résultats	71
I. Impact des variants ADC sur la résistance aux β -lactamines	71
1. Sélection des variants ADC.....	71
2. Phénotypes de résistance conférés par les variants	76
3. Caractérisation de 4 variants ADC impliqués dans la diminution de sensibilité au céfidérocol.....	79
3.1. Résumé et contexte.....	79
3.2. Projet d'article	82
3.3. Supplementary data	93
4. Caractérisation de variants ADC contribuant à la diminution de sensibilité des carbapénèmes.....	95
4.1. Résumé et contexte.....	95
4.2. Projet d'article	97
4.3. Supplementary data	113
4.4. Résultats complémentaires	116
II. Modification des PLPs et résistance au céfidérocol	117
III. Rôle des enzymes de type NDM dans la résistance au céfidérocol	127
1. Contexte et résumé	127
2. Article	129
Discussion	138
I. Impact des variants ADC sur la résistance aux β -lactamines	138
1. Impact des mutations sur le spectre	138
2. Importance des ADC dans les souches cliniques.....	144
3. Epidémiologie des ADC.....	144
II. Obtention de mutants et modification des PLPs.....	148
III. Rôle des enzymes de type NDM dans la résistance au céfidérocol	154
IV. Céfidérocol : bilan général de trois années d'utilisation au laboratoire.....	157
Conclusion	159
Matériel et Méthodes.....	160
I. Techniques de microbiologie	160

1. Souches et plasmides utilisés	160
2. Milieux de culture	162
3. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques.....	163
3.1. Antibiotogrammes	163
3.2. Détermination des Concentration Minimales Inhibitrices (CMI)	164
4. Courbes de croissance	164
5. Obtention de mutants sur milieux gélosés avec antibiotiques	164
II. Techniques de biologie moléculaire	165
1. Extraction d'ADN	165
2. PCR.....	166
3. Electrophorèse	166
3.1. En gel d'agarose.....	166
3.2. En gel de polyacrylamide.....	166
4. Purification de fragment d'ADN	167
5. Extraction de plasmides	167
6. Clonage	167
6.1. Restriction enzymatique.....	167
6.2. Ligature des plasmides et fragments d'ADN	167
7. Mutagénèse dirigée.....	168
8. Transformation bactérienne	168
8.1. Par choc thermique	168
8.2. Par transformation naturelle.....	169
8.3. Par électroporation	170
9. Obtention de mutants par délétion de gène.....	170
10. Séquençage de Sanger	171
11. RTqPCR	171
11.1. Extraction d'ARNm	171
11.2. Amplification d'ADNc	172
11.3. Quantification relative des transcrits de gènes.....	172
III. Synthèse de protéines, purification et détermination des constantes enzymologiques.....	173
1. Induction par l'IPTG	173
2. Purification de protéines taguées (ADC)	173
3. Déterminations des constantes catalytiques	174
IV. Analyses bioinformatiques.....	174
1. Séquençage complet des génomes	174
2. Appel de variants.....	174

Bibliographie.....	177
Annexes.....	203
Annexe 1	204
Annexe 2.....	205
Annexe 3.....	206
Annexe 4.....	207

Liste des communications et publications

Poster

Intra-patient evolution of a pulmonary strain of *Pseudomonas aeruginosa*, from primo-colonisation to lung transplant

S. Gaillot, C. Llanes, B. Valot, S. Kiener, & P. Plésiat

44th European Cystic Fibrosis Conference (9 – 12 Juin 2021) [En ligne]

Cloning and characterization of ADC variants found in clinical *Acinetobacter baumannii* strains

S. Kiener, S. Gaillot, M. Bour, K. Jeannot, A. Potron

27^{ème} édition du Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon (16 et 17 Juin 2022)

Caractérisation de variants de la céphalosporinase ADC chez *Acinetobacter baumannii*

S. Gaillot, S. Kiener, M. Bour, K. Jeannot, A. Potron

17^{ème} Congrès National de la Société Française de Microbiologie (SFM), Montpellier (3 - 5 octobre 2022)

Communications orales

NDM-like carbapenemases as a leading cause of cefiderocol resistance in *Acinetobacter baumannii*

S. Gaillot, JB. Vuilleminot, M. Bour, BI. Iorga, P. Triponney, P. Plésiat, K. Jeannot, A. Potron

26^{ème} édition du Forum des Jeunes Chercheurs (23 et 24 Juin 2021) [En ligne]

Evolution d'une souche de *Pseudomonas aeruginosa* isolée chez un patient atteint de mucoviscidose, de la primo-colonisation à la post-transplantation

S. Gaillot, C. Llanes, B. Valot, S. Kiener, P. Plésiat

12^{ème} édition du GDR *Pseudomonas*, Malbuisson (18 – 20 Octobre 2021)

Résistance au céfidérol chez *Acinetobacter baumannii*

S. Gaillot, S. Oueslati, JB Vuilleminot, M. Bour, BI Iorga, P. Triponney, P. Plésiat, R. Bonnin, T. Naas, K. Jeannot, A. Potron

41^{ème} édition de La RICAI, Paris (13 et 14 décembre 2021)

Resistance to cefiderocol in *Acinetobacter baumannii*

S. Gaillot, S. Oueslati, JB Vuilleminot, M. Bour, BI Iorga, P. Triponney, P. Plésiat, R. Bonnin, T. Naas, K. Jeannot, A. Potron

Journée Des Doctorants de Chrono-environnement, Besançon (1er février 2022)

Publications

Exposure of *Pseudomonas aeruginosa* to Cinnamaldehyde Selects Multidrug Resistant Mutants

A. Tetard, S. Gaillot, E. Dubois, S. Aarras, B. Valot, G. Phan, P. Plésiat, C. Llanes

Antibiotics **2022**, <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121790>

Genomic characterization of an NDM-9-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate and role of Glu152Lys substitution in the enhanced cefiderocol hydrolysis of NDM-9

S. Gaillot, S. Oueslati, JB. Vuilleminot, M. Bour, Bl. Iorga, P. Triponney, P. Plésiat, R. Bonnin, T. Naas, K. Jeannot, A. Potron

Frontier in Microbiology **2023**, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1253160>

Performance of the disc diffusion method, MTS gradient tests and two commercially available microdilution tests for the determination of cefiderocol susceptibility in *Acinetobacter* spp.

K. Jeannot, S. Gaillot, P. Triponney, S. Portets, V. Pourchet, D. Fournier, A. Potron

Microorganisms **2023**, <https://doi.org/10.3390/microorganisms11081971>

Table des Figures

Figure 1 : Micrographie électronique à balayage de la souche de <i>A. baumannii</i> ATCC 19606, x 18 000.....	17
Figure 2 : Représentation de la structure du LPS (A) et du LOS (B).	21
Figure 3 : Frise chronologique d'apparition des différentes classes d'antibiotiques.	35
Figure 4 : Représentation des structures chimiques des β -lactamines.	37
Figure 5 : Représentation de la structure chimique du céfidérocol.....	39
Figure 6 : Structure des parois des bactéries à Gram négatif et des bactéries à Gram positif.	42
Figure 7 : Les différents clusters de gènes impliqués dans la prise en charge du fer chez <i>A. baumannii</i>	45
Figure 8 : Mécanisme d'entrée des antibiotiques par voie passive (porines) ou active (transporteurs spécifiques).	46
Figure 9 : Entrée des sidérophores et régulation.	47
Figure 10 : Synthèse du peptidoglycane.	48
Figure 11 : Représentation de la structure tridimensionnelle de l'ADC-30..	57
Figure 12 : Séquence nucléotidique d'ISAba1 insérée en amont du gène <i>bla_{ADC}</i> (<i>bla_{AmpC}</i>).	59
Figure 13 : Pourcentage d'isolats de <i>Acinetobacter</i> spp. résistants aux carbapénèmes en Europe en 2021.	66
Figure 14 : Antibiotogrammes des souches cliniques exprimant certains variants ADC étudiés sur MH et MH contenant 1000 μ g/ml de cloxacilline..	74
Figure 15 : Sites des substitutions étudiées replacés sur la structure 3D d'ADC-7, en complexe avec la ceftazidime (en fuchsia).	78
Figure 16 : Taux de mutants obtenus à partir de la souche <i>A. baumannii</i> CIP70.10 sur (A) ceftazidime, (B) céfépime et (C) céfidérocol après 24 h d'incubation.....	117
Figure 17 : Séquence en amont des gènes codant (A) la <i>PLP1b</i> du mutant FDC2.079 et (B) la <i>PLP2</i> du mutant FDC4.098.	120
Figure 18 : Schéma reprenant les différentes constructions contenant des gènes codant les <i>PLP1b</i> , <i>PLP2</i> et <i>PLP3</i>	121
Figure 19 : Courbe de croissance des souches possédant les gènes codant la <i>PLP1b</i> (A), <i>PLP2</i> (B), ou <i>PLP3</i> (C), dont l'expression dépendait de différents promoteurs.....	123
Figure 20 : Niveaux d'expression relatifs des gènes codants (A) la <i>PLP1b</i> , (B) la <i>PLP2</i> et (C) la <i>PLP3</i> des différentes constructions de PLPs et des mutants par rapport à la souche de référence CIP70.10.	126
Figure 21 : Diamètre d'inhibition autour des disques de céfidérocol de la souche CIP70.10 WT, productrice de NDM-1 ou NDM-9 et comparaison en présence d'EDTA.	128
Figure 22 : Lien entre les différents variants ADC, dont les gènes ont été clonés.	145
Figure 23 : Arbre comparant les différents variants de l'enzyme ADC identifiés dans les souches cliniques reçues au CNR-RA..	147
Figure 24 : Méthode illustrée pour la sélection des mutants sur antibiotique.....	165
Figure 25 : Alignement des séquences protéiques des différents variants ADC clonés au cours de ce travail....	205

Table des tableaux

Tableau 1 : Facteurs de virulence chez <i>Acinetobacter baumannii</i> et rôle dans la virulence.....	20
Tableau 2 : Nouveaux antibiotiques sur le marché depuis 2010 et anciennes molécules réutilisées récemment.	36
Tableau 3 : Les différentes PLPs retrouvées chez <i>A. baumannii</i> et leurs rôles physiologiques.	50
Tableau 4 : Informations générales sur les différentes classes de β -lactamases.....	54
Tableau 5 : Positons identifiées chez les AmpC pour conduire à un phénotype ESAC.....	58
Tableau 6 : Liste des variants ADC décrits dans la littérature et leur type.....	60
Tableau 7 : Valeurs des paramètres enzymatiques des variants ADC décrits dans la littérature.	61
Tableau 8 : Autres composés antibiotiques couplés à un sidérophore étudiés par le passé.....	63
Tableau 9 : Substitutions identifiées dans les variants ADC étudiés par rapport à ADC-50 (retrouvé dans la souche CIP70.10).	72
Tableau 10 : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de différents antibiotiques appartenant à la classe des β -lactamines vis-à-vis de la souche <i>A. baumannii</i> CIP70.10, et <i>A. baumannii</i> CIP70.10 Δ ADC produisant les différents variants ADC étudiés.	77
Tableau 11 : CMI des antibiotiques vis-à-vis de souches de <i>A. baumannii</i> surproduisant les systèmes d'efflux AdeIJK (BM4666) ou AdeABC (BM4689), en absence ou présence des variants ADC-56 ou ADC-200.	116
Tableau 12 : Sensibilité aux antibiotiques et mutations identifiées dans les mutants résistants au céfidérol sélectionnés à partir de la souche CIP70.10 sur des milieux supplémentés en CAZ, FEP, ou FDC.	119
Tableau 13 : CMI de différentes β -lactamines vis-à-vis des souches possédant les gènes codant la PLP1b, PLP2, ou PLP3, dont l'expression dépendait de différents promoteurs.....	124
Tableau 14 : Liste des substitutions identifiées chez les variants de l'enzyme ADC caractérisés au cours de ce travail.	143
Tableau 15 : Mécanismes décrits dans la littérature et dans cette étude contribuant à la baisse de sensibilité du céfidérol chez <i>A. baumannii</i>	156
Tableau 16 : Souches utilisées au cours de ce travail.	160
Tableau 17 : Plasmides utilisés au cours de ce travail.	162
Tableau 18 : Liste des amorces utilisées au cours de ce travail.	175
Tableau 19 : Valeurs détaillées des paramètres enzymatiques des variants ADC décrits dans la littérature.	204
Tableau 20 : Niveaux d'expression relatifs des gènes codants la PLP1b, la PLP2 et la PLP3 des différentes constructions de PLPs et des mutants par rapport à la souche de référence CIP70.10.	206

Abréviations

A : Absorbance

ADC : *Acinetobacter-Derived Cephalosporinase*

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADNg : ADN génomique

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

BLSE : β -lactamase à spectre étendu

BET : Bromure d'Ethidium

CHDL : *Carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases*

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CNR-RA : Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques

CRAB : *Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii*

dNTP : Désoxyribonucléotide triphosphate

DO : Densité optique

ESAC : *Extended-Spectrum AmpC*

g : Accélération de la pesanteur

g : Gramme

h : Heure

IRL : *Inverted Repeat Left*

IRR : *Inverted Repeat Right*

IS : *Insertion Sequence*

L : Litre

MALDI-TOF : *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight*

MBL : Métallo- β -lactamase

McF : McFarland

MHA : Mueller-Hinton Agar

MHB : Mueller-Hinton Broth

min : Minute

ml : Millilitre

μ l : Microlitre

mM : Millimolaire

ng : Nanogramme

nm : Nanomètre

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PDC : *Pseudomonas-Derived Cephalosporinase*

PLP : Protéine Liant les Pénicillines

pmol : Picomole

qsp : Quantité suffisante pour

RBS : *Ribosome-Binding Site*

RT : *Reverse Transcription*

sec : Seconde

SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*

UFC : Unité Formant Colonie

WGS : *Whole Genome Sequencing*

Acides aminés

A (Ala) : Alanine

C (Cys) : Cystéine

D (Asp) : Acide aspartique

E (Glu) : Acide glutamique

F (Phe) : Phénylalanine

G (Gly) : Glycine

H (His) : Histidine

I (Ile) : Isoleucine

K (Lys) : Lysine

L (Leu) : Leucine

M (Met) : méthionine

N (Asn) : Asparagine

P (Pro) : Proline

Q (Gln) : Glutamine

R (Arg) : Arginine

S (Ser) : Sérine

T (Thr) : Thréonine

V (Val) : Valine

W (Trp) : Tryptophane

Y (Tyr) : Tyrosine

Antibiotiques

AMC : Amoxicilline + Acide clavulanique

AMX : Amoxicilline

CAZ : Ceftazidime

CTX : Céfotaxime

CXM : Céfuroxime

CXN : Céfalexine

FDC : Céfidérol

FEP : Céfépime

FOX : Céfoxitine

IPM : Imipénème

KMN : Kanamycine

MEM : Méropénème

MNO : Minocycline

PIL : Pipéracilline

TCC : Ticarcilline + Acide clavulanique

TIC : Ticarcilline

PTZ : Pipéracilline + Tazobactam

Introduction

I. *Acinetobacter baumannii*

1. Le genre *Acinetobacter*

1.1. Taxonomie

La taxonomie des espèces de *Acinetobacter* a connu de nombreux remaniements selon l'avancée des technologies mais elle reste toujours complexe. *Acinetobacter* a été isolé pour la première fois en 1911 par le microbiologiste allemand Paul Beijerinck à partir de prélèvements de sol cultivés sur un milieu enrichi en acétate de calcium. Le nom attribué à la bactérie était alors *Micrococcus calcoaceticus* (Beijerinck, 1910). Il faudra attendre 1954 pour que le genre *Acinetobacter* soit décrit pour la première fois par (Brisou & Prevot, 1954). En 1986 et 1987, Bouvet et Grimont caractérisent différentes espèces appartenant à ce genre à partir de leurs propriétés (Bouvet & Grimont, 1986, 1987).

Aujourd'hui, le genre *Acinetobacter* appartient à l'ordre des *Pseudomonales* lui-même de la classe des *Gammaproteobacteria*. Il regroupe 77 espèces dont le nom est validé et une douzaine en attente de validation (LPSN, <http://www.bacterio.net/> ; consultation le 09/06/2023). La différenciation des espèces au sein de ce genre reste complexe à ce jour.

1.2. Identification des espèces

Les premières identifications d'espèces reposaient sur des critères phénotypiques et biochimiques. Ainsi, comme évoqué précédemment, Bouvet et Grimont se sont basés sur les propriétés biochimiques pour classer les espèces de *Acinetobacter*. Par la suite, les techniques d'hybridation d'ADN-ADN ont permis d'améliorer la différenciation entre ces espèces (Gerner-Smidt & Tjernberg, 1993).

C'est grâce aux techniques de séquençage Sanger, puis de génomique, que les espèces ont pu être discriminées par la suite. Ainsi l'analyse des séquences des régions intergéniques codant l'ARN ribosomal 16S et 23S associés à des séquences d'autres gènes comme *rpoB*, *gyrB* ou encore *recA* a amélioré la distinction entre les différentes espèces, y compris celles appartenant au complexe *Acinetobacter baumannii/calcoaceticus* (ABC) qui sont très proches et par conséquent complexes à distinguer (T. Chen et al., 2014; Mateo-Estrada et al., 2019; Vijayakumar et al., 2019). Aujourd'hui, ce

complexe est composé de *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. seifertii*, *A. lactucae*, et les espèces de *Acinetobacter* « entre 1 et 3 ». Si l'analyse des séquences des gènes codant l'ARN ribosomal 16S s'est montrée discriminante mais au niveau du genre uniquement, l'analyse de la séquence de *rpoB* semblait plus discriminante, jusqu'à l'échelle de l'espèce (Philippon et al., 2022). La production d'une β -lactamase de type OXA-51 est aussi recherchée car spécifique de *A. baumannii* (Turton, Woodford, et al., 2006).

L'AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) est une méthode qui a été employée pour l'identification d'espèces et qui repose sur la digestion de l'ADN génomique avec deux enzymes de restriction. La première coupe de manière peu fréquente alors que la seconde coupe plus régulièrement. Des adaptateurs vont ensuite être ajoutés aux extrémités des fragments obtenus, correspondant à l'un ou l'autre des types de coupure, et des amorces spécifiques s'hybrident à ces adaptateurs vont ensuite être utilisées pour la réalisation d'une PCR. Après migration sur gel, plusieurs dizaines de fragments seront alors visibles et la comparaison des différents profils permet de comparer les isolats. Dans le cadre de l'identification, cette méthode très robuste, et permet même la discrimination entre les espèces du complexe ABC (Dijkshoorn et al., 1996).

Le ribotypage repose aussi sur la digestion d'ADN, mais pas dans son intégralité. Il s'agit cette fois-ci de digérer l'ADN codant pour les ARNr, qui ont l'avantage d'être conservés dans le temps et donc de peu muter. Après digestion, les fragments sont placés dans un gel permettant la réalisation d'une électrophorèse, puis sont transférés sur membrane par méthode du *Southern blot*. Des sondes spécifiques de l'ADN sont alors utilisées pour révéler le ribotype. Cette méthode est assez robuste pour la distinction entre les différentes espèces de *Acinetobacter* (Gerner-Smidt, 1992).

Le *tRNA Spacer Fingerprinting* repose sur l'amplification des espaces séparant les ARNt, eux-même répartis sur le génome. Les amorces sont spécifiques et marquées à la fluorescéine, permettant ainsi aux fragments amplifiés d'être fluorescents et de réaliser des densitogrammes de fluorescence variant entre espèces. Cette technique n'était cependant pas très discriminante dans tous les cas et certaines espèces de *Acinetobacter* avaient des profils de *tRNA Spacer Fingerprinting* similaires (Ehrenstein et al., 1996).

Ces techniques ont toutefois été abandonnées au profit d'autres méthodes, plus rapides ou plus précises. Aujourd'hui, l'identification se fait principalement par spectrométrie de masse MALDI-TOF, technique couramment utilisée en clinique du fait de sa rapidité. Cette méthode n'est pas parfaite puisque, bien qu'en amélioration, elle reste tout de même limitée pour permettre la distinction à l'échelle de l'espèce (Šedo et al., 2013). Le traitement des infections causées par *Acinetobacter* respectant des recommandations proches peu importe l'espèce, son manque de précision reste un inconvénient faible face à l'atout que représente sa rapidité.

A ce jour, seul le séquençage complet du génome permet l'identification précise de souches au rang d'espèce. Mateo-Estrada et collègues ont d'ailleurs proposé, à partir de cette méthode, d'analyser 13 marqueurs différents, qui permettent une distinction entre espèces assez robuste ([Mateo-Estrada et al., 2019](#)).

1.3. Caractères bactériologiques

Du point de vue microbiologique, le genre *Acinetobacter* regroupe des bactéries à Gram négatif non-fermentantes, oxydase-négatives, catalase-positives et aérobies stricts. Ces bactéries ne requièrent pas de conditions particulières de culture, puisqu'elles sont facilement cultivables à 37°C, et ont une forme coccobacillaire (**Figure 1**). Dans l'ensemble, les bactéries du genre *Acinetobacter* possèdent un génome avec un faible pourcentage de G+C, allant de 39 à 47 % ([Peleg et al., 2008](#)).

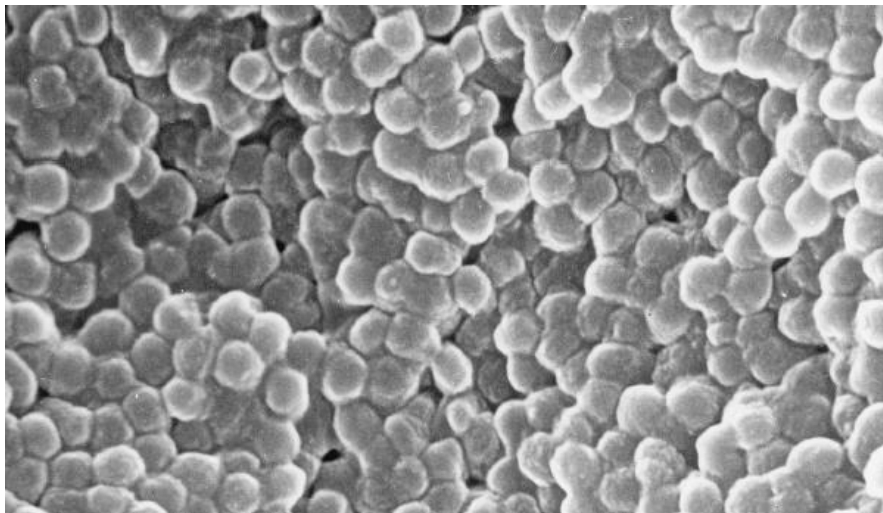


Figure 1 : Micrographie électronique à balayage de la souche de *A. baumannii* ATCC 19606, x 18 000. Préparé et photographié par A. Shelton. Tiré de Bergogne-Bérézin et Towner 1996 ([Bergogne-Bérézin & Towner, 1996](#)).

1.4. Réservoir naturel

Le genre *Acinetobacter* est ubiquitaire et les différentes espèces qui le composent ont déjà été retrouvées dans de nombreux environnements. Des isolats ont été retrouvés dans des denrées alimentaires (viande, poisson, lait et fromage) (Al Atrouni et al., 2016). D'autres ont également été retrouvés sur des légumes, marqueurs d'une provenance environnementale. Une étude ayant analysé 177 échantillons de divers légumes a retrouvé ces bactéries dans 17 % des échantillons, *A. baumannii* étant l'espèce la plus fréquente (Berlau et al., 1999). *Acinetobacter*, et en particulier *A. baumannii*, a déjà été isolé chez de nombreux d'animaux, principalement des mammifères, mais également des oiseaux, comme les poules ou encore les cigognes, mais beaucoup plus rarement chez les autres espèces d'oiseaux étudiées (Łopińska et al., 2020; Mateo-Estrada et al., 2022; Rafei et al., 2015; Wilharm et al., 2017). Chez les cigognes, plus de 25 % des nids étaient colonisés par *A. baumannii*, soit bien plus que ce qui a pu être retrouvé chez d'autres oiseaux, suggérant que cet animal pourrait constituer un réservoir écologique de la bactérie. Le fait que *A. baumannii* soit, contrairement aux autres *Acinetobacter*, capable de croître à 44°C est un élément qui peut également aller dans ce sens, la température corporelle des oiseaux étant un peu plus élevée que celle des humains (allant de 38°C à 42°C, en fonction des espèces). Concernant les souches de *A. baumannii* décrites dans les études précédemment citées, elles ne semblaient pas proches des souches retrouvées en clinique, écartant une éventuelle contamination croisée avec l'Homme. Les animaux autres que mammifères et oiseaux peuvent également être porteurs de *Acinetobacter* ; en effet, une étude a montré que des isolats de *Acinetobacter* spp. pouvaient être isolés d'arthropodes (Šrámová et al., 1992). Certains *Acinetobacter* peuvent également faire partie de la flore humaine, plus particulièrement cutanée, mais sont aussi retrouvés dans des échantillons fécaux et dans le tractus respiratoire de personnes saines non hospitalisées (Dijkshoorn et al., 2005; Seifert et al., 1997; Zakharkina et al., 2013).

Les milieux en lien avec l'eau, tels que les usines de traitements d'eau, l'eau de rivière ou de mer, les zones humides ou encore les puits sont également sources d'isolats de *Acinetobacter* spp. (Hamidian et al., 2022; Rafei et al., 2015) La diversité de milieux dans lesquels *Acinetobacter* spp. est identifié est telle que certains isolats ont même été prélevés dans des mines de minerais (Feng et al., 2014; W. Kang et al., 2020).

Bien que la caractéristique ubiquitaire du genre *Acinetobacter* soit indéniable, la répartition des espèces ne semble pas homogène en fonction de la localisation géographique. Il est donc probable que les facteurs climatiques jouent un rôle dans cette répartition (Al Atrouni et al., 2016). Dans ce contexte, des études ont évalué la prévalence de la colonisation cutanée à *A. baumannii* chez l'Homme. Elle n'était que de 0,5 % chez les sujets résidant en zone de climat tempéré (Seifert et al., 1997), et de 3,8 % des sujets étudiés résidant à Hong Kong durant la période chaude et humide (Chu et al., 1999).

Le milieu hospitalier fait également partie des sites où certaines espèces de *Acinetobacter* peuvent être identifiées. Les plus courantes sont celles appartenant au complexe ABC (Ovidiu Vrancianu et al., 2020). Seule *A. calcoaceticus* n'est pas pathogène, étant considérée comme une bactérie de l'environnement (Ayoub Moubareck & Hammoudi Halat, 2020). Les autres espèces représentent quant à elles la majorité des *Acinetobacter* responsables des infections chez l'Homme (Peleg et al., 2008). Parmi les différentes espèces présentes au sein de ce complexe, *A. baumannii* est la plus étudiée car elle contribuerait à 80 % des infections dues à des bactéries appartenant au genre *Acinetobacter* (Turton et al., 2010; Vijayakumar et al., 2019). Son importance clinique est due en partie au fait qu'elle peut former des biofilms permettant sa persistance dans le milieu hospitalier. Cela a même déjà conduit à la fermeture d'unités de soins intensifs, faute de pouvoir l'éradiquer (Aygün et al., 2002). Sa grande capacité à développer de la résistance aux différentes familles d'antibiotiques est également l'un des problèmes majeurs qui témoigne de l'importance clinique de cette bactérie. Cela a aussi conduit l'Organisation Mondiale de la Santé à classer *A. baumannii* parmi les espèces critiques de priorité N°1 en 2017 (Tacconelli et al., 2018). La mortalité associée à ce pathogène est importante, allant de 8 % à 35 % en fonction du type d'infections et de la souche impliquée (Falagas & Rafailidis, 2007). Les infections par des bactéries multi- ou ultra-résistantes sont souvent en lien avec une hospitalisation plus longue et des taux de mortalité plus importants (Graña-Miraglia et al., 2017). La mortalité imputable à *Acinetobacter* reste toutefois discutable en raison de la difficulté à estimer la cause du décès, les patients concernés étant généralement très faibles et présentant également des comorbidités.

1.5. Virulence et pathogénicité

Acinetobacter baumannii possède de nombreux facteurs de virulence (Tableau 1). En effet, bien que variable, une forte proportion de son génome est constituée de gènes impliqués dans la virulence. En 2007, le séquençage d'un génome complet avait mis en évidence la présence de 16 îlots génétiques porteurs de gènes impliqués dans la virulence (Smith et al., 2007).

Tableau 1 : Facteurs de virulence chez *Acinetobacter baumannii* et rôle dans la virulence. D'après C. Lee et al, 2017 (C. Lee et al., 2017).

Facteur de virulence	Rôle dans la pathogénicité
Porines (OmpA, Omp33-36, Omp22, CarO, OprD-like)	Adhérence et invasion cellulaire, induction de l'apoptose chez les cellules hôtes, résistance au sérum, formation de biofilm, persistance
Capsule	Croissance dans le sérum, survie dans les tissus, formation de biofilm
Lipooligosaccharide (LOS)	Résistance au sérum, survie dans les tissus, évasion du système immunitaire, réponse inflammatoire de l'hôte
Phospholipases C et D	Résistance au sérum, invasion cellulaire, survie <i>in vivo</i>
Vésicule de membrane externe	Délivrance de facteurs de virulence aux cellules hôtes, transfert horizontal de gène
Systèmes d'acquisition du fer	Survie <i>in vivo</i> , persistance, mort des cellules hôtes
Systèmes d'acquisition du zinc et du manganèse	Survie <i>in vivo</i>
Système de sécrétion de Type II	Survie <i>in vivo</i>
Système de sécrétion de Type VI	Mort des bactéries compétitrices, colonisation de l'hôte
PLP7/8	Résistance au sérum, survie <i>in vivo</i> , adhérence
Pili	Adhérence, formation de biofilm, motilité

Ces facteurs de virulence peuvent se diviser en différents types :

Les porines

OmpA. Il s'agit de l'une des protéines de membrane externe les plus abondantes chez *A. baumannii*. Elle semble participer à l'adhérence cellulaire et permet l'invasion cellulaire et l'apoptose (Ayoub Moubareck & Hammoudi Halat, 2020; Choi et al., 2008). L'adhérence cellulaire est un facteur important pour la virulence car il s'agit de l'une des premières étapes nécessaires pour permettre la colonisation et l'infection. Elle facilite en effet la phase d'invasion, notamment sur les cellules épithéliales du tractus respiratoire, ce qui pourrait expliquer la prévalence de cette bactérie dans les pneumonies (Choi et al., 2008). OmpA est un ligand de la fibronectine, qui est ubiquitaire chez l'Homme, et qui intervient surtout dans les contextes de blessures pour induire une réparation (Smani et al., 2012). Ceci expliquerait donc peut-être la capacité accrue de *A. baumannii* à infecter des personnes sur des sites de blessure. Par ailleurs, OmpA seraient aussi impliquée dans le passage de *A. baumannii* dans le sang et donc dans le développement de bactériémies.

Omp33–36. Cette porine joue un rôle dans la virulence en raison de sa capacité à induire l'apoptose et l'autophagie chez les cellules hôtes (Rumbo et al., 2014).

CarO. Cette porine jouerait un rôle dans l'adhésion cellulaire. Cet aspect reste toutefois à confirmer car les expérimentations menées pour le démontrer ont été réalisées dans la souche ATCC 19606. Cette dernière a une expression du gène codant CarO plus faible que ce qui est habituellement retrouvé chez les souches cliniques (Uppalapati et al., 2020).

Lipopolysaccharide et capsule

Le lipopolysaccharide (LPS) désigne l'ensemble des lipopolysaccharides présents à la surface de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Il se compose d'un lipide A, permettant l'ancrage dans la membrane, d'un oligosaccharide constituant le *core*, et d'un antigène O (**Figure 2**). Ce dernier n'est pas toujours présent, comme c'est le cas chez *A. baumannii*, le LPS prenant alors le nom de lipooligosaccharide (LOS). Le lipide A, qualifié d'endotoxine, est en particulier responsable de la toxicité du LPS ou LOS, car il entraîne une réponse inflammatoire chez l'hôte ([Westphal, 1960](#)). Bien que rare, il est possible que *A. baumannii* soit à l'origine d'un choc septique. En plus de cela, *A. baumannii* est capable de produire une capsule, permettant une meilleure résistance au sérum et d'améliorer la survie bactérienne sur le site de l'infection. La nature de cette capsule est polysaccharidique, mais la composition en sucres peut varier. Ainsi, plus de 100 types de capsules ont déjà été décrits ([Singh et al., 2019](#)). Hsieh et collègues ont mis en évidence que la répartition des types de capsules pouvait aussi changer en fonction de la population bactérienne ; ainsi certains types de capsule (dénommés *K types*) sont plus prévalents chez les souches *A. baumannii* résistantes aux carbapénèmes. Toutefois, aucune technique ne permettant de comparer la proximité génétique des souches entre elles n'a été utilisée pour cette étude, et il est donc possible que la résistance observée chez ces souches dépende en partie du fond génétique des souches étudiées ([Hsieh et al., 2020](#)). La mutation des gènes impliqués dans la formation de la capsule entraînerait une baisse de la létalité chez des modèles murins de septicémies ([C. Lee et al., 2017](#)).

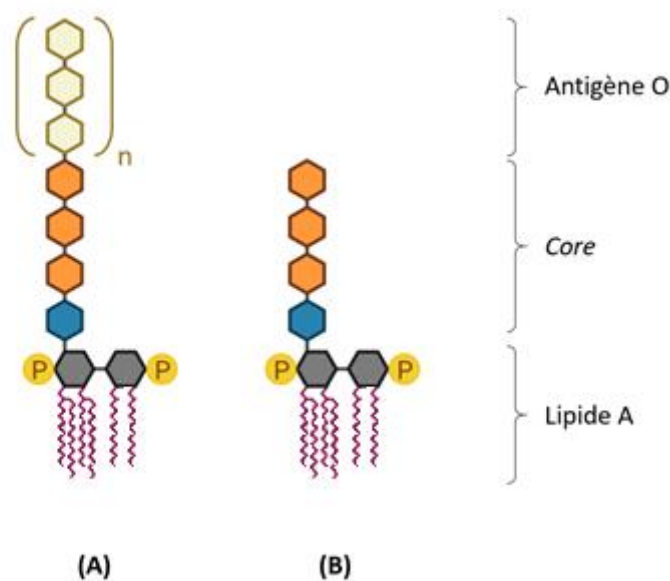


Figure 2 : Représentation de la structure du LPS (A) et du LOS (B).

Enzymes

Phospholipases C et D. Chez *A. baumannii*, les phospholipases C (PLC) et D (PLD) constituent des facteurs de virulence en raison de leur effet cytotoxique (PLC) sur les cellules épithéliales. Elles confèrent également une meilleure résistance au sérum lorsqu'elles sont présentes (PLD) et seraient aussi impliquées dans l'invasion cellulaire (C. Lee et al., 2017).

Biofilm

A. baumannii est capable de produire un biofilm, qui correspond à un mode de vie communautaire, favorisant la résistance, notamment à la dessiccation ou encore aux antibiotiques. Les pili produits par la bactérie vont lui permettre d'adhérer aux surfaces (abiotiques ou autres), permettant par la suite la formation de biofilm. Ce phénomène reste toutefois dépendant de la souche et certains clones produisent plus de biofilm que d'autres. La formation de biofilm peut dépendre également du contexte dans lequel la bactérie se trouve, comme l'exposition à des antibiotiques. Ainsi, il a été démontré que l'exposition à l'imipénème favorise la production de biofilm chez *A. baumannii* (Giannouli et al., 2013).

Motilité

Bien que le nom *Acinetobacter* vienne du grec et signifie « non-mobile », les bactéries appartenant à ce genre sont tout de même capables de motilité (Eijkelkamp et al., 2011; Sarshar et al., 2021). En effet, *A. baumannii*, n'ayant pas de flagelle, n'est pas capable de se déplacer par *swimming* (déplacement en milieu liquide d'une seule bactérie grâce à son flagelle), mais est en revanche capable de se déplacer par *twitching*, méthode de déplacement pour la première fois décrite par Lautrop en 1961 (Lautrop, 1961) et qui se rapporte à une translocation de surface, dont le mécanisme précis n'est pas connu. Ce type de déplacement ne dépend pas de l'action du flagelle, et peut par conséquent être identifié chez des bactéries flagellées ou non flagellées, d'après Henrichsen (Henrichsen, 1972). Il a été proposé que le relargage de polymères, tels que ceux du LPS/LOS pouvait être à l'origine de ce type de déplacement (McQueary et al., 2012). *A. baumannii* est aussi capable de *swarming*, désignant le mouvement rapide et multicellulaire des bactéries sur une surface semi-solide, qui sont propulsées par la rotation d'un flagelle, d'après Kearns (Kearns, 2010). *A. baumannii* ne possédant pas de flagelle, les mécanismes permettant un déplacement de type *swarming* ne sont pas élucidés chez cette bactérie.

Ces types de déplacements sont souche-dépendants ; ainsi une souche peut n'être capable que d'un type de déplacement, des deux ou aucun (Eijkelkamp et al., 2011).

Systèmes de sécrétion

Les systèmes de sécrétion de type II (*Type 2 secretion system*, T2SS) sont impliqués dans le passage de protéines de l'espace périplasmique vers le milieu extracellulaire (Johnson et al., 2016). La délétion des gènes codant ces systèmes empêche le relargage de certaines protéines, comme LipA, LipH ou encore LipAN, impliquées dans la croissance cellulaire utilisant les acides gras, inhibant toute croissance bactérienne dans les milieux dont la seule source de carbone sont les acides gras à longue chaîne (C. Lee et al., 2017). CpaA, une métallopeptidase, est également un substrat du T2SS de *A. baumannii*.

Les systèmes de sécrétion de type VI (*Type 6 secretion system*, T6SS) sont impliqués quant à eux dans la sécrétion de protéines effectrices. Ces systèmes s'apparentent à des seringues, qui au contact d'autres cellules, vont permettre de favoriser la colonisation et l'infection d'un hôte en relâchant des effecteurs impliqués dans l'apoptose notamment. Ils sont également impliqués dans la mort bactérienne des cellules compétitrices, toujours via le relargage d'effecteurs et nécessitant le contact entre les cellules. Ces structures favoriseraient également le transfert horizontal d'ADN, qui pourrait jouer un rôle dans la diffusion de la résistance aux antibiotiques (C. Lee et al., 2017).

Les systèmes de sécrétion de type V (*Type 5 secretion system*, T5SS) sont les systèmes de sécrétion les plus répandus chez les bactéries à Gram négatif. Un de ces systèmes, Ata, a été caractérisé chez *A. baumannii*, et est impliqué dans la formation de biofilm et l'adhérence aux matrices extracellulaires (comme le collagène).

Système d'acquisition de métaux

A. baumannii est capable de provoquer des infections chez l'hôte car il est capable d'acquérir les nutriments qui lui sont nécessaires pour croître dans cet environnement. Les métaux, en particulier, sont cofacteurs d'un certain nombre de réactions enzymatiques et sont donc nécessaires pour le métabolisme bactérien. Les bactéries disposent d'outils leur permettant de capter les métaux dans leur environnement, et en particulier le fer, indispensable à la survie bactérienne. Les sidérophores sont des peptides de petite taille (200 à 2000 Da) capables de chélater le fer (Rayner et al., 2023). Les bactéries les relarguent dans le milieu extra-cellulaire afin qu'un complexe fer-sidérophore puisse se former, et vont ensuite les récupérer via des transporteurs spécifiques. *A. baumannii* produit un sidérophore appelé acinetobactine, lui permettant non seulement de capter le fer mais qui est aussi impliqué dans la persistance sur les cellules épithéliales et qui permet d'endommager les cellules hôtes (C. Lee et al., 2017). En plus des systèmes d'acquisition du fer, *A. baumannii* possède des systèmes d'acquisition du zinc et du manganèse. Le fonctionnement des systèmes impliqués dans l'acquisition du fer est abordé dans un paragraphe plus détaillé (voir la partie II.2.1. *Entrée des antibiotiques, Transport spécifique*).

Survie et multiplication intracellulaire

A. baumannii peut aussi survivre en milieu intracellulaire dans les cellules épithéliales et les macrophages d'un hôte, sans déclencher l'apoptose. Les bactéries sont même capables de se multiplier dans ces conditions et pourraient alors constituer un réservoir chez les patients (Rubio et al., 2022).

A noter toutefois que la colonisation par *A. baumannii* est plus fréquente que les infections, laissant penser que la pathogénicité de cette bactérie reste assez faible. Cependant, en fonction du site de l'infection et de l'état général du patient, les infections à *A. baumannii* peuvent être sévères, allant parfois jusqu'au décès du patient (Dijkshoorn et al., 2007).

De manière intéressante, il a été suggéré que certains facteurs de virulence pourraient être de bons candidats pour le développement de traitements contre *A. baumannii* (Zeng et al., 2023; Zhou et al., 2023).

2. Infections par *A. baumannii*

2.1. Infections associées aux soins

Une infection associée aux soins se caractérise par le fait qu'elle survient à la suite de la prise en charge d'un patient, et qu'elle n'était ni présente ni en court d'incubation lors du début de l'hospitalisation (D'après le Ministère de la santé, https://sante.gouv.fr/IMG/pdf/rapport_vcourte.pdf). Généralement, elle se déclare au moins 48 h après le début de prise en charge du patient.

L'intérêt pour *Acinetobacter* spp. dans les infections associées aux soins s'est développé dans les années 1970. A cette période, une forte augmentation des nombres de cas d'infections, et en particulier causées par des souches résistantes aux antibiotiques, a été observée (Bergogne-Bérézin & Towner, 1996). Bien que la détermination des espèces fût encore complexe à cette époque, il est fort probable que *A. baumannii* ait été l'un des pathogènes majoritairement impliqué. En effet, des études rétrospectives menées sur des souches, dont l'espèce n'avait initialement pas été précisément identifiée, ont révélé la responsabilité fréquente de l'espèce *A. baumannii* dans les infections associées aux soins (Krizova & Nemec, 2010; Spellberg & Bonomo, 2014).

Les infections associées aux soins causées par *A. baumannii* surviennent majoritairement sous forme d'épidémies. Elles se déclarent généralement au sein d'un même établissement et la littérature décrit très souvent des cas d'épidémies touchant les unités de soins intensifs (Carbonne et al., 2005; Kraniotaki et al., 2006; Longo et al., 2006). En général, les mesures d'hygiène de base ne sont pas suffisantes car il est extrêmement difficile d'éradiquer *A. baumannii* une fois implanté dans un service.

L'éradication des souches responsables d'épidémies a parfois été possible grâce à l'application de mesures drastiques d'hygiène, comme lors d'une épidémie ayant eu lieu dans une unité de soin intensif d'un grand centre hospitalier de Londres (Wilks et al., 2006). Les mesures appliquées comprenaient entre autres un nettoyage du matériel médical très rigoureux, une sensibilisation particulière du personnel sur l'hygiène des mains, et l'utilisation de systèmes d'aspiration trachéale fermés pour tous les patients sous assistance respiratoire, sans toutefois recourir à l'isolement des patients ou la fermeture du service. Les hôpitaux sont toutefois souvent contraints de recourir à ces deux dernières mesures car les autres ne se révèlent pas toujours suffisantes pour permettre l'éradication de *A. baumannii* (Pimentel et al., 2005; Tankovic et al., 1994; Towner, 2009).

Parmi les facteurs de risques, on peut noter : une hospitalisation longue en Unité de Soins Intensifs (USI), une hospitalisation (USI ou non) précédente, une antibiothérapie préalable, une ventilation mécanique, l'utilisation de matériel médical invasif tel que des cathéters, tubes endotrachéaux ou nasogastriques, un âge avancé, une opération, une dialyse, et le fait d'être prématuré ou d'avoir un faible poids à la naissance pour les nouveau-nés (Baran et al., 2008; H.-Y. Lee et al., 2018). Les infections à *A. baumannii* sont également plus fréquentes chez les personnes consommant régulièrement de l'alcool. Une étude de 2007 a montré que chez les vers *Caenorhabditis elegans*, la présence d'alcool augmentait les risques d'infection par ce pathogène (Smith et al., 2007). Une étude plus récente a également démontré que la consommation abusive d'alcool entraînait une baisse du fonctionnement du système immunitaire de l'hôte, en touchant en particulier les macrophages, premiers remparts en cas d'infections à *A. baumannii*, mais également en diminuant les taux de certaines interleukines et la capacité de présentation du système immunitaire (Asplund et al., 2013).

A. baumannii est responsable de différents types d'infections, en particulier respiratoires et de bactériémies, mais aussi d'autres types moins fréquents, décrits plus en détail dans les paragraphes qui suivent.

Infections respiratoires

La production de différents facteurs de virulence impliqués dans l'adhésion cellulaire, en particulier aux cellules épithéliales du tractus respiratoire favorise la capacité de *A. baumannii* à provoquer des pneumonies et autres infections respiratoires. Sa capacité à former du biofilm favorise également ce type d'infections, puisque les appareils médicaux utilisés pour l'assistance respiratoire peuvent alors être contaminé par un biofilm, facilitant ainsi la persistance bactérienne et l'entrée de la bactérie dans le corps du patient, via le tractus respiratoire.

Bactériémies

Les bactériémies sont majoritairement causées par l'utilisation de cathéters intravasculaires ou secondaires à une infection respiratoire. Bien que rare, des bactériémies secondaires à des infections cutanées ou urinaires peuvent aussi se déclarer (El-Hakeem et al., 2023). Il semblerait que les patients

atteints de cancer soient beaucoup plus susceptibles de développer des bactériémies à *A. baumannii* et dans certains pays, les souches responsables des bactériémies chez ces patients sont résistantes à la plupart des antibiotiques (Ayoub Moubareck & Hammoudi Halat, 2020; Fukuta et al., 2013). Cette prédisposition s'explique par le fait que ces patients sont souvent porteurs de cathéters ou de chambres implantables dans le cadre de leur traitement, favorisant l'entrée des bactéries dans le sang.

Infections moins courantes pouvant être provoquées par A. baumannii

A. baumannii a également été retrouvé sur la peau ou les tissus mous de patients gravement brûlés, avec des plaies profondes, notamment chez des soldats blessés au cours d'opérations militaires en Afghanistan et en Iraq (Davis et al., 2005; O'Shea, 2012; Scott et al., 2007). Il avait été suggéré que ces isolats provenaient d'une colonisation préalable des soldats à partir de l'environnement. Cette hypothèse semblait plausible en raison de la nature ubiquitaire du genre *Acinetobacter*. Cependant, ces cas d'infections étaient vraisemblablement des infections associées aux soins acquises lors de la prise en charge de ces soldats dans des installations médicales militaires. De plus, des analyses de sols provenant des zones de conflit n'ont pas permis de retrouver des souches de *Acinetobacter* spp., alors que des isolats ont été retrouvés dans l'environnement des installations médicales militaires. L'hypothèse d'une contamination au cours du passage des soldats dans ces installations médicales semble également la plus probable d'après des données plus récentes (Aronson et al., 2006; O'Shea, 2012).

Le type d'infection peut aussi changer en condition de conflit par rapport à ce qui est observé habituellement. En effet, des cas d'ostéomyélites ont été rapportés, alors que cette pathologie est rarement provoquée par *Acinetobacter*. Les isolats responsables de ces infections étaient par ailleurs résistants, ce qui n'avait jamais été rapporté dans les cas d'ostéomyélites décrits auparavant (Davis et al., 2005).

Les catastrophes naturelles peuvent aussi favoriser le développement des infections dues à *A. baumannii*. Cinq cent trente-deux patients ont ainsi été hospitalisés suite à un tremblement de Terre survenu en 1999 en Turquie et ayant entraîné un tsunami, et 41 patients ont développé une infection associée aux soins. Cet évènement a engendré une hausse importante des cas d'infections associées aux soins causées par *A. baumannii*, passant de 7 % des cas d'infection pour les patients en unité de soins intensifs (USI) à 31 %, et faisant de *A. baumannii* le pathogène le plus prévalent en USI à la suite du tremblement de terre (Öncül et al., 2002).

A. baumannii peut aussi provoquer des infections urinaires, qui sont généralement favorisées par la colonisation de matériel médical urinaire (sondes). Des cas de méningites ont aussi été décrits. Elles surviennent généralement à la suite d'une opération neurochirurgicale. Certains facteurs de risques spécifiques interviennent dans le développement de ce type d'infection, tels que la perte de liquide céphalo-rachidien, une infection au niveau du site de l'incision, un temps de chirurgie long, une

chirurgie passant par les sinus, la gravité de la maladie du patient, et le besoin de répéter l'opération (B. Kim et al., 2009).

Les infections à *A. baumannii* les plus mortelles sont les pneumopathies associées à une ventilation et les bactériémies (Dijkshoorn et al., 2007). Les premières études, menées en 1995 et 1996, rapportaient un taux de mortalité de 52 %. Une étude plus récente, basée sur les données de 12 études réalisées entre 2002 et 2013, notait une différence importante de la mortalité entre les infections causées par les souches résistantes aux carbapénèmes ou celles sensibles. Le taux de mortalité passait de 24 % de mortalité (entre 5 et 48 % en fonction de l'étude) dans le cas des souches sensibles, à 49 % (entre 16 et 76 %) pour les souches résistantes aux carbapénèmes (Lemos et al., 2014). Les options thérapeutiques seraient donc également un des facteurs influençant la mortalité.

Bien que *A. baumannii* soit un pathogène particulièrement problématique en clinique, aucun marqueur permettant d'en expliquer précisément la cause n'a été identifié. Le grand nombre de gènes impliqués dans la virulence ou l'accumulation de gènes de résistance aux antibiotiques pourraient être à l'origine de cette réussite clinique (Sahl et al., 2011). Des souches non-humaines, isolées chez des cochons, le bétail et dans l'herbe étaient globalement moins résistantes aux antibiotiques et moins virulentes que des souches cliniques, laissant effectivement penser que ces deux capacités sont importantes dans le développement des infections à *A. baumannii* en milieu hospitalier (Mateo-Estrada et al., 2022, 2023). De plus, la capacité de *A. baumannii* à former du biofilm et à résister à une déshydratation favoriserait sa survie dans ce même contexte. Certaines souches ont démontré une capacité de résistance à la dessiccation allant jusqu'à 96 jours. L'acétylation du lipide A joue un rôle important dans la résistance des isolats à la dessiccation. En effet, les souches possédant un lipide A uniquement penta-acétylé présentent une survie inférieure à 48 h en condition de dessiccation contre plusieurs semaines voire plusieurs mois pour les souches possédant un lipide A hepta-acylé (Boll et al., 2015). Il semblerait par ailleurs que les souches les plus résistantes soient également celles qui forment le plus de biofilm, et appartiennent à certains clones particuliers (Giannouli et al., 2013). L'importance de certains clones dans l'épidémiologie, et notamment des souches résistantes, sera évoquée plus en détail dans des sous-parties dédiées (§ I.3.2. *Distribution clonale de A. baumannii* et III.2. *Epidémiologie des clones résistants de A. baumannii* de l'introduction).

Depuis la pandémie de SARS-CoV-2 ayant débuté en 2019, de nombreuses études ont mis en évidence l'importance de *A. baumannii* comme pathogène majoritaire responsable de co-infection. Là encore, face à une situation particulière, il a été constaté que les infections par *A. baumannii* multirésistants étaient plus importantes qu'en dehors de la période COVID-19. Ces surinfections auraient également entraîné deux fois plus de décès qu'en absence de surinfection (Kyriakidis et al., 2021; Rangel et al., 2021; Rangel & De-Simone, 2023).

2.2. Infections communautaires

De manière générale, les infections communautaires dues à *A. baumannii* et *Acinetobacter* spp. sont plus rares que les infections associées aux soins. Elles concernent en général des patients présentant d'autres facteurs de comorbidité, comme une prise excessive d'alcool ou un tabagisme régulier (Falagas et al., 2007). Les pneumopathies communautaires à *Acinetobacter* surviennent majoritairement en région tropicale et sub-tropicale, avec une proportion plus importante encore au cours des périodes chaudes et humides (Anstey et al., 2002; Falagas & Rafailidis, 2007). Il semblerait donc qu'il existe un impact du climat sur le développement des infections à *Acinetobacter*.

Plusieurs cas de méningites communautaires causées par *Acinetobacter* spp. ont également été décrits. Rarement causées par *A. baumannii*, les espèces les plus impliquées sont principalement *A. Iwoffii*, *A. johnsonii*, *A. junii*, ou des représentants des espèces génomiques 3 ou 6. Ces cas de méningites d'origine communautaire restent toutefois très rares, autant pour le genre *Acinetobacter* que pour les autres bactéries à Gram négatif de manière plus générale (Chang et al., 2000).

La plupart des infections communautaires sont des pneumonies (pour 85% des cas reportés) et des bactériémies (Antunes et al., 2014). La mortalité associée aux infections communautaires à *Acinetobacter* est assez importante, puisqu'il est estimé que 56 % de ces infections sont mortelles (Falagas et al., 2007).

3. Epidémiologie

3.1. Typage

A. baumannii étant responsable d'épidémies, le typage des souches se révèle être important afin de mettre en évidence la diffusion de ce pathogène au sein d'un établissement, et d'essayer de comprendre son origine et les modes de transmission impliqués dans la propagation du pathogène. Certaines méthodes permettent également la comparaison à plus large échelle et de mettre en évidence les clones circulants majoritaires dans un pays, un continent ou même à travers le monde (Rafei et al., 2014, 2019). Les différentes méthodes de typage existantes et utilisées pour la caractérisation de *A. baumannii* sont présentées ci-dessous :

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Cette technique de typage repose sur la digestion de l'ADN génomique avec une enzyme qui présente un faible taux de coupure, en général *SmaI* ou *Apal* chez *A. baumannii* (Gouby et al., 1992). Une fois digérés, les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse en champ pulsé. Le champ électrique change de direction au cours de la migration, afin de permettre une meilleure séparation des fragments d'ADN, qui sont généralement de grande taille et qui ne migreraient pas bien en champ unidirectionnel. Après migration, les différents profils sont observés et comparés. Le nombre de bandes différentes entre les profils permet de définir la proximité entre les souches : si les profils sont exactement identiques, les souches sont clonales et semblables, s'ils diffèrent par 2 ou 3 bandes, les souches sont considérées comme clonales et proches ; pour 4 à 6 bandes, les souches sont possiblement reliées, mais pas clonales. Enfin, si les profils diffèrent par 7 bandes ou plus, les isolats sont considérés comme différents (Tenover et al., 1995, 1997). Cette méthode présente l'avantage d'être très discriminante et reproductible au sein d'un même laboratoire. En revanche, elle est assez longue et coûteuse, et ne permet pas la comparaison entre 2 laboratoires.

Amplified Fragment-Length Polymorphism (AFLP)

Cette méthode, présentée dans la partie sur le typage (§ 1.1.2. *Identification des espèces* de l'introduction), peut aussi être employée pour le typage. Elle est très discriminante dans un contexte intra-laboratoire, mais n'est en revanche pas idéale pour la comparaison entre différents établissements. Cette méthode a toutefois permis d'initier la distinction des différents clones internationaux (International Clone Lineage (ICL)) (Dijkshoorn et al., 1996, 2007).

Le ribotypage

Le ribotypage repose là encore sur la digestion d'ADN comme il l'a déjà été expliqué précédemment (voir partie 1.1.2. *Identification des espèces*). Dans le cadre du typage, il est possible d'automatiser cette technique pour gagner du temps. Elle présente l'avantage d'être reproductible entre laboratoires mais

elle n'a pas un pouvoir discriminant très important et par conséquent, d'autres techniques de typages comme celles évoquées précédemment seront préférées pour les analyses des phénomènes épidémiques.

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Cette méthode repose cette fois-ci sur l'amplification d'ADN. Des amorces non spécifiques sont utilisées, permettant une hybridation aléatoire sur tout le génome. La comparaison des profils électrophorétiques après migration permet ainsi de comparer les souches. Cette technique rapide permet de faire une analyse sans *a priori* avec des amorces aspécifiques. Cependant, la reproductibilité est mauvaise, même au sein d'un même laboratoire, à cause du caractère aléatoire des sites de fixation des amorces.

Repetitive Extragenic Palindromic DNA sequence-based PCR (REP-PCR)

Dans le cas de la REP-PCR, ce sont les séquences répétées de l'ADN qui sont ciblées. Des amorces spécifiques de ces séquences vont venir se fixer dessus, et c'est l'ADN situé entre ces séquences répétées qui va être amplifié. Cette méthode peut être automatisée et la discrimination de cette technique est meilleure que pour le ribotypage.

Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis (MLVA)

La MLVA repose sur l'analyse de séquences répétées en tandem (*Variable Number of Tandem Repeats*, VNTR) et plus précisément du nombre de fois que ces séquences sont répétées. Chez *A. baumannii*, 8 loci sont analysés. Des codes sont attribués pour chacun d'entre eux, correspondant au nombre de répétitions. Ces codes peuvent être conservés et échangés entre laboratoire, permettant une comparaison. Cette méthode est très discriminante, plus que la PFGE à titre de comparaison, mais certains locus évoluant rapidement, ceci doit être pris en compte dans l'interprétation des résultats, en plus du fait que cette méthode soit peu reproductible.

Méthodes de typage basées sur l'analyse des séquences des gènes

L'analyse des séquences de certains gènes (qui sont différents de ceux déjà analysés en MLST) peut permettre de faire la distinction entre certains clones différents. On parle de SLST (*Single Locus Sequence Typing*). Ainsi *adeB*, gène codant pour une protéine impliquée dans le système d'efflux AdeABC, peut être séquencé et utilisé pour comparer différents isolats. Son utilisation a d'ailleurs démontré des résultats proches d'autres méthodes de typage, telles que le ribotypage, l'AFLP, la PFGE ou encore la REP-PCR. De plus, cette méthode a montré une bonne discrimination entre isolats provenant de différents endroits géographiques et prélevés à différentes périodes (Huys et al., 2005). D'autres gènes ont également été utilisés, tels que *rpoB*, *recA* ou encore *bla_{OXA-51-like}*. Cette méthode est rapide et simple, mais offre un pouvoir discriminant faible. L'analyse de plusieurs gènes en simultané permet une meilleure discrimination des souches. Turton et collègues ont utilisé les gènes *ompA*, *csuE* (impliqué dans la formation de biofilm) et *bla_{OXA-51-like}* (méthode 3-LST). La comparaison des

combinaisons d'allèles a permis de faire la distinction entre les isolats mais reste toutefois moins discriminante que la PFGE (Turton et al., 2007).

Le Multi-Locus Sequence Typing (MLST)

Le MLST (pour *Mutli-Locus Sequence Typing*) est devenu rapidement un outil puissant pour déterminer la proximité génétique de souches bactériennes. Cette méthode repose sur le séquençage de 7 gènes de ménage, qui seront chacun associés à un numéro en fonction de leur séquence, et dont la combinaison globale déterminera un ST (*Sequence Type*). Contrairement au champ pulsé (PFGE), qui n'était pas reproductible entre différents laboratoires, limitant ainsi les études à une investigation locale, le MLST permet une comparaison entre tous les isolats, quel que soit leur lieu d'isolement. Pour *A. baumannii*, il existe deux schémas MLST (composés chacun de 7 gènes de ménage) que l'on appelle schéma d'Oxford (ou anciennement de Bartual) et schéma de Pasteur (Bartual et al., 2005; Diancourt et al., 2010). Aujourd'hui, ce sont 2460 ST qui ont été décrits en utilisant le schéma de Pasteur et 3223 ST en utilisant celui d'Oxford (<https://pubmlst.org/organisms/acinetobacter-baumannii>, consulté le 14/08/2023).

Les ST pouvant varier avec l'apparition d'une seule mutation, le concept de complexe clonal (CC) permet de regrouper ensemble différents ST qui ne diffèrent que d'un ou deux allèles, et ainsi de conserver une vision plus globale de souches qui, même si elles ne partagent pas le même ST, restent proches entre elles.

Whole Genome Sequencing (WGS)

L'avantage de cette méthode est qu'elle permet l'analyse complète du génome et a ainsi un pouvoir discriminant très important. Là où la technique de champ pulsé (PFGE) nécessite un certain nombre de mutations pour permettre une distinction, très peu sont nécessaires pour mettre en évidence la clonalité ou non d'isolats par analyse WGS. Cette méthode est également de plus en plus utilisée, de par son utilité pour d'autres types d'analyses (présence de gènes de résistance et/ou de virulence, ...) et de son coût qui diminue progressivement. La présence de nombreuses séquences d'insertion (IS) dans les génomes de *A. baumannii* peut toutefois poser problème lors de la réalisation d'assemblage des génomes et limiter toute analyse concernant les réarrangements génétiques. Coupler des méthodes de séquençages *short reads* et *long reads* peut être un moyen de s'affranchir de ces contraintes. Toutefois ces techniques ne sont pas accessibles à tous les laboratoires et requièrent des compétences suffisantes en bio-informatique pour l'analyse et l'interprétation des résultats.

3.2. Distribution clonale de *A. baumannii*

Un grand nombre d'épidémies provoquées par *A. baumannii* a déjà été rapporté (Aygün et al., 2002; Peleg et al., 2008). A l'échelle mondiale, il est estimé que 8,8 % des infections bactériennes sont provoquées par *Acinetobacter* spp. (Spencer, 1996; Vincent et al., 2009). Ces chiffres varient de manière importante entre les pays et une étude avait mis en évidence une prévalence de ces infections de 3,6 % en Europe (Vincent et al., 2006). La répartition mondiale est cependant assez inégale, avec une prévalence plus importante en Asie (19,2 %), suivie par l'Europe de l'est (17,1 %), l'Afrique (14,8 %), l'Amérique du sud (13,8 %), l'Europe de l'ouest (5,6 %), l'Océanie (4,4 %) et enfin l'Amérique du nord (3,7 %) (Vincent et al., 2009). En Europe, une augmentation de la prévalence des infections à *Acinetobacter* est globalement constatée chaque année depuis 2014 (Lötsch et al., 2020). Entre 2019 et 2021, c'est le double du nombre d'isolats qui a été rapporté (5 375 contre 10 885) d'après le rapport 2023 de l'ECDC¹ (European Centre for Disease Prevention and Control, 2023). La collecte des données se fait par l'envoi des informations concernant les souches à l'EARS-Net², coordonné par l'ECDC, d'après un protocole défini disponible sur leur site internet (<https://www.ecdc.europa.eu/en>). *Acinetobacter* spp. était le pathogène le moins retrouvé parmi les 8 sous surveillance de l'EARS-Net en 2020 (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *E. faecalis* et *E. faecium*), mais il est repassé à l'avant dernier rang, avec 6 % des isolats rapporté à l'EARS-Net en 2021 (European Centre for Disease Prevention and Control, 2023).

Les isolats de *A. baumannii* responsables d'infections sont groupés en clones, disséminés sur plusieurs voire tous les continents, ce qui leur vaut leur qualification de clones internationaux (ou *International Clonal Lineage*, ICL). L'identification de ces clones a été réalisée grâce à différentes méthodes de typage, notamment l'AFLP et le ribotypage (Dijkshoorn et al., 2007). Les clones les plus prévalents sont les ICL I et ICL II, prédominants en particulier dans les épidémies en Europe (Dijkshoorn et al., 1996; Karah et al., 2012). Un troisième clone, dénommé ICL III, a été mis en évidence un peu plus tardivement que les autres (Van Dessel et al., 2004). D'autres clusters, dénommés cluster A à D, ont également été mis en évidence par AFLP pour des souches isolées dans différents pays, d'Europe principalement mais aussi en Australie ou au Brésil (Nemec et al., 2007).

La méthode de MLST a également permis de mieux comprendre la répartition clonale de *A. baumannii* à l'échelle mondiale. La répartition des complexes clonaux (CC) en particulier démontre la plus forte prévalence de certains. Cette technique de typage montre des résultats cohérents avec ce qui est retrouvé en AFLP ; ainsi les complexes clonaux identifiés grâce au schéma MLST de Pasteur (CC1^{Pas} à CC3^{Pas}) correspondent aux ICL I à III, respectivement.

¹ ECDC : European Centre for Disease Prevention and Control.

² EARS-Net : European Antibiotic Resistance Surveillance Network.

Finalement, que ce soit par la détermination des complexes clonaux ou des ICL, les CC1^{PaS} (ICL I, également retrouvé sous le nom de GC1 (pour *Global Clone 1*) et CC2^{PaS} (ICL II ou encore *Global Clone 2*) sont relativement proches, et sont les clones majoritairement retrouvés aujourd'hui à travers le monde, à l'exception toutefois de certains pays ([Hamidian & Nigro, 2019](#)).

II. Antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules naturelles, synthétiques ou hémi-synthétiques permettant l'inhibition de la croissance bactérienne. Leur utilisation en médecine est récente, mais il est estimé que ces molécules existent depuis des millions d'années (entre 150 et 400 millions d'année) (Gross, 2019). Des traces de tétracycline ont été retrouvées dans des os humains ayant vécu entre 350 et 550 ans après JC, probablement en raison de leur alimentation et donc d'une ingestion plutôt involontaire (Bassett et al., 1980). C'est le XX^{ème} siècle qui marque véritablement l'utilisation des antimicrobiens, avec le développement d'un composé contre l'agent de la syphilis en 1910, l'arsphénamine, initialement connu sous le nom de « 606 » puis Salvarsan, par Ehrlich et ses collègues (Ehrlich et al., 1910). Les premiers antibiotiques à proprement parlé ont été découverts en 1929, lors des expérimentations de Sir Alexander Fleming, lorsque celui-ci constate qu'un champignon, *Penicillium notatum*, produit une molécule capable d'inhiber la pousse de *Staphylococcus aureus* ; il s'agit de la pénicilline G (Fleming, 1929). En raison de la Seconde Guerre Mondiale, le développement des antibiotiques montre un intérêt stratégique pour le traitement des soldats, et la recherche s'accélère. L'efficacité de la pénicilline n'est prouvée *in vivo* qu'en 1939 par Florey et son équipe, et il faudra encore attendre mars 1942 pour qu'elle permette de guérir les premiers patients (Manring et al., 2009). Un usage à plus large échelle a été réalisé en novembre 1942 lorsqu'une troupe américaine a réalisé un assaut à Oran, en Algérie (Manring et al., 2009; C. Murray et al., 2008). Une production de masse est alors lancée, permettant l'utilisation de la pénicilline de manière importante par les soldats lors du débarquement en Normandie de 1944 (Manring et al., 2009; Swann, 1983). Mais il faudra attendre les années 1960 pour que l'utilisation à grande échelle et surtout la synthèse en quantité importante ne prenne effet (Boyd et al., 2021).

L'utilisation de ces traitements pour le grand public permettra encore une fois de démontrer l'efficacité de ces derniers, notamment par le taux de mortalité plus faible qu'avec les traitements de référence utilisés avant introduction des antibiotiques (Dowling & Léiper, 1951). Une baisse importante de la mortalité liée aux maladies infectieuses a été observée entre 1938 et 1954, perdurant jusqu'aux années 1980, ce qui coïncide avec l'utilisation de la pénicilline, la streptomycine et des sulfonamides (Armstrong et al., 1999).

Cependant, après une période riche en découverte de nouvelles molécules entre les années 1940 et 1960 (qualifiée de « *golden age* »), la fin du XX^{ème} siècle marque quant à elle un vide (Lewis, 2013). Entre 1962 (découverte de l'acide nalidixique) et 2000 (découverte du linézolide), aucune molécule possédant un nouveau mécanisme d'action n'a été découverte (Walsh & Wencewicz, 2014) (Figure 3).

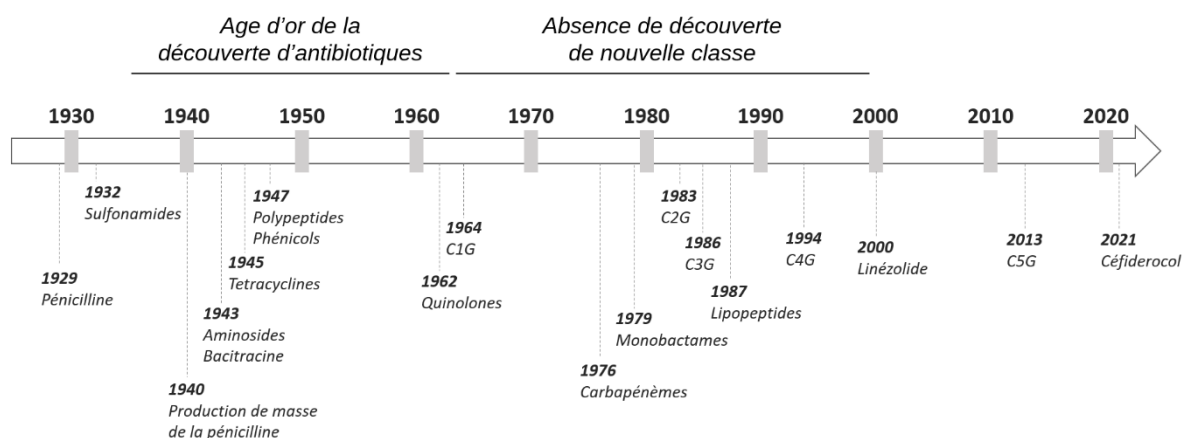


Figure 3 : Frise chronologique d'apparition des différentes classes d'antibiotiques. D'après Walsh & Wencewicz, 2014 (Walsh & Wencewicz, 2014).

Ce gouffre peut s'expliquer par différents facteurs, dont le coût de production, en augmentation depuis les années 2000, et estimé en moyenne à 2 milliards de dollars jusqu'à la phase pré-clinique (estimation pour l'année 2013) (DiMasi et al., 2016). En plus du coût important, il est estimé que seules 1 à 2 molécules seront approuvées par la FDA³ sur un panel de départ de 10 000 (Boyd et al., 2021). S'ajoute à cela un troisième facteur, qui est la complexité à trouver de nouvelles molécules candidates (Wright, 2014). Globalement, ces facteurs rendent la recherche de nouvelles molécules peu attrayante pour les industries pharmaceutiques (Boyd et al., 2021). Depuis 2010, très peu de nouvelles molécules antibiotiques ont été acceptées et mises sur le marché. Une autre stratégie consiste aussi à réutiliser d'anciennes molécules qui n'étaient plus utilisées, comme la colistine, notamment à cause d'une toxicité importante (Tableau 2).

Le développement d'antibiotiques reste par conséquent complexe, et plusieurs pistes sont explorées, comme la recherche d'organismes capables de produire des antibiotiques et qui n'auraient pas encore été découverts. Cette recherche se base sur le constat que la majorité des organismes de l'environnement ne sont pas cultivables en laboratoire (Schloss & Handelsman, 2004). La recherche se fait par exemple dans les sols, comme dans les sols de sable rouge de Jordanie, qui ont été décrits pour avoir une activité bactéricide sur *S. aureus* et *Micrococcus luteus*, probablement en raison de la présence de microorganismes, possiblement des bactéries, producteurs d'antibiotiques (Falkinham et al., 2009). Des études ont également démontré que des plantes marines produisent des métabolites secondaires ayant des propriétés anti-microbiennes, sans doute pour se défendre contre leurs pathogènes habituels (Engel et al., 2006; Puglisi et al., 2007).

³ FDA : Food and Drug Administration ; organisme américain entre autres responsable de la commercialisation des médicaments aux États-Unis.

Malgré la difficulté à trouver de nouvelles molécules, le marché des antibiotiques est important. En 2002, il s'élevait à 25 millions de dollars américains, et il est estimé que 50 % des antibiotiques utilisés sont des β -lactamines (Coates et al., 2002).

Tableau 2 : Nouveaux antibiotiques sur le marché depuis 2010 et anciennes molécules réutilisées récemment.

Nom	Classe	Combinaison	Mise sur le marché	Spectre - recommandations	Référence
Nouvelles molécules depuis 2010					
Ceftaroline	C5G	non	2012	Proche céfotaxime ; SARM	(Charles et al., 2017)
Ceftobiprole	C5G	non	2014	Proche céfépime ; SARM <i>P. aeruginosa</i>	(Charles et al., 2017)
Tigécycline	Cycline	non	2005	Staphylocoques, bactéries anaérobies, certains BGN, quelques souches de <i>A. baumannii</i>	(Livermore, 2005)
Eravacycline	Cycline	non	2018	Staphylocoques, bactéries anaérobies, certaines BGN, quelques souches de <i>A. baumannii</i>	(Y. R. Lee & Burton, 2019)
Délaflaxacine	Fluoroquinolone	non	2019	SARM	(Bondeelle et al., 2019)
Dalbavancine	Glycopeptide	non	2015	BGP	(Boisson & Mimoz, 2018)
Tédizolide	Oxazolidinones	non	2015	BGP	(Charles et al., 2017)
Ceftolozane-tazobactam	Nouvelle C3G	oui	2015	Certaines souches de <i>P. aeruginosa</i> et Entérobactéries	(Bondeelle et al., 2019)
Ceftazidime-avibactam	Nouvelle C3G	oui	2016	Certaines souches de <i>P. aeruginosa</i> et Entérobactéries	(Bondeelle et al., 2019)
Méropénème-vaborbactam	Carbapénème	oui	2018	Entérobactéries KPC	(Zhan et al., 2018)
Imipénème-rélébactam	Carbapénème	oui	2020	Entérobactéries KPC Certaines souches de <i>P. aeruginosa</i>	(Zhan et al., 2018)
Anciennes molécules de nouveau utilisées depuis les années 2000					
Colistine	Polymyxines	non	1950 AMM 2016	Traitement des infections sévères dues à des BGN si options thérapeutiques limitées ou inexistantes	(Biswas et al., 2012)
Témocilline	Pénicilline	non	1980 Réutilisation dans les années 2010	Proche de la ticarcilline, Spectre étroit sur certains BGN	(Livermore & Tulkens, 2009)

SARM : S. aureus résistant à la méticilline ; BGN : Bactéries à Gram Négatif ; BGP : Bactéries à Gram Positif ; KPC : Klebsiella pneumoniae carbapenemase.

Aujourd'hui, les β -lactamines représentent la classe la plus utilisée d'antibiotiques, en raison du grand nombre de molécules disponibles, du grand nombre de prescriptions, de la facilité de synthèse et enfin de la faible toxicité des molécules de cette famille.

1. Les β -lactamines

1.1. Généralités

Les β -lactamines ont toutes pour point commun de porter un noyau β -lactame. Différentes classes existent, dépendant des substituants de ce noyau β -lactame. Ainsi, on retrouve les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes et enfin les monobactames, avec des points communs propres à chacune des classes (**Figure 4**).

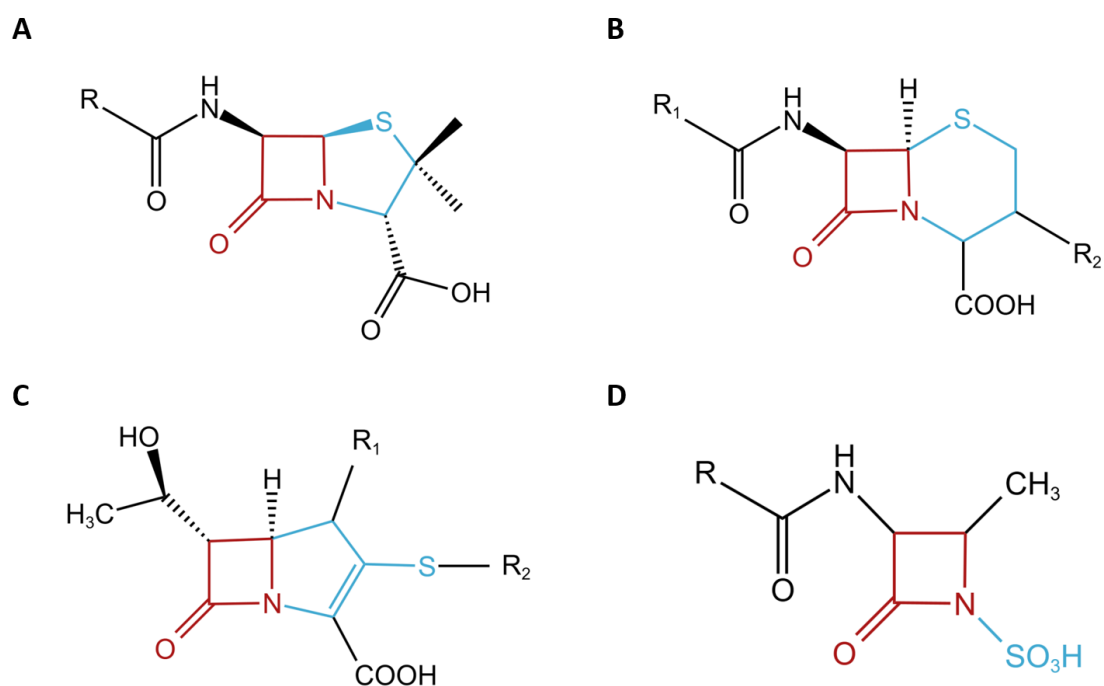


Figure 4 : Représentation des structures chimiques des β -lactamines. En rouge, le noyau β -lactame, commun à toute les β -lactamines. En bleu, la partie spécifique à chaque sous-classe. **A** : Structure générale des pénicillines ; **B** : Structure générale des céphalosporines ; **C** : Structure générale des carbapénèmes ; **D** : Structure générale des monobactames.

1.2. Les pénicillines

Les pénicillines sont toutes porteuses d'un cycle thiazolidine et une chaîne variable sur le carbone 6. Elles regroupent plus d'une vingtaine de molécules divisées en 7 sous-groupes (le groupe A, le groupe G et V, le groupe M, les carboxy-pénicillines, les uréido-pénicillines, les amidino-pénicillines et enfin les autres pénicillines). Leur spectre d'action est large et dépend surtout des sous-groupes, avec une action principalement contre les bactéries à Gram positif, les anaérobies et certaines bactéries à Gram négatif pour les benzylpénicillines et les aminopénicillines, et inversement, une action moins importante sur les Gram positifs, mais un spectre plus large pour les Gram négatifs, incluant

notamment *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* dans le cas des carboxy- et uréido-pénicillines.

1.3. Les céphalosporines

Les céphalosporines ont pour point commun un hétérocycle thioazoté à 6 atomes (thiazine). Elles sont réparties en générations, allant des céphalosporines de première génération à celles de cinquième génération. Ces générations représentent l'ordre chronologique d'apparition des molécules et chaque nouvelle génération marque une nouveauté dans les propriétés d'action par rapport à la génération précédente. Cela impacte notamment le spectre des molécules ; les céphalosporines de première génération (C1G) ont une efficacité plus marquée contre les bactéries à Gram positif, tandis que pour les céphalosporines de troisième génération (C3G), l'efficacité est accrue pour les bactéries à Gram négatif, avec une action encore plus importante sur *Pseudomonas aeruginosa* pour certaines céphalosporines de troisième génération. Les C4G ont un spectre plus large, avec une très faible affinité pour les céphalosporinases et en revanche, une bonne affinité pour les PLP, permettant ainsi qu'elles agissent avant d'être hydrolysées, même chez des souches surproductrices de céphalosporinases. Enfin, les C5G ont notamment une action sur les *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM).

Certaines céphalosporines peuvent également être regroupées par rapport aux groupements chimiques retrouvés sur leur chaîne latérale R1. Ainsi, les oxyimino-céphalosporines regroupent les molécules qui présentent un groupement oxyimino ($N=C-C=O$) sur cette chaîne latérale. On retrouve notamment la ceftazidime, le cefotaxime et le céfépime dans ce groupe.

Une nouvelle classe, les céphalosporines sidérophores, n'est représentée que par le céfidérol, molécule ayant reçu une autorisation temporaire de mise sur le marché en 2020. Cet antibiotique, tout d'abord nommé S-649266, est constitué d'un sidérophore relié à un noyau céphalosporine et d'une chaîne latérale comportant des similitudes avec la ceftazidime et le céfépime (**Figure 5**). Son activité a été démontrée sur des bactéries à Gram négatif, telle que les Entérobactéries ([Kohira et al., 2016](#)), mais également *P. aeruginosa* ou encore *A. baumannii* ([Yamano, 2019](#)), mais n'est en revanche pas actif sur les bactéries à Gram positif et les bactéries anaérobies ([Simner & Patel, 2020](#)). De manière intéressante, le céfidérol a montré une activité sur des souches productrices de carbapénèmases, telle que KPC, VIM ou IPM ([Kohira et al., 2016](#)). Le céfidérol a également démontré une meilleure stabilité que d'autres molécules, comme la ceftazidime ou le méropénème, vis-à-vis des carbapénèmases ([Ito-Horiyama et al., 2016](#)).

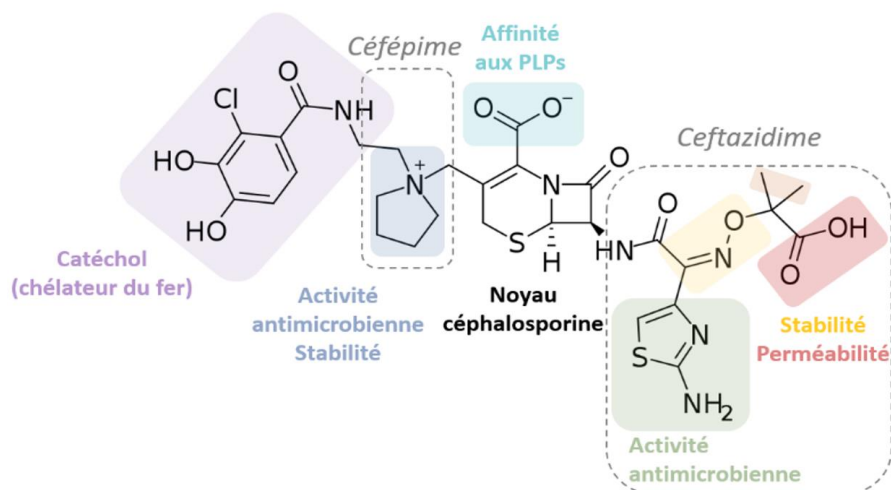


Figure 5 : Représentation de la structure chimique du céfidérocol. Les propriétés antimicrobiennes de cette molécule proviennent des différents groupements présents sur la molécule et plusieurs de ces groupements contribuent également à la stabilité de la molécule. Elle comporte un groupement catéchol (en violet) permettant de chélater le fer, ce qui par la suite permettra l'entrée dans la bactérie.

L'avantage des antibiotiques couplés à un sidérophore est que la partie antibiotique n'a pas besoin de se scinder du sidérophore pour être active (la localisation de la liaison au sidérophore n'étant pas la même que celle de liaison aux PLP (Möllmann et al., 2009).

La stratégie du cheval de Troie, nommée ainsi en raison de l'entrée « inhabituelle » dans la bactérie grâce aux récepteurs du fer (cf. II.2.1. *Entrée des antibiotiques dans la bactérie*), est intéressante car le fer est un composant essentiel au fonctionnement bactérien. En effet, le fer intervient comme cofacteur de multiples enzymes, notamment impliquées dans la synthèse de l'ADN ou des ARN. Les bactéries ont généralement besoin d'une concentration allant de 0,3 à 1,8 μM de fer environ pour une croissance optimale. Les concentrations dans les sols sont inférieures à 0,1 μM et proches de 10^{-9} μM chez un hôte mammifère (Vasil & Ochsner, 1999). Or, la concentration en fer est un déterminant critique pour l'activité du céfidérocol et de ce fait, les conditions d'expérimentation *in vitro* en milieu dépleté en fer se rapprochent des conditions *in vivo* (Ito et al., 2016). En effet, l'expression des systèmes impliqués dans la prise en charge de cet élément est dépendante de la concentration en fer environnante ; une faible concentration entraîne une surproduction de ces systèmes afin de pallier au manque de fer dans l'environnement bactérien et rendre la prise en charge la plus efficace possible (cf. II.2.1. *Entrée des antibiotiques dans la bactérie*).

1.4. Les carbapénèmes

Cette classe ne regroupe que 5 molécules, à savoir l'imipénème, le méropénème, le doripénème, l'ertapénème et le tébipénème. Cette dernière a un spectre large, mais n'est commercialisée qu'au Japon. Le doripénème n'est quant à lui plus commercialisé depuis 2014. Toutes possèdent un noyau carbapénème. Elles possèdent une bonne stabilité envers de nombreuses β -lactamases, n'étant en général pas hydrolysées par ces dernières, même dans le cas des β -lactamases à spectre étendu. Les carbapénémases peuvent toutefois, comme leur nom l'indique, hydrolyser ces molécules. Ces antibiotiques sont utilisés dans les cas d'infections sévères à bactéries à Gram négatif multi-résistantes. L'ertapénème n'est cependant pas actif sur *Enterococcus* spp., *P. aeruginosa* et *A. baumannii*.

1.5. Les monobactames

Les monobactames ne portent qu'un seul cycle, le noyau β -lactame. Les molécules appartenant à cette famille n'ont pas de point commun précis, si ce n'est qu'un atome de soufre lié à plusieurs atomes d'oxygène est présent sur leur chaîne latérale reliée à l'atome d'azote du noyau β -lactame. Le spectre ne s'étend qu'aux bactéries à Gram négatif. L'aztréonam, seul monobactame commercialisé, est efficace contre les entérobactéries et *P. aeruginosa*, mais ne l'est pas en revanche contre *A. baumannii*.

1.6. Les inhibiteurs de β -lactamases

La découverte du premier inhibiteur, l'acide clavulanique, date de 1976. Il est produit par une souche de *Streptomyces clavuligerus* (Brown et al., 1976). D'autres inhibiteurs seront découverts par la suite, comme le sulbactam et le tazobactam en 1982. Ils sont utilisés couplés à d'autres β -lactamines et leur intérêt est principalement leur capacité à se lier de manière non réversible aux β -lactamases, permettant ainsi à la β -lactamine de ne pas être hydrolysée et donc de conserver son action antimicrobienne. Ces inhibiteurs sont soit de type DBO (*Diazobicyclooctanone*) comme dans les combinaisons ceftazidime/avibactam, imipénème/relebactam ou de type *boronate* comme dans le cas du méropénème/vaborbactam (Papp-Wallace, 2019). Il est tout de même à noter que les inhibiteurs ne sont pas capables de se lier à toutes les β -lactamases, et par conséquent, ne permettent pas de toutes les neutraliser. Les inhibiteurs ont une activité antibiotique assez faible, bien que le sulbactam soit une exception, avec une action antibiotique sur quelques bactéries, comme *A. baumannii*.

L'activité de certaines combinaisons β -lactamine/inhibiteur sur certaines β -lactamases, qui sont présentées plus en détail dans le paragraphe dédié (III.1.1. Les β -lactamases), a été évaluée chez *A. baumannii* :

Sulbactam-durlobactam

Comme évoqué précédemment, le sulbactam, habituellement utilisé comme inhibiteur, joue ici le rôle de la β -lactamine en raison de sa forte affinité pour la PLP3 de *A. baumannii*. Le durlobactam, quant à lui, est capable d'inhiber les β -lactamases de classe A, C et D (*III.1.1. Les β -lactamases*), et ainsi d'avoir une action sur les principales β -lactamases retrouvées dans les souches de *A. baumannii* résistantes aux antibiotiques. Le durlobactam est également capable d'inhiber la PLP2 de *A. baumannii* (Papp-Wallace, 2019).

Céfépime-zidebactam

Cette combinaison ne présente pas une très bonne activité sur des souches de *A. baumannii* *in vitro*. Cependant, dans des modèles murins infectés par des souches résistantes au céfépime, elle présentait l'avantage de réduire la charge bactérienne globale (Papp-Wallace, 2019). L'hypothèse proposée pour expliquer cette différence est que l'utilisation du zidebactam impacte les propriétés de PK/PD du céfépime et accentuerait les effets de ce dernier (Bhagwat et al., 2019).

Méropénème-WCK 4234

WCK 4234 est un inhibiteur de type DBO qui présente la particularité d'être le premier de ce type à inhiber certaines β -lactamases (oxacillinasés) de manière conséquente. En combinaison avec le méropénème, cet inhibiteur a conduit à la réduction des CMI du méropénème chez des souches de *A. baumannii* produisant les oxacillinasés les plus couramment retrouvées chez cette espèce (à savoir OXA-23, OXA-24/40 et OXA-51). Cette combinaison est encore en phase préclinique (Papp-Wallace, 2019).

QPX7728

Ce composé est un inhibiteur de type *boronate* qui cible les classes A, B, C et D des β -lactamases. Dans le cas de *A. baumannii*, son utilisation avec le méropénème conduit à une réduction des CMI chez les souches productrices de carbapénémases (Nelson et al., 2020). Son activité est toutefois moins marquée chez les souches qui sont mutées sur la PLP3 en position A515. Ceci pourrait s'avérer problématique ; en effet, des substitutions sur cette position ne sont pas rares (observation sur les souches de *A. baumannii* reçues au CNR-RA de Besançon et d'autres études (Findlay et al., 2022; Naha et al., 2021)). L'antibiotique partenaire de cet inhibiteur n'est pas encore défini, notamment en raison du fait qu'en combinaison avec l'aztreonam ou le ceftolozane, cet inhibiteur conduit aussi à la réduction des CMI chez les souches de *P. aeruginosa* et d'entérobactéries (Papp-Wallace, 2019). Plusieurs combinaisons semblent donc intéressantes pour ce composé. Comme pour le composé précédent, il est également encore en phase préclinique.

GT-1 - GT-055

Le composé GT-1 est une céphalosporine-sidérophore, dont la chaîne R1 ressemble à celle de la ceftazidime. Le composé GT-055 joue le rôle d'inhibiteur dans cette combinaison. Cependant, la phase

clinique 1 a été stoppé durant avril 2019, laissant penser que cette combinaison n'est plus d'actualité (Papp-Wallace, 2019).

Finalement peu de combinaisons à ce jour présente une activité satisfaisante sur les souches de *A. baumannii*, et les composés qui pourraient avoir une activité intéressante ne sont pour la majorité encore qu'en phase pré-clinique, et pourraient même ne jamais voir le jour.

2. Mode d'action des β -lactamines

Les β -lactamines doivent leur action antibiotique par leur capacité à inhiber la synthèse de la paroi bactérienne. Cette dernière est constituée de peptidoglycane, présent chez les bactéries à Gram négatif et positif, même si l'agencement général de la paroi est différent (Figure 6).

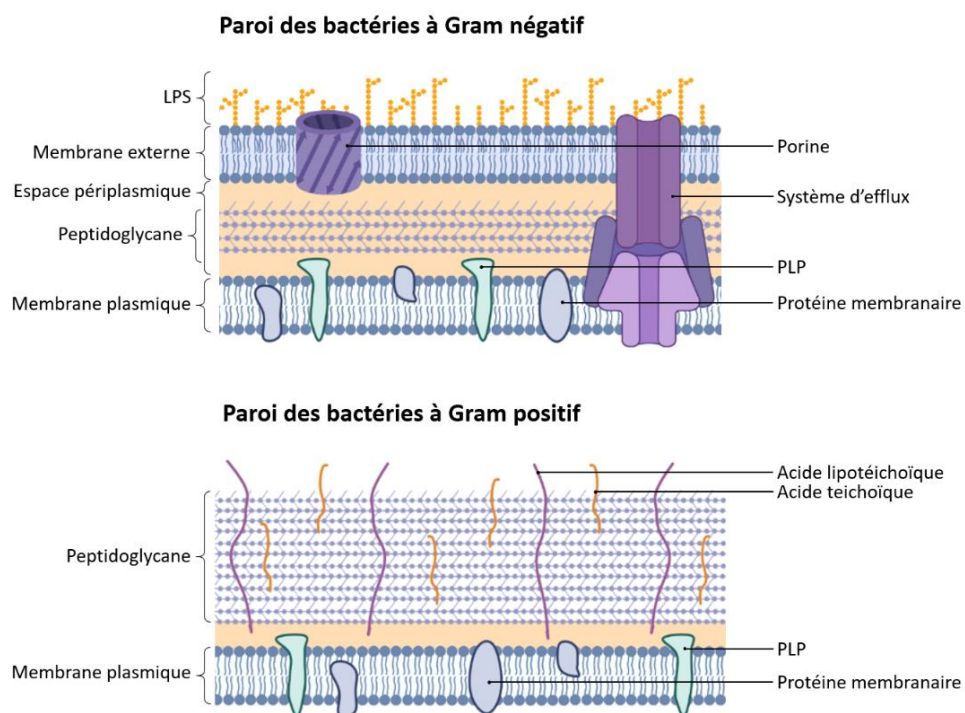


Figure 6 : Structure des parois des bactéries à Gram négatif et des bactéries à Gram positif. LPS : Lipopolysaccharide ; PLP : Protéines liant les pénicillines. Schéma réalisé avec Biorender.

2.1. Entrée des antibiotiques dans la bactérie

Avant d'atteindre leur cible, il est nécessaire que les antibiotiques puissent entrer dans la bactérie. Ceci ne peut pas se faire directement au travers des membranes, en raison de leur caractère hydrophobe. La couche de lipopolysaccharide en surface de la membrane va quant à elle constituer une barrière bloquant les composés de nature lipophile. Le passage des antibiotiques dans la bactérie doit donc se faire au travers d'un transporteur, qui peut être spécifique ou non.

Transport aspécifique

Le transport aspécifique se fait généralement grâce à des porines, qui sont des protéines membranaires de membrane externe, le plus souvent composées de feuillets β . Elles forment des cylindres dont le centre est creux, permettant ainsi le passage de certains antibiotiques. Dans tous les cas, la diffusion se fait de manière passive. Et bien que les porines ne soient pas considérées comme spécifiques au sens strict du terme, elles ne laissent pas passer l'ensemble des antibiotiques. La taille des molécules constitue un premier facteur de sélection. En général, seules les molécules de poids moléculaire inférieur à 600 Da peuvent passer aux travers des porines ([Prajapati et al., 2021](#)). Les résidus se trouvant au centre de la porine sont généralement hydrophiles, par opposition aux résidus hydrophobes externes permettant l'ancrage dans la membrane, mais leur composition peut aussi jouer sur l'affinité avec les substrats. Les porines sont souvent impliquées dans l'entrée des β -lactamines chez différentes espèces de bactéries à Gram négatif ([Prajapati et al., 2021](#)). D'autres classes d'antibiotiques peuvent toutefois utiliser les porines pour rentrer dans les bactéries, comme les fluoroquinolones ou le chloramphénicol. Les porines étant donc la voie d'entrée principale pour un certain nombre d'antibiotiques, leur perte ou altération peut aussi entraîner une apparition de la résistance à ces molécules, comme cela a pu être décrit avec OprD chez *P. aeruginosa* ou CarO chez *A. baumannii* conduisant à une résistance aux carbapénèmes ([Lister et al., 2009](#); [Mussi et al., 2005](#)).

Transport spécifique

Le transport spécifique se fait grâce à des transporteurs présentant de fortes affinités pour leurs substrats. Ainsi, même à très faible concentration, ces derniers peuvent tout de même être captés dans le milieu ([Prajapati et al., 2021](#)). Les transporteurs se lient à leur substrat, et cette particularité non retrouvée pour les transporteurs non spécifiques explique que lorsque la concentration en substrat augmente, les transporteurs spécifiques sont saturés, contrairement aux transporteurs non spécifiques.

L'utilisation des transporteurs spécifiques a été vue comme une opportunité de s'affranchir des contraintes liées au développement de la résistance provoquée par la perte de porines. De plus, ces systèmes de transport permettent en général l'acquisition de nutriment ou de molécules indispensables à la survie bactérienne. L'entrée des antibiotiques par les transporteurs du fer en particulier se révèle intéressante.

Chez *A. baumannii*, six clusters de gènes ont été mis en évidence pour contribuer à la prise en charge du fer (**Figure 7**). Le fer se trouvant sous différentes formes, chaque système est adapté pour la prise en charge d'une forme en particulier : sous sa forme Fe^{2+} (ferreux), le fer est préférentiellement pris en charge par le système codé par le cluster de gène *feo* ; l'hème est pris en charge par les systèmes codés par les clusters *hemT* et *hemO* ; enfin, la forme Fe^{3+} (ferrique) du fer est celle permettant l'interaction avec les sidérophores. Sa prise en charge peut se faire grâce au système codé par le cluster de gène *bfn* (prise en charge par le sidérophore baumannoferrine), au système codé par le cluster de gène *bas/bau* (sidérophore acinetobactine) ou encore au système codé par le cluster de gène *lbs* (sidérophore fimsbactine). *A. baumannii* est également en mesure de capter des sidérophores produits par d'autres bactéries, et que l'on qualifie alors de xenosidérophores, qui passe par d'autres transporteurs ([Moynié et al., 2017](#)). Ces systèmes sont tous régulés par Fur (*Ferric Uptake Regulator*), un régulateur en mesure de reconnaître une séquence palindromique de 25 nucléotides, nommé *Fur box sequence*, retrouvée dans les promoteurs des clusters de gènes ([Morris et al., 2019](#)). Ce régulateur fonctionne comme un répresseur lorsque la bactérie se trouve dans un environnement enrichi en fer. En revanche, il est inactif lorsque l'environnement est pauvre en fer, permettant alors l'expression des gènes codant les systèmes de transport du fer. Ceci s'explique par le fait qu'en trop grande quantité, le fer peut entraîner la production de radicaux libres qui sont toxiques pour la bactérie ([Noinaj et al., 2010](#)).

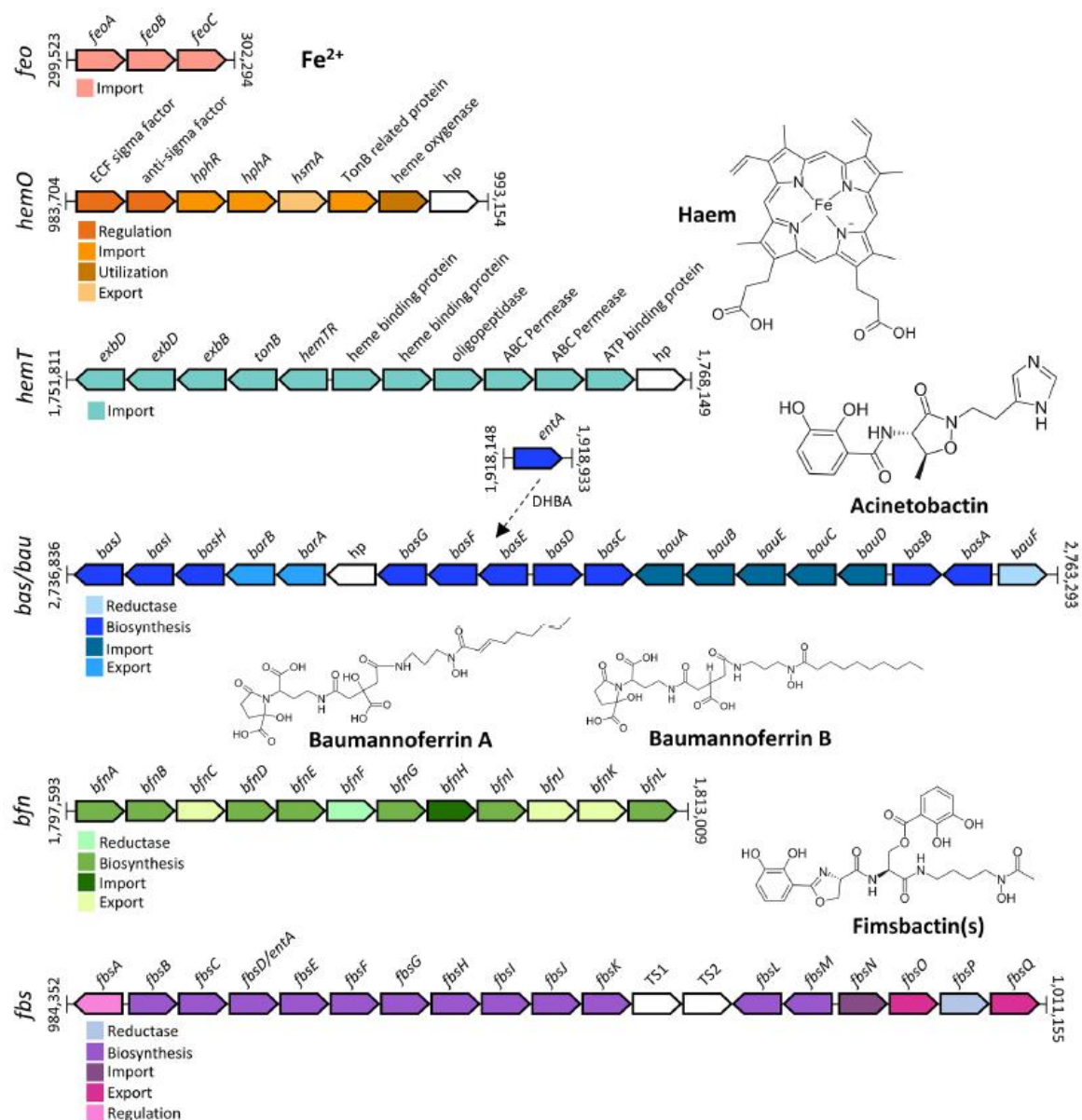


Figure 7 : Les différents clusters de gènes impliqués dans la prise en charge du fer chez *A. baumannii*. Les annotations sont basées sur le génome de référence de la souche de *A. baumannii* ACICU (NZ_CP031380.1), à l'exception du cluster *fbs*, basé sur le génome de la souche de *A. baumannii* ATCC 17978 (NZ_CP012004.1). Les fonctions des gènes sont représentées par différentes couleurs. Lorsque la fonction d'un gène n'est pas connue, celui-ci est coloré en blanc. Hp : hypothetical protein. D'après Artuso et al. 2023 (Artuso et al., 2023).

Comme il l'a été évoqué précédemment, le céfidérol utilise les systèmes de transport du fer afin de rentrer dans la bactérie (**Figure 8**). Ces transporteurs font intervenir plusieurs acteurs : les transporteurs en tant que tel, permettant l'entrée du conjugué antibiotique-sidérophore, et des systèmes qui permettent de fournir l'énergie nécessaire pour le fonctionnement des transporteurs (**Figure 9**). Les transporteurs dépendants de TonB sont ceux le plus souvent impliqués dans la prise en charge des sidérophores et donc du céfidérol (Rayner et al., 2023). Ces transporteurs interviennent aussi dans la prise en charge de la vitamine B₁₂ et des carbohydrates (Noinaj et al., 2010).

De manière générale, en absence d'antibiotique, les sidérophores sont relargués dans le milieu extracellulaire, afin de capter et former un complexe avec le fer qui s'y trouve (généralement sous la forme Fe^{3+}). Ce complexe est ensuite reconnu par les transporteurs du fer. Ces derniers peuvent être spécifiques des espèces et/ou du sidérophore présent dans le complexe.

Un complexe tripartite TonB (composé des protéines TonB, ExbB et ExbD) intervient ensuite pour fournir l'énergie requise au transporteur pour permettre le passage du complexe fer-sidérophore grâce à la force proton-motrice. Chez *A. baumannii* il existe trois orthologues de *tonB*, mais seul l'orthologue *tonB3* est essentiel pour la prise en charge du fer et la croissance de la bactérie en conditions déplétées en fer (Artuso et al., 2023). Le complexe fer-sidérophore se retrouve alors dans l'espace périplasmique, où sa prise en charge dépend du sidérophore impliqués. Les sidérophores sont ensuite transportés jusqu'au transporteurs ABC (*ATP-binding cassette*), qui permettent alors aux sidérophores de traverser la membrane périplasmique, où le complexe fer-sidérophore se délie.

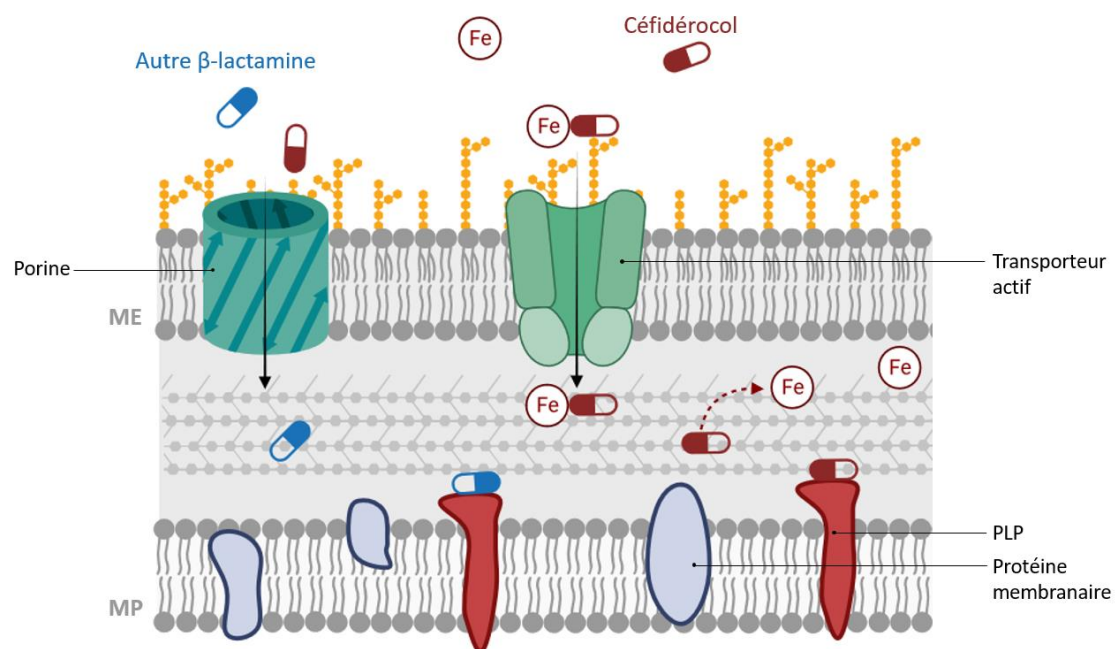


Figure 8 : Mécanisme d'entrée des antibiotiques par voie passive (porines) ou active (transporteurs spécifiques). ME : membrane externe ; MP : membrane périplasmique. Le céfidérol présente la particularité de pouvoir utiliser les transporteurs du fer pour entrer dans la bactérie, en plus d'une entrée passive via les porines comme les autres β-lactamines. Schéma réalisé avec Biorender.

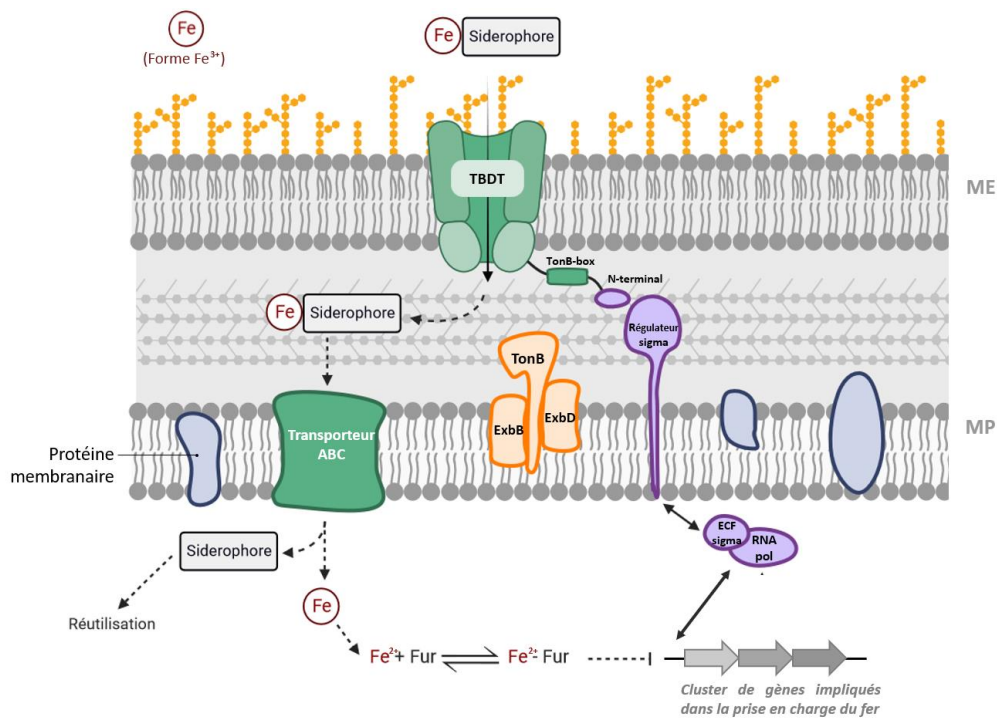


Figure 9 : Entrée des sidérophores et régulation. Le transporteur dépendant de TonB est ici schématisé en vert (TBDT, pour TonB Dépendant Transporter). Le complexe TonB (TonB-ExbB-ExbD) qui fournit l'énergie au transporteur est en orange. Le transfert d'énergie se fait grâce à une interaction entre le complexe TonB et le motif TonB-box. Une fois dans l'espace périplasmique, le complexe fer-sidérophore peut passer la membrane plasmique grâce à un transporteur de type ABC (vert foncé). Le fer sous sa forme ferrique (Fe^{3+}) est réduit pour passer sous sa forme de fer ferreux (Fe^{2+}). Sous cette forme, le fer peut se lier au régulateur Fur, qui va alors inhiber la transcription des clusters de gènes qui sont impliqués dans la prise en charge du fer (gris). Dans certains cas, comme chez *E. coli*, les TBDT sont aussi régulés par des systèmes de facteurs σ et anti- σ . C'est le cas du transporteur FecA, dont la partie N-terminale (violette) interagit avec le régulateur FecR (violet, « régulateur sigma ») et le facteur σ FecI (ECF sigma, violet). Ce dernier se lie ensuite à l'ARN polymérase (violet, « RNA pol ») et permet la régulation de la transcription. D'après Noinaj et al., 2010 (Noinaj et al., 2010). Schéma réalisé avec Biorender.

2.2. La cible des β -lactamines : les PLPs et mécanisme d'action

Le mode d'action des β -lactamines repose sur leur interaction possible avec les Protéines Liant les Pénicillines (PLP, aussi dénommées PBP pour *Penicillin Binding Proteins*), entraînant une inhibition des fonctions de ces dernières. Ces protéines sont impliquées dans la synthèse du peptidoglycane qui est composé d'un motif répété divisé en N-acétylglucosamine et d'acide N-acétyl muramique. L'acide N-acétyl muramique porte un pentapeptide, lui-même terminé par deux résidus de D-alanine (motif D-Ala-D-Ala) (Figure 10).

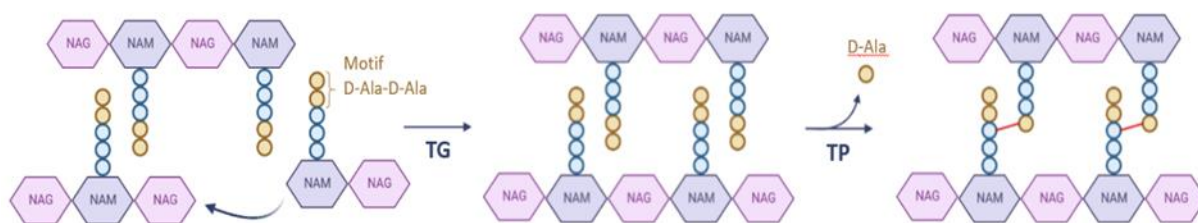


Figure 10 : Synthèse du peptidoglycane. TG : transglycosidase ; TP : transpeptidase ; NAG : N-acétylglucosamine ; NAM : acide N-acétylmuramique.

Les PLP sont généralement divisées en deux groupes : les PLP de haut poids moléculaire (*High Molecular Mass*, HMM) ou de faible poids moléculaire (*Low Molecular Mass*, LMM). Les HMM sont généralement celles qui participent activement à la synthèse du peptidoglycane, alors que les LMM sont plus spécialisées et jouent d'autres rôles dans le métabolisme cellulaire.

Le rôle des PLPs est toutefois déterminé par leurs activités enzymatiques, qui permettent une autre classification. Ainsi sont regroupées dans la classe A les PLP dont la partie N-terminale permet une activité glycosyltransférase, servant à l'élongation des chaînes de glycanes. Les PLP de classe B quant à elles ont une partie N-terminale probablement impliquée dans la morphologie cellulaire ; cette partie interagit avec d'autres protéines qui interviennent dans le cycle cellulaire. Pour ces deux classes, les parties C-terminale des protéines sont capables d'exercer une activité transpeptidase. Cette activité enzymatique, en plus de l'activité transglycosidase des PLP de classe A, est aussi particulièrement impliquée dans la synthèse du peptidoglycane puisqu'elle permet de relier les sous-unités de peptidoglycane entre elles (**Figure 10**). Une classe C existe également, et se démarque des classes A et B par une activité DD-carboxypeptidase haute et une capacité d'hydrolyse rapide des fragments de peptidoglycane (Clarke et al., 2009). Les pénicillines ciblent les PLP car elles présentent une homologie structurale avec le motif D-Ala-D-Ala et vont ainsi entrer en compétition avec la synthèse de la paroi (**Figure 10**).

Les PLP sont retrouvées chez la quasi-totalité des bactéries, le peptidoglycane étant un composé essentiel de la paroi bactérienne, permettant une résistance à la pression. Des exceptions sont toutefois à noter, comme pour les Mycoplasmes et certaines souches bactériennes dites « de forme L », qui sont des bactéries ayant perdu leur capacité à former une paroi de manière temporaire ou permanente (Errington, 2017). Le type et le nombre de PLPs chez les différentes espèces bactériennes sont variables (Sauvage et al., 2008). Le nombre de PLPs peut aussi varier d'une souche à l'autre (Gehrlein et al., 1991; Urban et al., 1995).

Peu d'études ont été menées sur les PLPs de *A. baumannii* en comparaison à d'autres espèces telles que *P. aeruginosa* ou *E. coli*. Les PLPs de *A. baumannii* ne présentent que 30 à 50 % d'homologie avec

leurs orthologues chez *E. coli* ou *P. aeruginosa* (Cayô et al., 2011). Une description de leurs rôles physiologiques ainsi que les molécules antibiotiques qui les ciblent est proposée dans les paragraphes ci-dessous :

La PLP1a/b

Cette PLP intervient dans la synthèse du peptidoglycane et la division cellulaire. La PLP1a se situe sur le site de division cellulaire et il a été supposé qu'elle contribue donc à la formation de la cellule fille (K. Kang et al., 2021). L'expression de PLP1a mutée dans le site d'activité GTPase (E92Q) a montré que cette dernière n'était pas présente au niveau du peptidoglycane septal, et ainsi que l'activité GTPase est importante à la fois pour la localisation de l'enzyme mais aussi pour la bonne division cellulaire. Concernant les antibiotiques, la PLP1 est inhibée par le sulbactam (Penwell et al., 2015). Les mutants de délétion de la PLP1a sont également moins sensibles aux β -lactamines (à l'exception des carbapénèmes), démontrant l'importance de la PLP1a dans la sensibilité à cette classe d'antibiotiques (K. Kang et al., 2021). Seule la délétion de *mrcA*, codant la PLP1a, entraîne une baisse de fitness, la délétion de *mrcB* (codant la PLP1b) n'ayant pas d'impact sur cet aspect. Par ailleurs, la PLP1a peut compenser une délétion de la PLP1b mais l'inverse n'est pas vrai (K. Kang & Boll, 2022).

La PLP2

Cette PLP codée par le gène *mrdA* forme un complexe avec une autre protéine, RodA, afin de participer à l'élongation cellulaire et a besoin notamment de zinc pour fonctionner. Il est à noter que cette PLP n'est pas essentielle pour *A. baumannii* en condition de laboratoire (Micelli et al., 2023, p. 2). Elle n'est pas inhibée par le sulbactam mais jouerait en revanche un rôle dans la résistance à l'aztréonam (Penwell et al., 2015; Toth et al., 2022).

La PLP3

Cette PLP n'a que 40 % d'homologie avec ses orthologues chez d'autres espèces, comme la souche PAO1 de *P. aeruginosa* (Adams et al., 2008). Cette PLP est essentielle, les mutants de délétion de la PLP3 n'étant pas viables (Toth et al., 2022). Une surproduction de cette PLP serait toxique pour la bactérie (K. Kang & Boll, 2022). Elle est la cible de l'aztréonam et est également inhibée par le sulbactam (Penwell et al., 2015). Des mutations dans cette PLP situées proche du site de liaison au sulbactam entraînent une hausse de la résistance à cette molécule, qui n'est pas croisée avec d'autres antibiotiques (pour ceux testés, à savoir : aztréonam, ceftazidime, méropénème). Mais ces mutants ont été obtenus *in vitro*, et ne sont pas observés *in vivo*, laissant penser qu'un coût énergétique n'est pas favorable pour les souches cliniques (Penwell et al., 2015). L'ampicilline et le sulbactam ont tous les deux les mêmes sites d'interaction à la PLP3 d'après une modélisation, ce qui pourrait expliquer l'efficacité de ces deux molécules contre *A. baumannii* (Papp-Wallace et al., 2012). Cette PLP serait également la cible du céfidérocol (Ito et al., 2018).

La PLP7/8

La PLP8 est le produit de dégradation de la PLP7 passant par OmpT. Cette PLP aurait un rôle dans la virulence (Russo et al., 2009). Le rôle de la PLP7/8 chez les bactéries à Gram négatif est encore mal connu, car elle n'est pas indispensable à l'élongation cellulaire. En revanche, elle semble contribuer à la morphologie et dans la séparation cellulaire. Elle contribue également à la stabilisation et à l'augmentation de l'activité enzymatique de la transglycosylase lytique soluble 70.

En plus des PLP, des protéines présentant une activité glycosyltransférase mais pas d'autre activité enzymatique, et dénommées en conséquence *monofunctional transglycosylase* (MGT), ont été retrouvées chez différents espèces bactériennes, dont *A. baumannii* (Cayô et al., 2011). Leur implication dans la synthèse de la paroi reste toutefois floue, et leur activité ne semble pas essentielle pour la synthèse de la paroi, comme cela a été démontré chez *S. aureus* (Reed et al., 2011).

Un récapitulatif des classes et fonctions principales des PLP de *A. baumannii* est disponible dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Les différentes PLPs retrouvées chez *A. baumannii* et leurs rôles physiologiques.

PLP (gène codant)	Classification	Activité moléculaire	Rôle physiologique
PLP1a (<i>ponA</i> ou <i>mrcA</i>)	HMM classe A (sous-classe A1)	Transglycosylase et transpeptidase	Synthèse du peptidoglycane ; division cellulaire
PLP1b (<i>mrcB</i>)	HMM classe A (sous-classe A2)	Transglycosylase et transpeptidase	Synthèse du peptidoglycane
PLP2 (<i>mrdA</i> ou <i>pbpA</i>)	HMM classe B (sous-classe B2)	Transpeptidase	Elongation cellulaire
PLP3 (<i>ftsI</i>)	HMM classe B (sous-classe B3)	Transpeptidase	Division cellulaire (formation du septum)
PLP5/6 (<i>dacC</i>)	LMM classe C (type 5)	D-Ala-D-Ala-carboxypeptidase	Inconnu
PLP6b (<i>dacD</i>)	LMM classe C (type 5)	D-Ala-D-Ala-carboxypeptidase	Inconnu
PLP7/8 (<i>pbpG</i>)	LMM classe C (type 7)	Endopeptidase	Virulence, morphologie et séparation cellulaire ?

HMM : High-Molecular-Mass ; LMM : Low-Molecular-Mass. D'après Cayô et al. 2011(Cayô et al., 2011).

III. Résistance aux antibiotiques

La résistance apparaît rapidement après le début de l'utilisation d'un antibiotique (Lewis, 2013). En effet, dès 1940, des souches non sensibles à la pénicilline sont observées (Abraham & Chain, 1940).

Aujourd'hui, la résistance aux antibiotiques constitue une préoccupation majeure pour la santé publique. En effet, en 2016, il était estimé que 700 000 personnes mourraient chaque année dans le monde à cause de la résistance aux antibiotiques. De plus, 10 millions de personnes pourraient décéder en 2050 si aucune mesure n'est prise, ce chiffre dépassant celui du nombre de décès liés aux cancers pour cette même année (O'Neill, 2016). En 2019, ce sont 1,27 millions de décès qui ont été attribués directement à la résistance aux antibiotiques. Six pathogènes étaient responsables de 95 % des décès associés à cette résistance. Il s'agit de *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *A. baumannii*, et *P. aeruginosa*, classés par nombre de décès, avec chacun au moins 250 000 décès associés (C. Murray et al., 2022).

Concernant *A. baumannii*, la résistance aux carbapénèmes est particulièrement problématique puisque les carbapénèmes sont les molécules de choix pour le traitement des infections dues à *A. baumannii*. De plus, les infections causées par des souches résistantes à ces molécules sont généralement complexes à traiter en raison de l'accumulation très fréquentes de mécanismes de résistance à d'autres antibiotiques, limitant ainsi les options thérapeutiques.

Aux Etats-Unis, bien que le nombre d'infections par *A. baumannii* résistant aux carbapénèmes, dénommées CRAB pour *carbapenem resistant A. baumannii*, soit en diminution depuis 2012, 8 500 cas ont encore été reportés en 2017. Sur cette même année, il a été estimé que les CRAB ont été reliés à 700 décès, et que le coût des soins en découlant était de 281 millions de dollars d'après le rapport du CDC pour l'année 2019 (U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2019). Ces souches sont d'autant plus problématiques du fait de la pénurie en nouveaux antibiotiques arrivant sur le marché. Par ailleurs, les associations de β -lactamines/inhibiteurs sont le plus souvent inefficaces chez *A. baumannii* (Papp-Wallace, 2019).

1. Résistance aux β -lactamines

Comme il l'a été évoqué précédemment, les β -lactamines représentent la classe d'antibiotiques la plus utilisée. Cet usage fréquent joue probablement le rôle de pression de sélection, et conduit donc à la sélection de souches résistantes à ces molécules. Divers mécanismes interviennent dans le développement de cette résistance.

L'un de ces mécanismes est la production de systèmes d'efflux. Ces systèmes permettent à la bactérie de rejeter des molécules toxiques, dont les antibiotiques dans certains cas, en dehors de la cellule. Il existe plusieurs familles de pompes d'efflux, dont 4 qui sont connues chez *A. baumannii* pour avoir un rôle dans la résistance aux antimicrobiens : les pompes MFS (*Major Facilitator Superfamily*), les RND (*Resistance-Nodulation cell Division*), les SMR (*Small Multidrug Resistance*) et enfin les MATE (*Multi-drug And Toxic compound Extrusion*). Ces systèmes utilisent un gradient de protons (familles RND, SMR et MFS) ou de sodium (MATE) comme source d'énergie. La famille jouant le rôle le plus important dans l'efflux des β -lactamines est celle des RND, qui inclut notamment les pompes AdeABC et AdeIJK (Ade signifiant *Acinetobacter drug efflux*). AdeABC a été décrit pour la première fois en 2001 ([Magnet et al., 2001](#)). Cette pompe d'efflux n'est pas exprimée de manière naturelle dans les souches. Par conséquent, la résistance aux antibiotiques substrats de cette pompe résulte d'une surexpression, pouvant découler d'une mutation dans un régulateur ([Coyne et al., 2011](#)). AdeABC est régulé par AdeR et AdeS, codés par les gènes du même nom, qui fonctionnent en opéron et se situent en amont de l'opéron *adeABC* mais sont transcrits en sens inverse ([Marchand et al., 2004](#)). AdeABC a pour substrats un certain nombre d'antibiotiques appartenant à différentes classes. Il peut ainsi effluer des β -lactamines, et en particulier le céfépime, le cefpirome et le céfotaxime, ayant moins d'impact sur les autres antibiotiques de cette classe ([Bratu et al., 2008](#)). En revanche, le rôle de AdeABC dans la résistance aux carbapénèmes reste controversé ; certaines études utilisant des inhibiteurs d'efflux ne mettent pas en évidence de différences de CMI ([Bou et al., 2000](#); [Pournaras et al., 2006](#); [Quale et al., 2003](#)), alors que c'est le cas pour d'autres études ([W. Hu et al., 2007](#); [Jeong et al., 2009](#); [Y. Lee et al., 2010, p.](#); [Peleg et al., 2007](#)). La surexpression de cette pompe entraîne néanmoins une hausse significative de la résistance aux carbapénèmes, et en particulier à l'imipénème et au méropénème lorsque la souche produit également une carbapénémase ([Héritier et al., 2005](#)). De plus, l'inactivation de la pompe dans ces souches a toutefois montré la participation de AdeABC dans la résistance au méropénème, mais pas à l'imipénème ([Wong et al., 2009](#)). De manière intéressante, l'opéron *adeABC* semble associé aux souches cliniques, puisqu'il est retrouvé dans 53 % à 97 % de celles-ci, mais n'a pas été retrouvé chez 32 souches environnementales ([Coyne et al., 2011](#)). Le système AdeIJK peut quant à lui être surproduit, mais en trop grande quantité, ce système d'efflux devient toxique pour la bactérie. Cet efflux, lorsqu'il est surproduit de manière modérée, est impliqué dans la résistance aux β -lactamines, dont la ticarcilline, les céphalosporines et l'aztréonam ([Coyne et al., 2010](#); [Damier-Piolle et al., 2008](#)).

L'imperméabilité de la cellule est également impliquée dans le développement de la résistance aux antibiotiques. En effet, plusieurs porines servent de voie d'entrée aux antibiotiques (comme cela a déjà pu être évoqué dans le paragraphe *(II.2.1. Entrée des antibiotiques dans la bactérie)*). La perte de ces porines peut par conséquent empêcher l'entrée des antibiotiques et ainsi conduire à la résistance de la souche ([Uppalapati et al., 2020](#)). Ainsi, la porine CarO (pour *carbapenem-associated outer*

membrane protein) a pour la première fois été décrite dans une souche de *A. baumannii* résistante à l'imipénème et au méropénème, mais qui n'avait pas d'activité carbapénémase (Mussi et al., 2005). La perte de la porine Omp33-36 est également connue pour induire une baisse de sensibilité aux carbapénèmes (Tomás et al., 2005).

Un autre mécanisme retrouvé dans les souches résistantes est la modification de la cible d'un antibiotique. En effet, si une mutation a lieu dans le gène codant la protéine cible et qu'elle entraîne un changement d'acide aminé, cela peut modifier l'affinité que l'antibiotique a pour cette cible. Si l'affinité est réduite, l'antibiotique sera moins efficace. Chez *A. baumannii*, la première description d'une modification de PLP conduisant à de la résistance a été faite par Gerhlein et collègues, en 1991, décrivant alors 7 PLP. Celle de plus petite taille (24 kDa) était probablement mutée et induisait ainsi une résistance à l'imipénème (Gehrlein et al., 1991).

Chez *A. baumannii*, le mécanisme de résistance majeur aux β -lactamines est la production d'enzymes, dénommées β -lactamases, capables d'hydrolyser les antibiotiques.

1.1. Les β -lactamases

Les β -lactamases sont des enzymes capables d'inactiver les β -lactamines en ouvrant leur cycle β -lactame, ce qui conduit à la perte d'activité de ces molécules.

La première description d'une β -lactamase a eu lieu en 1940 ; il s'agissait d'une pénicillinase, décrite par (Abraham & Chain, 1940). Différentes classifications existent mais la plus utilisée se base sur leur homologie de séquences (Ambler et al., 1997). D'autres similitudes sont aussi observables entre les différentes classes (dénommées classes A, B, C et D) : les classes A, C et D ont pour point commun d'avoir un site actif présentant une sérine, indispensable à l'activité catalytique contrairement aux enzymes de la classe B qui utilisent un à deux atomes de zinc, et sont pour cette raison dénommées métallo- β -lactamases. Au sein de chaque classe, d'autres points communs existent, comme la présence de motifs conservés. Ces différents aspects sont résumés dans le **Tableau 4**.

Tableau 4 : Informations générales sur les différentes classes de β -lactamases.

Classe	Activité	Motifs conservés	Antibiotiques cibles	Inhibiteurs ^a
Classe A	Sérine active	⁷⁰ STSK , ¹³⁰ SDN , ¹⁶⁶ EXXLN et ²³⁴ KTG	Pénicillines / C1G, C3G, C4G et monobactames dans le cas de certaines BLSE	Acide clavulanique, tazobactam, avibactam, vaborbactam, relebactam
Classe B	Zinc	-	Toutes les β -lactamines, sauf aztréonam	Chélateurs (EDTA,...)
Classe C	Sérine active	⁶⁴ SXSK , ¹⁵⁰ YXN , et ³¹⁵ KTG	C1G, aminopénicillines	Cloxacilline, avibactam, vaborbactam, relebactam
Classe D	Sérine active	⁷⁰ STFK , ¹¹⁸ SXV , ¹⁴⁴ YGN (ou ¹⁴⁴ FGN) et ²¹⁶ KTG (ou ²¹⁶ KSG)	Variés, dont carbapénèmes pour les CHDL	Chlorure de sodium (<i>in vitro</i>), avibactam

Pour les motifs conservés, les résidus indiqués en gras ne changent pas et les autres peuvent être sujet à variation.

^a Fonctionne sur certaines enzymes appartenant à la classe concernée mais pas sur toutes systématiquement.

Des informations plus précises concernant les différentes classes des β -lactamases sont également indiquées dans les parties suivantes.

Classe A

Les β -lactamases de classe A, aussi appelées pénicillinases, ont pour cibles principales les pénicillines. Elles sont sensibles aux inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique et tazobactam notamment). Certaines ont un spectre étendu à certaines céphalosporines (C1G, C3G, C4G et monobactames) et sont appelées BLSE (β -lactamase à spectre étendu). Chez *A. baumannii*, la production de BLSE est rare et les BLSE de type PER et VEB sont les plus fréquentes (Castanheira et al., 2023).

Classe B

Les β -lactamases de classe B, ou métallo- β -lactamases, hydrolysent toutes les β -lactamines, carbapénèmes inclus, à l'exception de l'aztréonam. Elles ne sont pas inhibées par les inhibiteurs classiques, mais en revanche par les agents chélateurs d'ions bivalents, tel que l'EDTA (Acide éthylènediamine tétra-acétique) permettent leur inhibition *in vitro*. Ceci s'explique par le fait qu'elles ont besoin de zinc pour leur fonctionnement.

Les β -lactamases de type NDM

Parmi les β -lactamases de classe B, les enzymes de type NDM ont pris beaucoup d'importance ces dernières années. En effet, la prévalence de ces enzymes chez les entérobactéries ne cesse d'augmenter au niveau mondial depuis leur découverte en 2009 (Yong et al., 2009). Ces enzymes ont rapidement été identifiées chez *A. baumannii*, puisque quatre souches de *A. baumannii* productrices de NDM-1 ont été décrites en 2010, provenant de quatre provinces différentes de Chine (Y. Chen et al., 2011). Aujourd'hui, on compte 55 variants NDM décrits (<http://www.bldb.eu/BLDB.php?prot=B1> ;

consulté le 18/09/23). Les paramètres hydrolytiques et les CMI de différentes β -lactamines ont été déterminés pour les variants NDM-1 à NDM-17. En conditions normales de croissance, peu de différences en terme de sensibilité aux β -lactamines ont été notées entre ces variants, à l'exception de NDM-10 qui présentait des CMI d'ampicilline et de carbapénèmes plus basses par rapport aux autres variants. En revanche, en condition limitée en zinc, des différences plus marquées étaient visibles, avec des niveaux de résistances plus importants pour toutes les familles de β -lactamines pour les variants NDM-5, -7, -12, -13, -15 et -16 (Cheng et al., 2018).

L'analyse de l'environnement génétique de NDM chez *Acinetobacter* a toujours mis en évidence une partie de la séquence d'insertion ISAb125 (Bonnin et al., 2014). Le gène codant NDM, *bla*_{NDM}, se situe sur le transposon Tn125, dont les extrémités sont flanquées chacune par une ISAb125 (Bonnin et al., 2014). Il arrive que le transposon ne soit pas intact à cause de nombreux remaniements génétiques et que seuls des fragments ne soient retrouvés dans l'environnement génétique des gènes *bla*_{NDM} (Bonnin et al., 2012; Ramirez et al., 2020).

Classe C

Les β -lactamases de classe C, dénommées céphalosporinases ou encore AmpC, sont retrouvées chez plusieurs espèces, genres et même classes de bactéries ; en effet, des bactéries appartenant aux classes des Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria et Gammaproteobacteria, ainsi que d'autres, peuvent produire des β -lactamases de classe C. Les genres produisant ces enzymes sont très divers : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia/Shigella*, *Klebsiella*, *Yersinia* (ordre des Enterobacterales), *Agrobacterium* (ordre des Hyphomicrobiales), *Legionella* (ordre des Legionellales), *Pseudomonas* et *Acinetobacter* (ordre des Pseudomonadales) par exemple (Philippon et al., 2022). Toutes les bactéries appartenant aux ordres ou genres sus-cités ne produisent en revanche pas systématiquement une AmpC ; dans certains cas, un gène *ampC* a pu être identifié, sans que la production d'une enzyme fonctionnelle n'ait pu être confirmée comme c'est le cas chez *Agrobacterium tumefaciens* ou *Legionella pneumophila* par exemple. Dans le cas d'autres espèces telles que des représentantes du genre *Serratia* ou *Yersinia*, des données de CMI ou enzymatiques penchent en faveur de la présence d'une AmpC, notamment à cause d'une résistance naturelle observée chez les espèces concernées, sans que des données génomiques ne les aient confirmées. Enfin, dans le cas de certaines Entérobactéries fréquemment rencontrées, il arrive à l'inverse qu'elles ne présentent pas de gène *ampC* comme c'est le cas pour plusieurs espèces de *Citrobacter*, *Proteus* ou encore *Yersinia* (Jacoby, 2009). Chez ces espèces, l'absence d'un gène *ampC* chromosomique ne doit toutefois pas dissuader de rechercher une éventuelle production d'AmpC. Les AmpC sont principalement chromosomiques, mais certaines d'entre elles ont été décrites pour être plasmidiques, et une transmission entre bactéries est donc possible (Jacoby, 2009; Philippon et al., 2022).

Les β -lactamases de classe C peuvent présenter des différences protéiques assez importantes, si bien que les différentes enzymes retrouvées chez les groupes majeurs (*Acinetobacter*, *Aeromonadales*, *Burkholderiales*, *Enterobacterales*, *Pseudomonales* et *Rhizobiales*) ne présentent que 24 % d'homologie protéique entre elles. Au sein des genres, les homologies sont plus élevées, mais peuvent varier, avec des séquences relativement bien conservées comme chez les *Escherichia/Shigella* et *Citrobacter* par exemple (homologie de séquence > 75 %) ou moins similaires comme chez les *Acinetobacter* ou *Pseudomonas* (avec des homologies de séquences inférieures à 50 %) (Philippon et al., 2022).

Ces enzymes présentent en revanche toutes des points communs : ces céphalosporinases, comme leur nom l'indique, hydrolysent préférentiellement les céphalosporines, en particulier de première génération, mais aussi les aminopénicillines (Bulychev & Mobashery, 1999; Bush, 2013). En cas de surproduction de l'enzyme, les carboxypénicillines, uréidopénicillines et céphalosporines de troisième génération sont également hydrolysées. Les céphalosporines de quatrième génération ainsi que les carbapénèmes sont quant à eux très stables vis-à-vis de ces enzymes. Ces enzymes sont inhibées par la cloxacilline, mais pas par l'acide clavulanique et le tazobactam (Jacoby, 2009). Quatre-vingt-deux résidus sont très conservés (entre 90 et 100 % de conservation) et sont distribués sur l'ensemble de la protéine (Bush, 2013; Philippon et al., 2022). Un autre point commun entre ces enzymes est qu'elles ont une structure qui peut se répartir en 2 domaines : le premier se compose de 9 brins- β antiparallèles, et 3 hélices α (H1, H10, et H11) alors que le second domaine se compose de 3 brins- β antiparallèles et 8 hélices α (de H2 à H9). En plus de ces éléments, deux régions sont particulièrement importantes pour l'activité enzymatique en raison des interactions avec les substrats : il s'agit de l' Ω -loop et du R2-loop. L'ensemble de ces régions d'intérêt et motifs est représenté sur la représentation de la structure tridimensionnelle de la protéine en **Figure 11**.

Les souches de *Acinetobacter* possèdent une céphalosporinase naturelle, dont le nom ADC (pour *Acinetobacter Derived-Cephalosporinase*) suivi d'un numéro, a été proposé par Hujer et collègues afin de distinguer les variants (K. Hujer et al., 2005). Cette enzyme leur confère une résistance naturelle aux céphalosporines de première et seconde génération. A ce jour, 306 variants de ADC ont été retrouvés chez les différentes espèces de *Acinetobacter* (<http://bldb.eu/BLDB.php?prot=C#ADC> ; consulté le 10/09/2023) (Naas et al., 2017; Périchon et al., 2014). Ils ont été retrouvés principalement chez les espèces du complexe ABC, mais aussi chez *A. baylyi*, *A. ursingii*, *A. haemolyticus*, entre autres (Périchon et al., 2014). Ceci s'explique probablement par le fait que ces espèces sont les plus étudiées, en particulier par rapport à leur profil de résistance aux antibiotiques, du fait de leur prévalence dans le milieu hospitalier. Les ADC de manière générale partagent toutes les caractéristiques des β -lactamases de classe C décrites dans les paragraphes précédents.

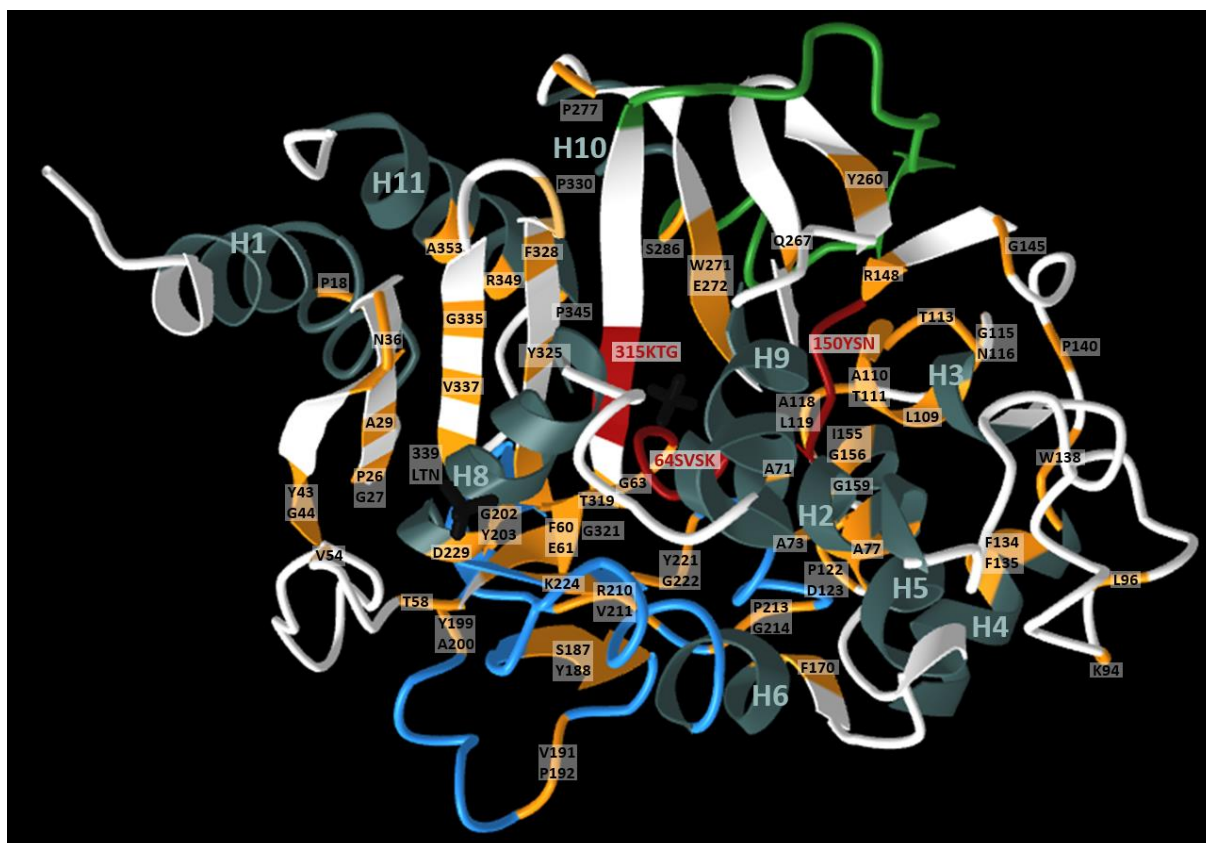


Figure 11 : Représentation de la structure tridimensionnelle de l'enzyme ADC-30. Les hélices sont indiquées en gris, l'Ω-loop en bleu, le R2-loop en vert et les motifs conservés en rouge. Les résidus fortement conservés ($\geq 90\%$) sont indiqués en orange. L'annotation des résidus respecte la numérotation SANC, proposée par Mack et collègues (Mack et al. 2020). Figure issue de la banque de données des protéines RCSB (PDB ID : 8FQV).

Il existe toutefois des variabilités différenciant ces enzymes et cette variabilité n'est pas sans conséquence sur l'activité de ces dernières. En effet, certaines mutations peuvent entraîner un changement de spectre. On parle dans ce cas d'ESAC (pour *Extended Spectrum AmpC*). Ces ESAC peuvent inactiver également les oxyiminocéphalosporines (ceftazidime, céfotaxime, céfépime et cefpirome) (Bulychev & Mobashery, 1999; Philippon et al., 2022). La première ESAC a été décrite en 1992, produite par la souche GC1 de *Enterobacter cloacae*, isolée au Japon (Nukaga et al., 1995). Les mutations responsables de l'élargissement du spectre se soldent généralement par des changements d'acide-aminés (substitutions) se trouvant dans les régions et l'Ω-loop ou du R2-loop. Des insertions ou délétions ont aussi pu être observées (Philippon et al., 2022). L'ensemble des mutations et sites de mutations conduisant à un phénotype ESAC sont indiqués dans le **Tableau 5**. Il est intéressant toutefois de noter que les ADC possèdent, par rapport aux autres AmpC retrouvées chez les autres espèces, une délétion de 3 acides aminés en position 304-306 situés dans le R2-loop, qui entrainerait un caractère ESAC « natif » de ces enzymes (Philippon et al., 2022).

Tableau 5 : Positons identifiées chez les AmpC pour conduire à un phénotype ESAC.

Position ^a	70	100	121	148	153	174	211	213	219	221	287	292	293	296	298	346	350
Résidus (ADC-30)	T	P	F	R	P	L	V	P	P	Y	N	V	M	N	V	N	I
Structure secondaire	H2				H5	H6			H7	H7		H10				H11	H11
Région d'intérêt							Ω	Ω	Ω	Ω	R2	R2	R2	R2	R2		

La séquence en acides aminés (résidus) est celle retrouvée dans le variant ADC-30. Les résidus en gras sont ceux qui ont été retrouvés mutés chez *A. baumannii*, les autres ont été retrouvés chez *P. aeruginosa* ou *E. coli*. Les structures secondaires (H : Hélice) sont indiquées ainsi que les régions d'intérêt (Ω : Ω-loop et R2 : R2-loop). D'après Philippon et al. 2022 (Philippon et al., 2022).

^a Numérotation d'après la nomenclature SANC, proposé par Mack et al. 2020 (Mack et al., 2020).

Même si cela reste rare, certaines céphalosporinases ont une capacité accrue d'hydrolyse des carbapénèmes, parfois même au point d'être considéré comme de véritables carbapénémases de classe C. Il s'agit des enzymes ACT-1, CMY-2, CMY-10 et ADC-68 (Jeon et al., 2014; J. Kim et al., 2006; C. Lee et al., 2016; Mammeri et al., 2010).

Chez la plupart de ces bactéries, une régulation complexe d'AmpC est décrite (Juan et al., 2017; Philippon et al., 2022). Et c'est en 1948 que Bellamy et Klimek démontrent que ces enzymes peuvent être produites en réponse à la présence d'antibiotiques, comme c'est le cas pour les pénicillines sur des bactéries du genre *Staphylococcus* (Bellamy & Klimek, 1948). Elle peut aussi être inductible par la présence de l'imipénème. Le régulateur principal d'AmpC est AmpR, codé par un gène situé en amont du gène codant AmpC, et transcrit en sens inverse. En revanche, cette organisation génétique n'est pas retrouvée chez *A. baumannii*. En raison de l'absence d'un gène similaire à *ampR* dans l'environnement génétique du gène codant ADC (*bla_{ADC}*) il a été proposé qu'ADC n'était pas inductible (Bou & Martínez-Beltrán, 2000). De manière assez intéressante, d'autres acteurs impliqués dans la régulation d'AmpC sont quand même retrouvés dans le génome de *A. baumannii*, tels que des gènes codant pour AmpD ou AmpG. Dans le cas de AmpG, il a même été démontré que la protéine était fonctionnelle avec des expériences de complémentation chez *P. aeruginosa* (P. Li et al., 2016). Mais la régulation d'AmpC via ces effecteurs passe toujours par AmpR chez les bactéries pouvant produire cette protéine. L'absence de cette dernière chez *A. baumannii* a donc conduit au fait que peu d'études ont été menées sur l'impact des effecteurs et qu'ils n'ont pas réellement été étudiés vis-à-vis de l'induction d'ADC. De plus, des tests d'inductibilité ont été réalisés, mais aucune induction d'ADC n'a été observée (Bou & Martínez-Beltrán, 2000; Héritier et al., 2006).

Bien qu'une régulation « classique » ne soit pas observée chez *A. baumannii*, l'expression de *bla_{ADC}* peut varier. En effet, le gène *bla_{ADC}* peut être surexprimé par insertion de séquences d'insertion (IS) qui viennent se placer en amont du gène et qui apportent un promoteur fort (Héritier et al., 2006). Les IS sont des éléments génétiques mobiles qui se caractérisent par la présence d'un gène codant pour une transposase (permettant la mobilité de l'IS) entouré par deux séquences répétées inversées (IRR et IRL) (Figure 12). Des séquences répétées (*direct repeat* - DR) sont également retrouvées de part et d'autre de l'IS et sont des marqueurs de la transposition de cette dernière. ISAb1 est l'IS la plus

fréquemment identifiée en amont de *bla_{ADC}*, mais *ISAb125* a aussi été décrite pour entraîner une surexpression de *bla_{ADC}*, en s'insérant toujours de la même manière en amont du gène (Hamidian et al., 2013; Hamidian & Hall, 2013). En venant s'insérer en amont du gène *bla_{ADC}*, l'IS entraîne aussi un changement de nucléotide au niveau du RBS (*Ribosome Binding Site*) (Héritier et al., 2006).

L'expression basale de *bla_{ADC}* n'est pas suffisante pour induire de la résistance, mais l'insertion d'une IS en amont de ce gène, entraînant la surproduction d'ADC, est le mécanisme principal conduisant à la résistance aux céphalosporines de 3^e génération (Bou & Martínez-Beltrán, 2000; Jia et al., 2019).

```

1      TTCCATGTGCTATAACAACATAACAATTAAATTAGGTGATTTTGTATATAAAGTAGGCATCTTCTTTTAAATAATTTAT
                                -35          Pori          -10
83      GAGCTAATCCTCTGTACACGACAAATTTCACAGAACCCTTATCCTATCAGGGTCTGCCTTCTTAAAAATGCCAAAATTCCT
      DR      <----IRR----->          * L V R I R D P N Q R R L I A L I E K
166     TAAACTCTTCTTTTCCCAAAACCAATTAAACGCTGAATCGCCATTGAAACATAGTCTAAACCATAGCGAAATAAATCATT
      F E E K K G F G I L R Q I A M Q V Y D L G Y R F L S M
249     GAGAGTCGTCCATGCTTCTTTATTTTATCGCTTTTGTATCATGTTGCCATTACCCGTTAAGTAACCAACAGAAGCT
      S L R G H K K I K I A K K Q D H Q W E G T L Y C W C F S
332     TATAGCTAACACCGCAATCAATTTTTCACCTCGTCTAGGGTCTGTCAAGCGCGTATTTTCAAGATTAAACCCGCGCTTTGA
      I A L V A I L K K V R R P D T L R T N E L N F G R G K L
415     GACAACCTGAATAAGGTTTCAATTTCCAGCGTAATGCATAATCCTGAATAGCATTTGGCATTAACCTGAGGAGAAACGACGAGT
      C S F L T E I E W R L A Y D Q I A N A N F Q P S V V L
498     AAAAGCTCTCCATTTTCTAACTGTAGTGCATTATATATAGTTTCACCCGACCAACCAAAATCCGTCGTTTACGACATTCAAT
      L L E G N E L Q L A S I Y L K V R G V L I R R K R C E I
581     TTGACCAACTTTAAGATGGCGAAATAAATCACTAATTTTATGATTCTTTCCTAAATGATTGGTGACAAATGAAGTTTTTTTAAAC
      Q G V K L H R F L D S I K H N K G L H N T V I F N K
                                * I I P S L S T K K V
                                <-- orf2 of ISAb1
664     ACGAATGCAGAAGTTGATGTCTTGTTCATTAACCATGTAAACCACTGCTCACCGATAAACTCTGTCTGCGAACACATTCA
      R I C F N I D Q E I L W T F W Q E G I F E R D A F V N V
747     CAATACGGTCTTTACCAAAAATGGCTATAAAGCGTTGAATCAAAGCAATACGCTCTTTCGTATCTGAATTTCCACGTTTATTA
      I R D K G F I A I F R Q I L A I R E K T D S N G R K N
830     AGCAATGTCCAAAGGATAGGTATCGCTATTCACGATAAAGCATTGCGAGCATCAGGATATTAATATTTTCGTTTTCCTTTT
      L L T W L I P I A I G R Y V I A L M L I N I N R K G W K
913     CCAATTGGTTCTATCTAAAGTCAGTTGCCTTGGTCAATGAAAACATATGAAAATCAACTGAGAAATTTGACGATAATCAA
      W N T R D L T L Q V Q D F S F M N F I L Q S I Q R Y D F
996     AATACTGACCTGCAAGAAGCGCTGCATACGTCGATAAAATGATTGTGGTAAGCACTTGATGGCAAGGCTTTAGATGCAGAA
      Y Q G A F F R Q M R R Y F S Q P L C K I P L A K S A S
1079    GAAAGATTACATGTTTGTCTTTAAATAATCACAGCATGATGAGCGCAAAGCACTTTAAATGTGACTTGTTCATTTTAGATA
      S L N C T Q K L I I V L M I L A F C K L H S K N W K L Y
                                -10          Pin          -35
1162    TTTGTTTAAAGATAAGATATAACTCATTGAGATGTGTCATAGTATTCGTCGTTAGAAAACAATTATTATGACATTTATTTCAATG
      K N L I L Y L E N L H T M          -35          Pout          -10
                                <-- orf1 of ISAb1
1245    AGTTATCTATTTTATCGTGTACAGAGGAGTAATCATGCGATTAAAAAAATTTCTGTCTACTTTTATCCCCGCTTTTAT
      <----IRL----->      DR      <-- blaampC

```

Figure 12 : Séquence nucléotidique d'ISAb1 insérée en amont du gène *bla_{ADC}* (*bla_{ampC}*). Les IRR et IRL encadrant la séquence d'insertion sont surlignées en gris et les direct repeat (DR) soulignés. Les promoteurs sont indiqués par les boîtes -35 et -10. *P_{ori}* représente le promoteur naturel de *bla_{ADC}* et le nouveau promoteur apporté par *ISAb1* est indiqué par *P_{out}*. *P_{in}* représente le promoteur de la transposase de l'IS (codée par *orf1*). La séquence en acides aminés de la transposase est indiquée en dessous de la séquence nucléotidique, et les astérisques (*) représentent les codons stop. Le RBS est indiqué en gras (TGAG pour le RBS naturel, et GGAG pour le RBS modifié). Le début de la séquence du gène *bla_{ADC}* est également indiqué en gras (ATG). Figure tiré de Héritier et al., 2006 (Héritier et al., 2006).

Comme pour d'autres AmpC, plusieurs variants ADC ont été décrits comme étant des enzymes de types ESAC (Bou & Martínez-Beltrán, 2000; Jeon et al., 2014; Pérez et al., 2014; Tian et al., 2011). En revanche, à ce jour, un seul de ces variants a été décrit comme ayant un impact sur les carbapénèmes (Jeon et al., 2014). La liste des variants décrits dans la littérature ainsi que leur type est présentée dans le **Tableau 6**. Pour certains variants caractérisés, les paramètres enzymatiques ont également été déterminés (**Tableau 7**). Le k_{cat} correspond à l'activité catalytique de l'enzyme, ou son *turnover*, c'est-à-dire le nombre de molécule hydrolysé sur une période de temps donnée. Le K_m correspond à l'affinité de l'enzyme pour le substrat. La valeur de ce dernier est toutefois inversement proportionnelle à l'affinité. Enfin, la détermination du k_{cat}/K_m permet ainsi d'avoir une idée générale de la capacité de l'enzyme à convertir le substrat en son produit en tenant compte de ces deux paramètres.

Tableau 6 : Liste des variants ADC décrits dans la littérature et leur type.

ADC caractérisée	Type	Références
ADC-1	ESAC	(Bou & Martínez-Beltrán, 2000; Pérez et al., 2014)
ADC-7		(K. Hujer et al., 2005)
ADC-11		(Rodríguez-Martínez, Nordmann, et al., 2010)
ADC-12		(Beceiro et al., 2009)
ADC-13		(Beceiro et al., 2009)
ADC-14		(Beceiro et al., 2009)
ADC-15		(Beceiro et al., 2009)
ADC-16		(Beceiro et al., 2009)
ADC-17		(Beceiro et al., 2009)
ADC-18		(Beceiro et al., 2009)
ADC-26	ESAC	(Rodríguez-Martínez, Poiré, et al., 2010)
ADC-30		(Rodríguez-Martínez, Poiré, et al., 2010)
ADC-33		(Rodríguez-Martínez, Nordmann, et al., 2010)
ADC-5		(Pérez et al., 2014)
ADC-50		(Rodríguez-Martínez, Nordmann, et al., 2010)
ADC-51		(Rodríguez-Martínez, Poiré, et al., 2010)
ADC-52		(Rodríguez-Martínez, Poiré, et al., 2010)
ADC-53		(Rodríguez-Martínez, Poiré, et al., 2010)
ADC-56		(Tian et al., 2011)
ADC-68	ESAC, Carba ^R	(Jeon et al., 2014)

ESAC : Extended-Spectrum AmpC ; Carba^R : variant décrit comme confèrent de la résistance aux carbapénèmes.

Tableau 7 : Valeurs des paramètres enzymatiques des variants ADC décrits dans la littérature.

Référence	Variant	Pénicilline G			Ampicilline			Céphalosporine			Cefoxitine		
		K _m	K _{cat}	K _{cat} /K _m	K _m	K _{cat}	K _{cat} /K _m	K _m	K _{cat}	K _{cat} /K _m	K _m	K _{cat}	K _{cat} /K _m
Bhattacharya <i>et al</i> , 2013	ADC-1	10,3	5,1	2	4,8	32	0,15	147	74	2	ND		
Pérez <i>et al</i> , 2014	ADC-1	ND			4,3	3,0	0,71	204	1744,1	8,5	0,19	0,0	0,18
Pérez <i>et al</i> , 2014	ADC-5	ND			3,3	6,9	2,1	247	1088,4	4,4	0,2	0,72	4,1
Hujer <i>et al</i> , 2005	ADC-7	ND			ND			40	1 154	29	0,34	0,92	2,7
Skalweit <i>et al</i> , 2015	ADC-7	ND			ND			1 500	90	17	80	9	8,3
Rodríguez-Martínez <i>et al</i> , 2011	ADC-11	12	45	4	7	5	1	210	550	2,5	0,5	1,5	3
Beceiro <i>et al</i> , 2009	ADC-14	ND			0,12	0,3	2,4	6,7	56,5	8,4	0,02	0,02	0,94
Beceiro <i>et al</i> , 2009	ADC-16	ND			1,0	2,6	2,5	139,2	1380,8	9,9	0,18	0,33	1,9
Beceiro <i>et al</i> , 2009	ADC-18	ND			1,5	4,1	2,7	148,3	1418,4	9,6	0,13	0,27	2,0
Tian <i>et al</i> , 2011	ADC-30	ND			0,91	1,4	1,5	23,8	480,5	20,3	0,3	3,37	11,5
Rodríguez-Martínez <i>et al</i> , 2011	ADC-33	3	15	5	9	4	0,5	120	140	1	0,1	0,3	3
Tian <i>et al</i> , 2011	ADC-56	ND			1,1	3,5	3,3	38,9	393,9	10,2	NM		
Jeon <i>et al</i> , 2015	ADC-68	85,4	23,5	3,63	7,1	20,3	0,35	65,8	21,5	3,06	ND		

Suite du Tableau 7.

Référence	Variant	Cefotaxime			Ceftazidime			Céfépime			Imipénème			Méropénème		
		K _m	K _{cat}	K _{cat} /K _m	K _m	K _{cat}	K _{cat} /K _m	K _m	K _{cat}	K _{cat} /K _m	K _m	K _{cat}	K _{cat} /K _m	K _m	K _{cat}	K _{cat} /K _m
Bhattacharya <i>et al</i> , 2013	ADC-1	0,16	0,5	0,32	0,7	16	0,044	ND			ND			ND		
Pérez <i>et al</i> , 2014	ADC-1	ND			265	1,3	0,0047	ND			ND			ND		
Pérez <i>et al</i> , 2014	ADC-5	ND			231,9	0,011	0,00005	ND			ND			ND		
Hujer <i>et al</i> , 2005	ADC-7	0,1	NM			11,6	NM		594	NM		2	NM		38	NM
Skalweit <i>et al</i> , 2015	ADC-7	ND			ND			ND			ND			ND		
Rodríguez-Martínez <i>et al</i> , 2011	ADC-11	2,5	0,2	0,1	10	0,01	0,001	1 800	1	0,0005	6	0,015	0,0025	ND		
Beceiro <i>et al</i> , 2009	ADC-14	0,08	0,004	0,05	26,1	0,01	0,00038	ND			2,3	0,003	0,0013	ND		
Beceiro <i>et al</i> , 2009	ADC-16	0,32	0,07	0,21	10,3	0,02	0,00022	ND			2,6	0,004	0,0016	ND		
Beceiro <i>et al</i> , 2009	ADC-18	0,2	0,06	0,31	84,0	0,02	0,00025	ND			2,5	0,02	0,0096	ND		
Tian <i>et al</i> , 2011	ADC-30	0,51	0,18	0,32	1,4	0,05	0,04	NM			ND			ND		
Rodríguez-Martínez <i>et al</i> , 2011	ADC-33	0,5	1	2	30	4	0,15	1300	10	0,01	5	0,01	0,002	ND		
Tian <i>et al</i> , 2011	ADC-56	1	0,27	0,27	1,4	0,1	0,07	17,2	0,2	0,01	ND			ND		
Jeon <i>et al</i> , 2015	ADC-68	18,5	117,5	0,16	1,7	147,7	0,01	ND			0,14	0,83	0,17	0,15	2,0	0,07

Le tableau présenté est une version simplifiée des valeurs tirées de la littérature. Un tableau plus détaillé, avec les valeurs des écarts-types notamment est disponible en **Annexe 1**. ND : Non déterminé ; NM : Non mesurable. Unités : K_m : en s-1, k_{cat} : μM ; k_{cat}/K_m : μM⁻¹ . s⁻¹.

Classe D

Les β -lactamases de la classe D, ou oxacillinases (OXA), ont pour particularité d'hydrolyser l'oxacilline et la cloxacilline plus rapidement que la benzylpénicilline, même si depuis ce postulat de nouvelles enzymes avec une hydrolyse beaucoup moins importante ont été décrites. *In vitro*, elles sont inhibées par le chlorure de sodium.

Aujourd'hui, près de 1200 variants OXA ont été décrits (<http://bldb.eu/BLDB.php?prot=D#OXA> ; consulté le 15/09/2023) (Naas et al., 2017). Toutes ces enzymes ne présentent pas les mêmes propriétés biochimiques. Ainsi, certaines d'entre elles ne peuvent hydrolyser que les pénicillines, alors que d'autres ont également une activité sur les céphalosporines, et même les carbapénèmes (Evans & Amyes, 2014). Ces dernières sont nommées CHDL (pour *Carbapenem Hydrolysing class D β -lactamases*). Ces enzymes présentent généralement une hydrolyse faible des carbapénèmes et les céphalosporines de troisième génération ne sont pas, ou seulement peu hydrolysées.

Les CHDL sont très souvent associées au genre *Acinetobacter* et certains groupes, formés d'enzymes dont les séquences protéiques sont proches, sont d'ailleurs très souvent retrouvés chez ce genre bactérien. Ainsi les groupes des OXA-23, OXA-24/40 et OXA-58 sont les plus abondantes.

Comme les enzymes de type ADC, les souches de *A. baumannii* possèdent naturellement un gène codant une oxacillinase du groupe OXA-51. Les variants appartenant au groupe des OXA-51-like sont chromosomiques et ne sont retrouvés que chez *A. baumannii* (Turton, Woodford, et al., 2006). Ces derniers peuvent être surexprimés par l'insertion d'une IS en amont, le plus souvent ISAb1, mais également ISAb9, qui, comme pour les ADC, s'intègrent en amont du gène codant l'oxacillinase en apportant un promoteur fort (Figueiredo et al., 2009; Turton, Ward, et al., 2006).

Les β -lactamases de classe D sont particulièrement importantes dans la résistance aux carbapénèmes chez *A. baumannii*, puisque cette dernière est principalement due à la production d'une OXA, les métallo- β -lactamases étant moins fréquentes, bien qu'en constante augmentation ces dernières années (C. Lee et al., 2017; Seshatri et al., 2023).

1.2. Cas des antibiotiques couplés à des sidérophores

Le céfidérocol est une molécule relativement récente, ainsi les mécanismes de résistance restent à ce jour encore mal connus même si certains d'entre eux ont pu être caractérisés ces dernières années.

Initialement, le céfidérocol démontrait une bonne activité sur les souches productrices de carbapénémases, y compris celles produisant des enzymes de type NDM. Pourtant, avec les données plus récentes, il s'avère que les enzymes de type NDM sont impliquées dans la résistance au céfidérocol. Les enzymes de type PER jouent également un rôle dans la résistance au céfidérocol (Poirel

et al., 2021). Outre ces enzymes, les mécanismes de résistance au céfidérol ne sont pas bien caractérisés.

Bien que l'utilisation d'une céphalosporine couplée à un sidérophore n'ait été rendue possible que récemment, le concept de coupler des antibiotiques à des sidérophores n'est toutefois pas nouveau. En effet, d'autres molécules, elles aussi couplées à des sidérophores, ont été synthétisées et étudiées au cours des 30 dernières années (**Tableau 8**). L'étude des mécanismes associés à la résistance pour ces molécules est intéressante puisqu'ils touchent en général les systèmes permettant la récupération des sidérophores, dont ceux couplés aux antibiotiques. Ainsi, les mécanismes de résistance décrits pour les composés utilisés par le passé pourraient également conférer une résistance au céfidérol.

Tableau 8 : Autres composés antibiotiques couplés à un sidérophore étudiés par le passé.

Nom	Nom commun	Classe	Cible	Source
MC-1	-	Monocarbane	PLP3 (<i>P. aeruginosa</i>)	(McPherson et al., 2012)
BAL30072	-	Monobactame	PLP3 (haute affinité), également PLP1a et PLP1b	(Page et al., 2010)
BMS-180680, SQ 84,100	PA-1806	Monobactame	PLP3 (<i>E. coli</i> et <i>P. aeruginosa</i>)	(Fung-Tomc et al., 1997)
GR69153	-	Céphalosporine	-	(Silley et al., 1990)
KP-736	-	Céphalosporine	-	(Tatsumi et al., 1995)
SMC-3176	-	Monocarbane	-	(A. Kim et al., 2015)

Les mécanismes de résistance ayant un lien avec la perméabilité membranaire chez *P. aeruginosa*, comme la perte de la porine OprD, n'altèrent pas l'activité de la plupart des antibiotiques sidérophores, comme le montre le cas du composé MC-1. De même, chez *E. coli*, une hausse de la CMI d'un facteur 2 a été observée chez des mutants délétés de OmpC et OmpF, laissant penser que ces protéines pourraient jouer un rôle dans la perte de sensibilité au composé KP-736, mais qui reste cependant mineur (Page et al., 2010; Tatsumi et al., 1995).

La délétion des gènes codant les systèmes d'efflux n'a pas non plus entraîné de changement significatif dans la sensibilité des souches de *P. aeruginosa* à ces composés, même si la surproduction des systèmes d'efflux MexAB-OprM et MexEF-OprN semblait toutefois impacter certaines molécules, comme BAL30072, tout en restant moins efficace que pour l'efflux du méropénème par exemple (McPherson et al., 2012; Page et al., 2010).

Le rôle des transporteurs du fer semble en revanche primordial dans le développement de résistance à ce type de molécule. Chez *P. aeruginosa*, des mutants ont été obtenus sur l'antibiotique couplé à un sidérophore appelé MC-1. Dans ces mutants, le gène *piuC* était muté, conduisant à un *frameshift* et à une augmentation des CMI pour les composés MC-1 et BAL30072. Ces modifications de CMI pourraient aussi être liées au fait que dans ces souches, le gène voisin *piuA*, était moins exprimé. Bien que la fonction de PiuA ne soit pas à ce jour totalement comprise, cette protéine interviendrait dans la prise en charge du fer. De manière intéressante, la délétion de *piuA* chez *Pseudomonas* conduit à l'augmentation des CMI de MC-1 et BAL30072, et le double mutant $\Delta piuA \Delta pirA$ a montré une CMI plus importante encore, alors que le simple mutant $\Delta pirA$ ne permettait pas d'observer un changement de CMI pour ces deux composés (McPherson et al., 2012). L'absence d'impact dans les mutants de délétion *pirA* a également été constaté dans une autre étude pour un autre composé sidérophore, SMC-3176, laissant penser que ce transporteur n'intervient pas directement dans le transport de ce type de molécule chez *P. aeruginosa*. De même, les mutants de délétion $\Delta piuA$ et $\Delta piuA \Delta pirA$ montraient encore une fois des CMI beaucoup plus élevées pour ce composé. PiuC a aussi été délété, et a montré également une augmentation des CMI (A. Kim et al., 2015). Plus récemment, une étude chez *P. aeruginosa* a même mis en évidence le fait que la délétion de *pirA* n'entraînait pas de résistance significative au céfidérol (Luscher et al., 2018). De manière intéressante, la surexpression de *piuA* ou *pirA* entraînait une hausse de la sensibilité aux composés BAL30072 ou MC-1 des souches de 4 à 32 fois (Moynié et al., 2017). Les conditions d'expérimentation sont toutefois à prendre en considération. *In vitro*, les souches $\Delta piuA$ présentaient une résistance au composé MC-1, alors qu'*in vivo*, le traitement restait tout de même efficace chez des souris infectées (McPherson et al., 2012). Chez *A. baumannii*, l'importance des transporteurs PiuA et PirA a été démontrée puisque leur délétion entraînait une perte de sensibilité de 4 à 8 fois aux composés BAL30072 et MC-1, et une double délétion entraînait une hausse de CMI encore plus importante, comme ce qui a pu être observé chez *P. aeruginosa* (Moynié et al., 2017).

D'autres transporteurs semblent également jouer un rôle, comme PfeA, qui, lorsque délété dans des souches $\Delta piuA$ de *P. aeruginosa*, entraîne aussi une hausse de la résistance à ces composés, bien que cette dernière soit moindre que dans les doubles mutants $\Delta piuA \Delta pirA$ (McPherson et al., 2012). Les régulateurs Fecl et transporteur PvdS semblent aussi contribuer à la résistance à SMC-3176. En effet, dans des mutants résistants au composé SMC-3176, des mutations ont été identifiées en amont des gènes codant ces transporteurs. Ces mutations se situeraient dans le promoteur, et plus précisément sur le site de liaison à Fur (*Ferric Uptake Regulator*), qui est un régulateur de l'entrée du fer dans les bactéries. Parmi les mutants cités précédemment, certains étaient également mutés dans *pirR*, conduisant à un *frameshift* (A. Kim et al., 2015). D'autres transporteurs ont été étudiés, sans qu'aucun effet ne soit mis en évidence. Ainsi l'absence de FpvA, FpvB, FptA seul ou en combinaison (notamment avec PirA) chez *P. aeruginosa* n'a pas eu d'impact sur la résistance au composé BAL30072 (Page et al., 2010).

Chez *E. coli*, ce sont les doubles mutants $\Delta cir\Delta fiu$ qui ont été mis en lien avec une perte de sensibilité aux composés BMS-180680, GR69153 et KPC-736. La protéine Fiu de *E. coli* est un orthologue de PiuA chez *A. baumannii* et *P. aeruginosa* (Moynié et al., 2017). Les souches $\Delta tonB$ et $\Delta exbB$ étaient aussi moins sensibles à BMS-180680 et KPC-736 (Fung-Tomc et al., 1997; Silley et al., 1990; Tatsumi et al., 1995). TonB et ExbB ne sont pas des transporteurs du fer, mais interviennent dans la prise en charge de ce dernier en fournissant l'énergie nécessaire aux transporteurs. Chez *A. baumannii*, des mutants obtenus sur BAL30072 avaient également des mutations conduisant à un *frameshift* dans les gènes codant TonB3, ainsi que ExbD3 (Moynié et al., 2017). Le transporteur FecA jouerait également un rôle, puisqu'une hausse de sensibilité de 4 fois au composé KP-736 a été observée lorsque le gène codant est délété. En revanche, comme pour *P. aeruginosa*, d'autres transporteurs du fer chez *E. coli* ont été étudiés mais n'ont pas montré d'impact : FepA (orthologue de PirA), FhuA et FhuE (Moynié et al., 2017; Tatsumi et al., 1995).

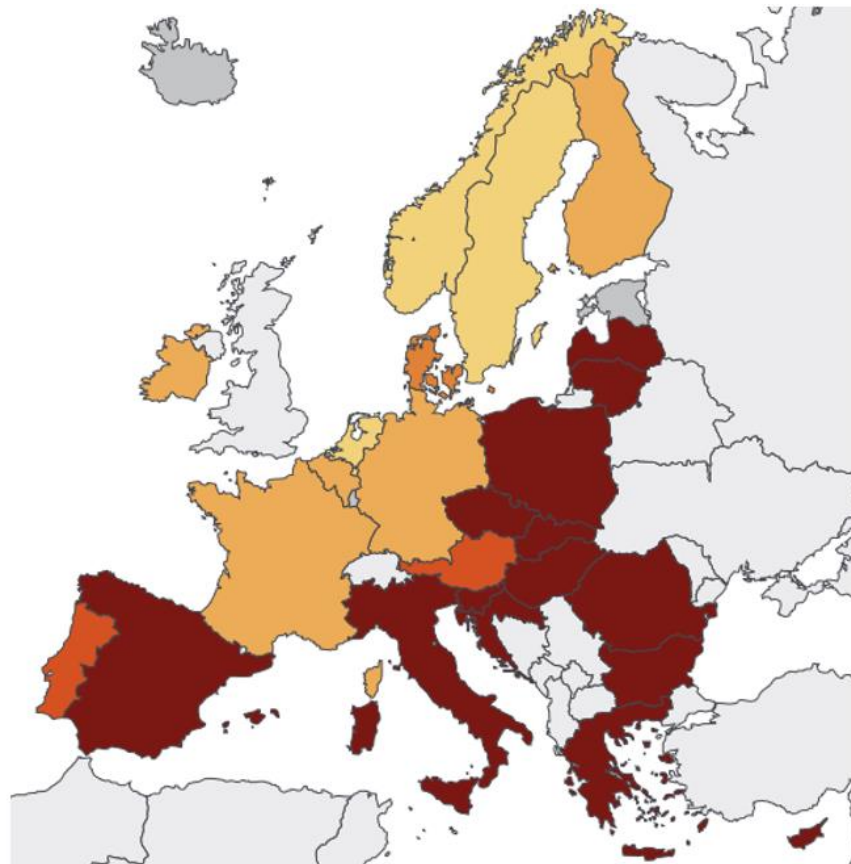
2. Épidémiologie des clones résistants de *A. baumannii*

Aujourd'hui, la résistance aux antibiotiques de *A. baumannii* est d'autant plus problématique que les épidémies provoquées par cette bactérie sont de plus en plus régulièrement causées par des souches résistantes aux carbapénèmes, appelées CRAB. Ces dernières ont été observées sur tous les continents (Hamidian & Nigro, 2019). Ces isolats appartiennent d'ailleurs fréquemment à l'ICL II, et présentent souvent une résistance à d'autres familles d'antibiotiques (Jun et al., 2021).

Le développement de la MLST a permis de mettre en avant que certains clones résistants appartiennent à des ST et complexes clonaux particuliers. Parmi les CC qui sont retrouvés assez couramment, il y a le CC208^{Ox}/CC2^{Pas} (anciennement CC92^{Ox}/CC2^{Pas}), proche de l'ICL II, et qui est fortement responsable de la prévalence importante des CRAB à travers l'Europe et l'Asie. Une étude de 2021 retrouvait le CC208^{Ox}/CC2^{Pas} pour 85,1 % (80/94) des isolats étudiés (Jun et al., 2021; Shi et al., 2021). Ce même CC était déjà retrouvé en Corée en 2009 et démontrait une résistance à différentes molécules d'intérêt thérapeutique, dont la colistine (Park et al., 2009). Le complexe clonal CC109^{Ox}/CC1^{Pas} a également été retrouvé assez régulièrement, tant en nombre d'isolats qu'en répartition géographique, majoritairement dans des pays d'Europe et d'Asie, mais aussi aux USA, Argentine et Australie. Ce complexe clonal a été également incriminé dans des épidémies de souches multirésistantes (Karah et al., 2012). D'autres complexes clonaux se sont révélés importants à l'échelle mondiale : CC131^{Ox} (proche ICL II), CC187^{Ox}/CC3^{Pas}, et CC104^{Ox}/CC15^{Pas}. Le CC15^{Pas} est proche du cluster A, évoqué dans le cadre de l'AFLP (Diancourt et al., 2010).

Certains ST (singletons) ont également été observés pour avoir une distribution dans différents pays, marquant probablement une diffusion trop rapide ne permettant pas une différenciation génétique.

Outre les aspects clonaux, des études à larges échelles sont menées pour avoir une vision globale de la prévalence de la résistance aux antibiotiques, notamment concernant *A. baumannii*. Ainsi, en Europe en 2021, l'étude de l'ECDC portant sur 10 885 isolats de *Acinetobacter* spp. responsables d'infections invasives, a mis en évidence que 74,5 % d'entre eux étaient résistants à au moins une classe d'antibiotiques parmi les fluoroquinolones, aminoglycosides et carbapénèmes, et 66,6 % étaient résistants simultanément à ces trois classes. La résistance à ces molécules, carbapénèmes compris, est en augmentation depuis 2018. Cependant, la résistance aux carbapénèmes est très inégale entre les pays européens, suivant un gradient nord-sud et ouest-est, des moins concernés aux plus touchés (**Figure 13**) ([European Centre for Disease Prevention and Control, 2023](#)).



66

Cette résistance observée sur tous les continents est majoritairement causée par l'acquisition de carbapénèmases par certains clones, et leur émergence ainsi que leur diffusion est fortement problématique. En effet, la résistance aux carbapénèmes se développe de plus en plus chez cette bactérie et ces molécules sont en général le traitement de choix des infections causées par *A. baumannii* multi-résistant, la résistance aux carbapénèmes étant initialement rarement rencontrée (Garnacho-Montero et al., 2015). Il a été observé que l'apparition de souches résistantes à l'imipénème corrélait souvent avec une hospitalisation longue, notamment dans les unités de soins intensifs et une utilisation d'antibiotiques préalable (en particulier de carbapénèmes, mais aussi de céphalosporines de troisième génération) (Baran et al., 2008). La proportion des souches résistantes aux carbapénèmes peut même parfois être très importante. En Chine, le réseau de surveillance national CHINET a constaté une augmentation de la résistance à l'imipénème passant de 32,9 % à 71,7 % et au méropénème de 41,3 % à 78,1 % sur la période 2005-2018, sur des souches provenant de 44 hôpitaux (F. Hu et al., 2016, 2019). Une étude de 2021 a même observé des taux de résistance à l'imipénème et au méropénème de 91,5 % et 93,6 % respectivement sur des souches provenant de prélèvements de liquide céphalo-rachidien ou de sang (Shi et al., 2021).

Le plus souvent, la résistance aux carbapénèmes est médiée par la production d'une carbapénémase. Les oxacillinases (OXA) sont les plus courantes chez *A. baumannii* et sont représentées majoritairement par les enzymes appartenant aux groupes OXA-23, OXA-24, OXA-51 et OXA-58. La carbapénémase OXA-23 est la plus fréquente, et sa prévalence serait en augmentation d'après des études menée à Taiwan (Chusri et al., 2017; Hamidian & Nigro, 2019; Kuo et al., 2010).

En France, le dernier rapport d'activité du CNR de la résistance aux antibiotiques indique qu'au cours de l'année 2022, et comme les années précédentes, les carbapénèmases de classe D (OXA-23, OXA-24/-40, OXA-58) sont largement majoritaires et sont identifiées chez 91,6 % des souches de *A. baumannii* productrices de carbapénèmases (CNR-RA, 2023). Les OXA-23 restent les OXA majoritairement retrouvées chez *A. baumannii* (68,6 % des souches productrices de carbapénèmases de classe D), mais depuis 2020, cette proportion tend à diminuer au profit des carbapénèmases de type OXA-24 (25,8 % des souches productrices d'oxacillinases en 2022). Ce type d'oxacillinase est surtout représenté par le variant OXA-72, retrouvé chez 21,9 % des souches CHDL (*Carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases*). Les OXA-58 sont plus rarement retrouvées, bien que leur nombre soit en augmentation depuis 2018, pour représenter 5,6 % des CHDL en 2022, contre seulement 1,6 % il y a cinq ans.

De manière assez intéressante, les variants de l'oxacillinase naturelle de type OXA-51 peuvent être un indicateur épidémiologique. En effet, certains d'entre eux peuvent être reliés aux clones majoritaires de *A. baumannii*. Ainsi, les variants OXA-65, OXA-66, OXA-76 et OXA-79 sont le plus souvent retrouvés chez les souches appartenant au ST2^{Pas} (ICL II). Les variants OXA-69, -92 et -112 sont quant à eux plutôt retrouvés dans le CC1^{Pas} (ICL I). Enfin, un lien a été fait entre les OXA-71 et le ST3^{Pas} (ICL III) (Villalón et

al., 2013). Ces données sont également observées dans les souches reçues par le CNR-RA de Besançon, avec des souches productrices d'OXA-66 appartenant majoritairement au ST2^{Pas} et des souches productrices d'OXA-69 appartenant majoritairement au ST1^{Pas}, donc là encore au CC1^{Pas} (ICL I). Un lien est aussi visible entre les souches productrices du OXA-90 avec le ST78^{Pas} et les souches productrices d'OXA-94 avec le ST85^{Pas}.

Les enzymes de type NDM sont également problématiques, de par la résistance qu'elles confèrent, puisqu'elles sont aussi parfois responsables d'épidémies (Decousser et al., 2013). De plus, depuis la découverte de ces enzymes, leur prévalence est en constante augmentation. Chez *A. baumannii*, cette tendance s'observe aussi, puisque la prévalence sur les différents continents a au minimum doublé entre les périodes 2011-2015 et 2016-2020, passant de 14 % à 53 % au niveau mondial. Le variant le plus retrouvé est le variant NDM-1 (94,86 %) (Hajikhani et al., 2023). Le succès des enzymes de types NDM peut s'expliquer notamment par (i) la localisation des gènes correspondants sur des plasmides transférables et capables de réarrangement, ce qui permettrait un transfert horizontal entre bactéries, (ii) il n'existe pas à ce jour de consensus dans la détection des MBL entre les différents pays, (iii) le portage asymptomatique fréquent de bactéries hébergeant ces gènes de résistance, (iv) le nombre restreint de molécules actives sur ce type de souches (v) et enfin la capacité de diffusion important de certains clones hébergeant ces enzymes (Khan et al., 2017).

En France, la proportion de souches de *A. baumannii* productrices de NDM a fortement évolué entre 2017 et 2021, passant de 12,5 % à 32,4 %. Au cours de l'année 2022, cette tendance a toutefois connue une diminution, avec une proportion de souches produisant NDM de 21,6 % (rapport 2023 du CNR-RA) (CNR-RA, 2023). Ces souches sont réparties en deux clones majoritaires, le premier ayant pour caractéristique de produire l'oxacillinase naturelle OXA-94 (représentant 34,7 % des souches) et le second regroupant 30,6 % des souches, un chiffre en diminution par rapport à 2021 (44,1 %). Ce deuxième clone a la particularité de produire l'oxacillinase naturelle OXA-69 et l'oxacillinase OXA-23. Il a diffusé dans l'Océan Indien (Mayotte et Ile de la Réunion), mais aussi en Afrique (Côte d'Ivoire, Mali et Sénégal) (rapport 2023 du CNR-RA) (CNR-RA, 2023).

Les CHDL, très fréquemment rencontrées dans les CRAB, leur confère une résistance aux carbapénèmes, mais n'ont que très peu d'impact sur la résistance aux céphalosporines de troisième génération et quatrième génération. La résistance à ces molécules provient donc majoritairement de la surexpression des enzymes de type ADC. D'un point de vue épidémiologique, certains variants ADC sont majoritairement retrouvés.

Il semblerait que l'enzyme ADC-30 soit la plus fréquente, étant retrouvée dans plusieurs régions du monde, dont l'Europe, l'Asie et l'Amérique (T. Chen et al., 2021; D'Souza et al., 2019; A. Hujer et al., 2021; Ingiti et al., 2020; Iovleva, 2019; H. Li et al., 2015; Yang et al., 2018). Comme pour les oxacillinases du groupe 51, il existe une association entre les variants ADC et certains clones. Ainsi, plusieurs ST

portent un gène codant ADC-30 ou un variant proche, dont les ST2^{Pas}(/ST208^{Ox}), ST215^{Pas} et ST92^{Ox}. Plusieurs variants de l'ADC-30, comme l'ADC-73 qui est assez fréquent ou l'ADC-25, sont également retrouvés principalement dans le ST2^{Pas} ([T. Chen et al., 2021](#); [Findlay et al., 2022](#); [H. Li et al., 2015](#); [Villalón et al., 2013](#); [Yang et al., 2018](#)).

Une forte diversification des ADC est observée, avec de nouveaux variants décrits, qui dérivent la plupart du temps de variants ADC couramment identifiés, comme ADC-30. La pression de sélection existante dans le domaine clinique est très probablement responsable de la sélection de ces variants. Le fait que l'analyse des génomes complets soit plus courante contribue aussi probablement à l'identification de nouveaux variants.

Objectifs scientifiques

La résistance aux antibiotiques, en particulier aux β -lactamines, s'avère problématique dans le traitement des infections causées par *A. baumannii*. Bien que la surproduction des ADC soit la cause principale de la résistance aux céphalosporines, et que ces enzymes soient aussi responsables de la résistance étendue aux céphalosporines de quatrième génération comme le céfépime, les ADC sont peu étudiées. Seuls 20 variants ont été décrits, et l'étude la plus récente date de 2014.

De plus, face à la prévalence grandissante des souches de *A. baumannii* résistantes aux antibiotiques, les traitements usuels, comme les carbapénèmes, ne sont plus forcément de rigueur. De nouvelles options thérapeutiques sont donc nécessaires et le céfidérocol est une des seules alternatives intéressantes chez cette espèce. Sa mise sur le marché récente en fait un antibiotique dont l'efficacité véritable est mal connue. Par ailleurs, des souches résistantes au céfidérocol existent et les mécanismes moléculaires sous-jacents sont peu caractérisés.

Les objectifs des travaux réalisés au cours de cette thèse étaient donc les suivants :

1. Caractériser de nouveaux variants ADC, afin de mieux comprendre leur impact clinique
2. Comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de la résistance au céfidérocol chez *A. baumannii*, en s'intéressant d'une part aux mécanismes intrinsèques, mais aussi à ceux pouvant être acquis par des transferts horizontaux de gènes.

Afin de répondre à ces objectifs, les résultats obtenus au cours de ces travaux ont été divisés en trois parties.

Résultats

I. Impact des variants ADC sur la résistance aux β -lactamines

1. Sélection des variants ADC

Au cours de ce travail, nous avons décidé de nous intéresser à l'impact de variations de séquence de l'enzyme ADC identifiés dans des souches résistantes aux β -lactamines de *A. baumannii* reçues au Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques (CNR-RA) de Besançon. L'une des missions du CNR-RA est de caractériser les mécanismes de résistance des souches qui lui sont envoyées, avec un intérêt particulier pour les mécanismes impliqués dans la résistance aux β -lactamines, dont les carbapénèmes. Le CNR-RA est constitué de 4 laboratoires en France, et celui de Besançon est spécialisé dans la caractérisation des souches de *P. aeruginosa* et *A. baumannii*.

Des souches de *A. baumannii* sont donc reçues régulièrement au CNR-RA. Cependant, le séquençage des gènes codant la céphalosporinase naturelle ADC n'est pas fait de manière systématique, et les séquences ne sont obtenues que lorsque qu'un séquençage complet du génome est réalisé ou que la souche présente un phénotype de résistance aux antibiotiques particulier qui pourrait dépendre de la production d'ADC.

La majorité des souches reçues sont productrices de carbapénémases de classe D (type OXA-23, OXA-24/40, OXA-58), mais ces enzymes ont un rôle très limité dans la perte de sensibilité aux C3G comme la ceftazidime ou C4G comme le céfépime. En l'absence d'autres mécanismes acquis pouvant modifier la sensibilité à ces antibiotiques, comme les β -lactamases à spectre étendu, les ADC sont suspectées. En effet il est connu que la surexpression des ADC est courante dans les souches cliniques et entraîne dans ce cas une résistance aux C3G comme la ceftazidime ([Jia et al., 2019](#)). Les ADC pouvant aussi être des ESAC, ces enzymes confèrent alors également une résistance au céfépime notamment. Cependant, peu de variants sont précisément caractérisés et le nombre de variants identifiés a fortement augmenté ces dernières années, notamment grâce au séquençage complet de génome, de plus en plus courant, permettant d'alimenter les bases de données. Notre objectif était donc de mieux comprendre l'impact des variations de séquence de l'enzyme ADC sur la résistance aux β -lactamines des souches cliniques de *A. baumannii*.

Sur les 54 variants ADC identifiés dans des souches cliniques de la collection du CNR, 12 ont été sélectionnés, sur la base des substitutions qui les différencient de l'enzyme ADC-50. Ce variant est celui retrouvé dans la souche de référence *A. baumannii* CIP70.10, qui présente un phénotype sauvage de résistance aux β -lactamines (**Tableau 9**). Certaines substitutions dans les AmpC ont par ailleurs déjà

été décrites notamment chez d'autres espèces, comme *P. aeruginosa*, pour conférer une diminution de sensibilité au céfépime, qui n'est habituellement pas hydrolysé par ces céphalosporinases (Philippon et al., 2022). Certains variants ont aussi été sélectionnés vis-à-vis du profil de résistance inhabituel des souches dans lesquelles ils ont été identifiés.

L'ensemble des substitutions identifiées dans les variants sélectionnés est présenté **Tableau 9** et l'alignement complet des variants est présenté en **Annexe 2**.

Tableau 9 : Substitutions identifiées dans les variants ADC étudiés par rapport à ADC-50 (retrouvé dans la souche CIP70.10).

Séquence en acide aminés																						
ADC-50 (CIP7010)	S 56	T 70**	E 95	Q 126	K 139	P 143	R 148*	A 192	F 201	V 211*	P 213*	A 218*	P 219	G 222	A 246	F 259	T 278	P 279	S 318	N 320	E 347	N 358
ADC-74	R				Q			P		A							A	T		T		D
ADC-276	R				Q		I	P		A							A	T		T		D
ADC-256			V					P									A	T	T	S	K	
ADC-199								P				InsAPAYGV					A	T		T		
ADC-211		N						P	V						T	R	A	T		T		
ADC-33				K		S		P			R	InsA				R	A	T				
ADC-82				K		S		P					L			R	A	T		T		
ADC-30				K		S		P								R	A	T		T		
ADC-56				K		S	Q	P								R	A	T		T		
ADC-73				K		S		P						S		R	A	T		T		
ADC-268				K		S	Q	P						S		R	A	T		T		
ADC-200				K		S		P								R	A	T	T	T		

En bleu : boucle Ω ; en orange : hélice H2. Les variants soulignés sont considérés comme ESAC d'après les données de la littérature. Les positions indiquées d'un ou deux astérisque (*) sont celles pour lesquelles une mutation a déjà été identifiée et conférerait une extension du spectre d'hydrolyse (caractère ESAC) (*chez *A. baumannii* et **chez *P. aeruginosa*). La numérotation des résidus correspond à la nomenclature SANC (Mack et al., 2020).

Les variants ADC-33 et ADC-199 ont ainsi été retenus du fait des insertions d'acides aminés dans l' Ω -loop de ces enzymes en comparaison à ADC-50, en plus d'un phénotype correspondant à un phénotype ESAC sur gélose MH et MH contenant de la cloxacilline (**Figure 14**). Le mutant ADC-211 présentait aussi un phénotype intéressant ainsi qu'une substitution sur un résidu déjà décrit pour conférer un spectre ESAC chez *P. aeruginosa* (T70N). L'étude de ce variant était également l'occasion de vérifier si des mutations décrites comme ESAC chez d'autres espèces conféraient aussi un phénotype ESAC chez *A. baumannii*. Le variant ADC-56, décrit pour conférer de hauts niveaux de résistance au céfépime, a également été sélectionné afin de pouvoir faciliter la comparaison avec les autres ESAC. Les variants ponctuels ADC-74 et ADC-276 ont été choisis car les souches productrices d'ADC-276 présentaient des CMI de céfidérocol au moins 16 fois supérieures à celle de la souche productrice d'ADC-74. Comme ces variants ne différaient que d'une seule substitution (R148I), il était intéressant de pouvoir les comparer. De plus, les diamètres d'inhibition autour des disques de céfidérocol de certains variants (ADC-276 et ADC-268) étaient nettement plus grands sur les géloses contenant de la cloxacilline que sur MH seul, en faveur d'une implication d'une β -lactamase de classe C dans ce phénotype (**Figure 14**).

Parallèlement, d'autres variants (ADC-200 et ADC-256) présentaient le même phénomène autour des disques de carbapénèmes (méropénème et imipénème), suggérant que la perte de sensibilité aux carbapénèmes observée provenait de la production d'une céphalosporinase (**Figure 14**). Enfin, les variants ADC-30 et ADC-73 ont été choisis car il s'agit des deux variants les plus couramment identifiés dans les souches cliniques envoyées au CNR (21,32 % et 32,99 % des souches pour lesquelles le variant ADC a été déterminé respectivement depuis 2016).

Les gènes codant ces différents variants ADC ainsi que le gène *bla*_{ADC-50} utilisé comme référence ont été clonés en aval du promoteur d'*ISAb_a1* dans le vecteur pABEC puis exprimés dans la souche CIP70.10 délétée de son gène *bla*_{ADC} chromosomique (CIP70.10 ΔADC). Dans les souches cliniques, la surproduction de l'ADC est très couramment observée, due à l'insertion de cette IS en amont du gène codant l'ADC. Les expérimentations ont été réalisées de manière à être dans des conditions isogéniques pour l'ensemble des clonages. Le gène *bla*_{ADC-50} a été cloné avec son promoteur naturel et avec le promoteur d'*ISAb_a1*, afin d'étudier l'impact de la surproduction de l'enzyme et d'étudier le phénotype de résistance en découlant.

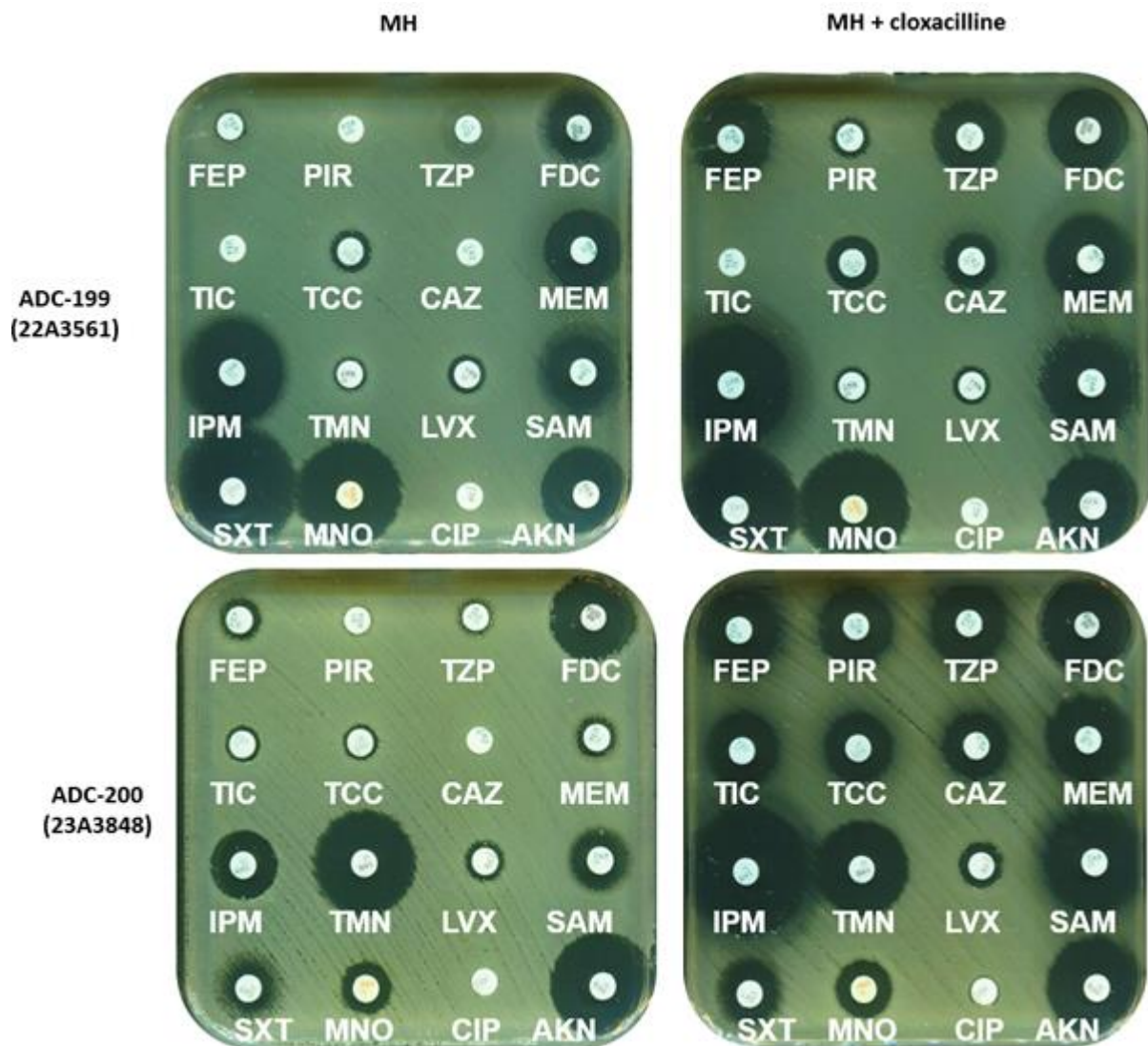


Figure 14 : Antibiogrammes des souches cliniques exprimant certains variants ADC étudiés sur MH et MH contenant 1000 µg/ml de cloxacilline. FEP : Céfépime ; PIR : Pipéracilline ; TZP : Pipéracilline-tazobactam ; FDC : Céfidérocol ; TIC : Ticarcilline ; TCC : Ticarcilline-Acide clavulanique ; CAZ : Ceftazidime ; MEM : Méropénème ; IPM : Imipénème ; TMN : Tobramycine ; LVX : Lévofoxacine ; SAM : Ampicilline-Sulbactam ; SXT : Triméthoprine-Sulfaméthoxazole ; MNO : Minocycline ; CIP : Ciprofloxacine ; AKN : Amikacine.

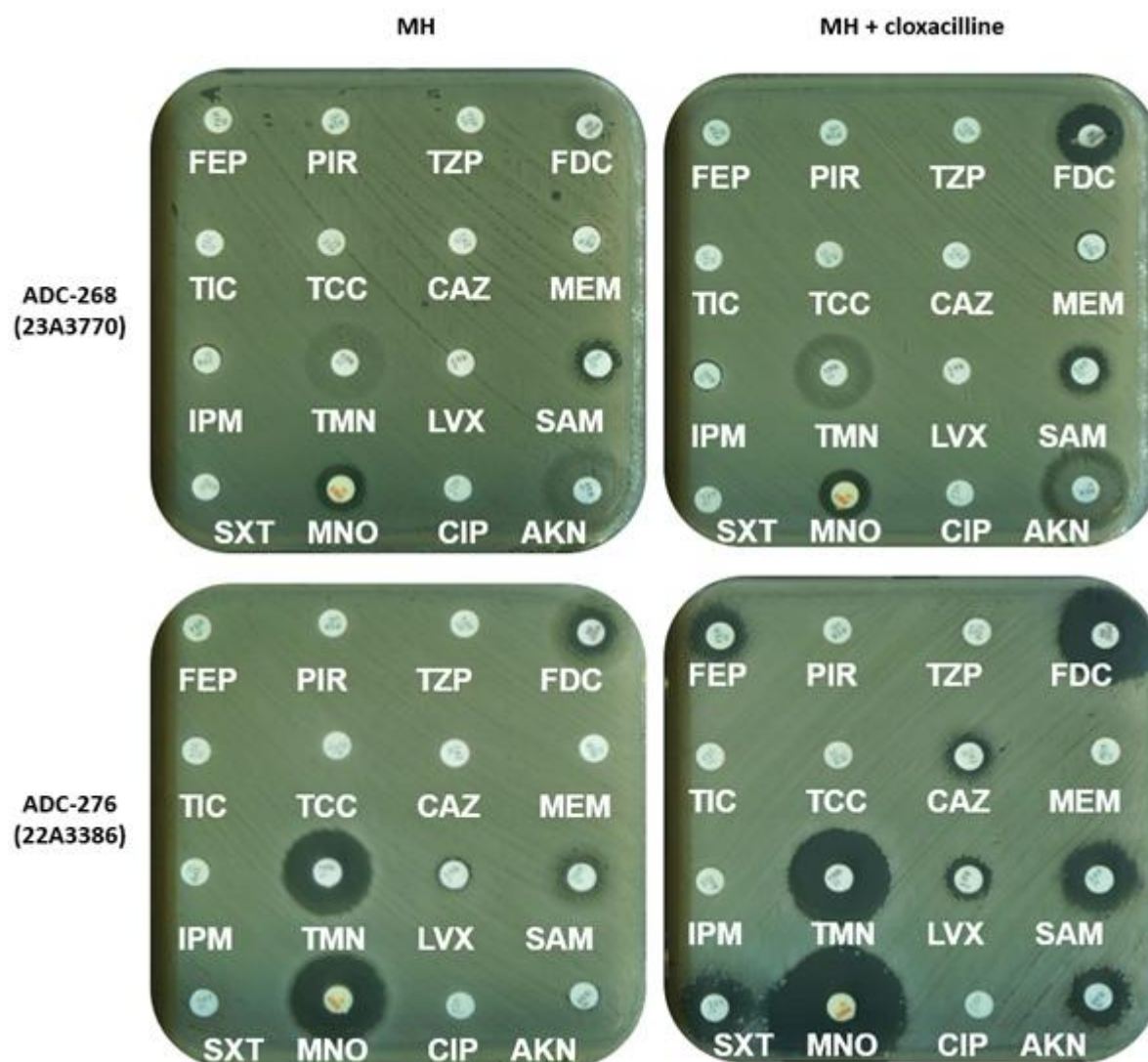


Figure 14 : (Suite). FEP : Céfépime ; PIR : Pipéracilline ; TZP : Pipéracilline-tazobactam ; FDC : Céfidérocil ; TIC : Ticarcilline ; TCC : Ticarcilline-Acide clavulanique ; CAZ : Ceftazidime ; MEM : Méropénème ; IPM : Imipénème ; TMN : Tobramycine ; LVX : Lévofoxacine ; SAM : Ampicilline-Sulbactam ; SXT : Triméthoprim-Sulfaméthoxazole ; MNO : Minocycline ; CIP : Ciprofloxacine ; AKN : Amikacine.

2. Phénotypes de résistance conférés par les variants

La sensibilité des transformants produisant les différents variants a été étudiée par détermination des CMI de différents antibiotiques. Le clonage du gène *bla*_{ADC-50} confèrait une résistance isolée au céfotaxime chez le mutant CIP70.10ΔADC. En revanche, la délétion de ce même gène dans la souche de référence (CIP70.10) n'avait pas entraîné de changement des valeurs de CMI de cette molécule. La surproduction d'ADC-50, médiée par le promoteur d'*ISAb_a1*, entraînait quant à elle une augmentation des CMI de la céfotaxime mais aussi de la ticarcilline et de l'association pipéracilline/tazobactam (**Tableau 10**). Il est également possible que la ceftazidime soit aussi faiblement impactée, même si une différence d'une seule dilution entre deux valeurs de CMI n'est pas considérée comme significative. En revanche, la sensibilité au céfépime et au céfidérocol n'est pas modifiée par la surproduction d'ADC-50. Concernant les carbapénèmes, aucune variation significative de CMI n'a été constatée. Cependant, une hausse de CMI d'une dilution a été notée entre le mutant CIP70.10ΔADC (0,125 µg/ml) et la souche CIP70.10 ΔADC pABEC-ADC-50 dans laquelle le gène *bla*_{ADC-50} a été cloné en aval de son promoteur naturel (0,25 µg/ml) ainsi qu'entre cette dernière et la souche CIP70.10 ΔADC dans laquelle le gène *bla*_{ADC-50} a été cloné en aval du promoteur d'*ISAb_a1* (0,5 µg/ml), suggérant un léger effet de la surproduction d'ADC-50 sur la sensibilité à l'imipénème.

Concernant les autres variants, ces derniers conféraient des profils de résistance aux antibiotiques différents (**Tableau 10**).

Les CMI de la ticarcilline étaient très élevées pour certains variants (ADC-82, ADC-199 et ADC-211). Les variants ADC-199 et ADC-211 présentaient en plus de très hauts niveaux de résistance à la ceftazidime (CMI de 2048 et 1024 µg/ml respectivement) et au céfotaxime (CMI de 2048 µg/ml). L'impact de ces 3 variants sur le céfépime était limité (CMI variant de 8 à 32 µg/ml). Ces trois variants ne possèdent aucune substitution commune, mais possèdent tous au moins une substitution dans la région de l'Ω-loop de l'enzyme (**Tableau 9** et **Figure 15**).

Tableau 10 : Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de différents antibiotiques appartenant à la classe des β -lactamines vis-à-vis de la souche *A. baumannii* CIP70.10, et *A. baumannii* CIP70.10 Δ ADC produisant les différents variants ADC étudiés.

		CMI (μ g/mL)								Mutation ESAC connue ^b
		TIC	TZP ^a	CAZ	CTX	FEP	FDC	IPM	MEM	
<i>A. baumannii</i>	CIP70.10	16	16	8	8	8	0,25	0,25	0,5	-
<i>A. baumannii</i>	CIPΔADC pABEC vide	16	16	4	8	4	0,25	0,125	0,5	-
<i>A. baumannii</i> CIP Δ ADC pABEC-	ADC-50 (PrNat)	8	16	8	64	8	0,25	0,25	0,25	-
	ADC-50 (PrIS)	32	128	16	256	8	0,25	0,5	0,5	-
	ADC-30	64	128	256	512	32	0,25	0,25	0,5	-
	ADC-33	128	128	> 1024	512	64	2	0,5	0,25	P213R, Ins218
	ADC-56	32	64	256	128	512	2	0,5	0,5	R148Q
	ADC-73	128	128	512	> 512	64	0,5	0,125	1	-
	ADC-74	128	128	512	512	16	0,5	0,5	0,5	V211A
	ADC-82	2048	128	128	512	8	0,25	0,25	0,5	-
	ADC-199	512	128	2048	2048	16	0,5	0,25	0,25	Ins218
	ADC-200	128	128	256	256	64	0,25	1	4	-
	ADC-211	2048	128	1024	2048	32	0,25	0,5	1	T70N
	ADC-256	128	128	128	256	32	0,5	0,5	8	-
	ADC-268	32	64	512	256	512	2	0,5	0,25	R148Q
	ADC-276	64	64	256	128	128	2	0,25	1	R148I, V211A

TIC : Ticarcilline ; TZP : Pipéracilline/Tazobactam ; CAZ : Ceftazidime ; CTX : Céfotaxime ; FEP : Céfépime ; FDC : Céfiderocol ; IPM : Imipénème ; MEM : Méropénème. PrNat : Promoteur naturel retrouvé en amont du gène bla_{ADC} ; PrIS : Promoteur d'ISAb₁, entraînant la surexpression de bla_{ADC}.

^a Concentration en tazobactam fixe : 4 μ g/ml

^b Mutations ESAC retrouvées dans les enzymes ADC de *A. baumannii* ou les enzymes PDC de *P. aeruginosa* (Philippon et al., 2022).

Les souches produisant les variants ADC-33, ADC-56, ADC-73, ADC-200, ADC-268 et ADC-276 présentaient quant à elles un haut niveau de résistance au céfépime, avec des CMI variant de 64 à 512 μ g/ml. Les variants ADC-56 et ADC-268 étaient en particulier associés aux plus hauts niveaux de résistance au céfépime (CMI = 512 μ g/ml), suivis d'ADC-276 (128 μ g/ml). Il s'agissait également des variants présentant les CMI de la ticarcilline les plus basses (32 μ g/ml). L'ensemble de tous ces variants, à l'exception d'ADC-276 sont porteurs de la substitution Q126K, qui pourrait expliquer ces niveaux de résistance, en particulier au céfépime. Les variants ADC-56 et ADC-268 sont en plus porteurs de la substitution R148Q. L'enzyme ADC-276 ne porte pas la substitution Q126K mais possède en revanche une substitution sur le résidu 148 (R148I), soit une modification d'acide aminé à la même position que pour les variants ADC-56 et ADC-268.

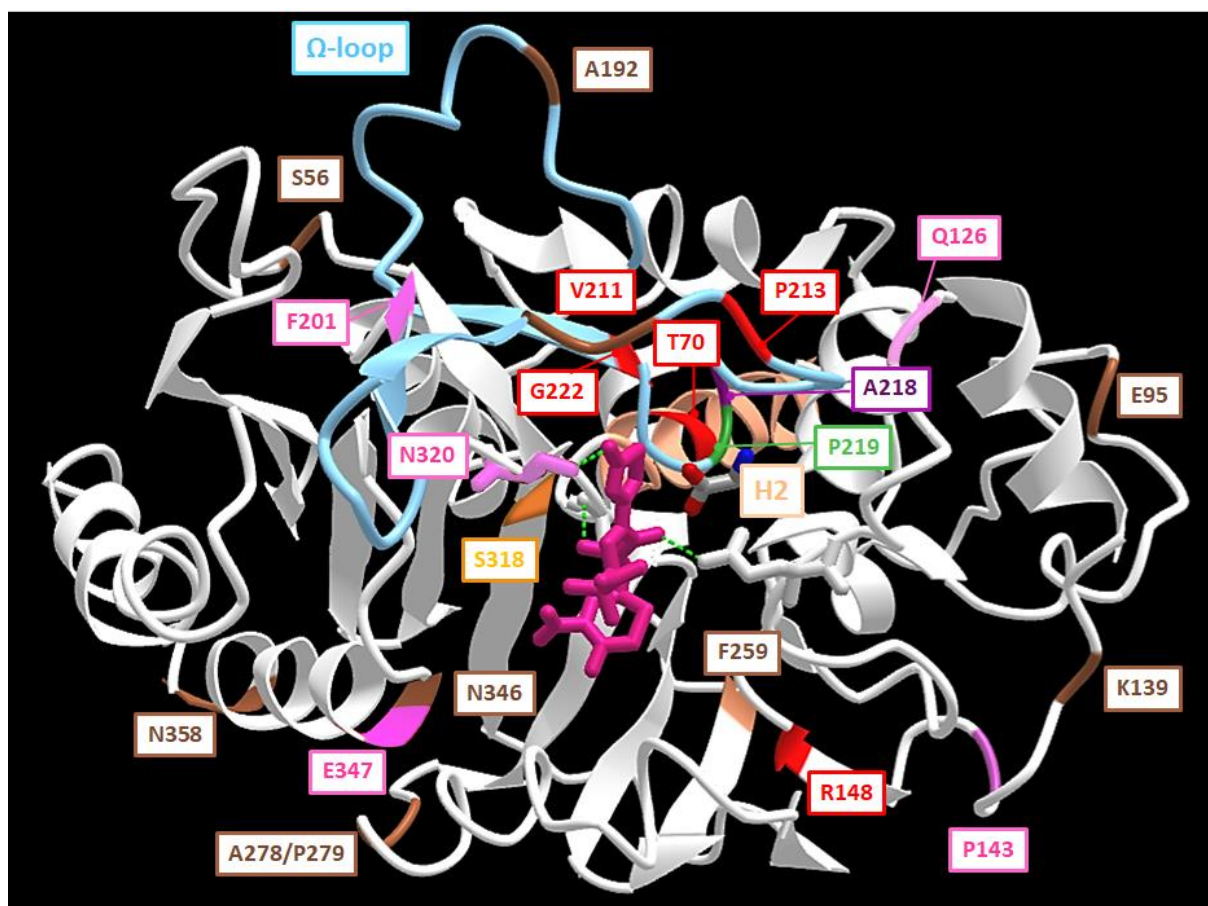


Figure 15 : Sites des substitutions étudiées replacés sur la structure 3D d'ADC-7, en complexe avec la ceftazidime (en fuchsia). L' Ω -loop est indiqué en bleu clair et l'hélice 2 (H2) en orange pale. Les positions indiquées correspondent à celles retrouvées substituées dans les différents variants, avec en rouge, les substitutions conférant un phénotype ESAC, en rose, les substitutions suspectées d'être des ESAC, en moutarde (S318) la position impliquée dans la baisse de sensibilité au méropénème, en vert (P219) la position impliquée dans la hausse de résistance à la ticarcilline, en violet (A218), la zone où des insertions ont été observées, et en brun les positions mutées dans les variants étudiés mais dont l'impact sur le phénotype n'est pas visible. Une molécule de ceftazidime est ici représentée en fuchsia et ses interactions avec l'enzyme sont indiquées en pointillés verts. D'après les données de la banque de données des protéines RCSB (PDB ID : 6PWM).

Les souches qui présentaient les CMI du céfidérocol les plus élevées sont celles produisant les variants ADC-33, ADC-56, ADC-268 et ADC-276 (CMI = 2 $\mu\text{g/ml}$). Le point commun entre ces variants, à l'exception d'ADC-33, est une substitution en position R148. Le rôle de cette substitution dans le développement d'une perte de sensibilité au céfidérocol, notamment dans les souches cliniques, fait l'objet d'une publication en cours de préparation, présentée dans le paragraphe I.3. *Caractérisation de 4 variants ADC impliqués dans la diminution de sensibilité au céfidérocol.* Pour l'enzyme ADC-33, déjà décrite comme ESAC, une substitution conférant un spectre ESAC a été identifiée dans ce variant (P213R), en plus de l'insertion d'un acide aminé dans l' Ω -loop (en position A218), susceptible d'entraîner un changement du spectre d'activité de l'enzyme (Philippon et al., 2022; Rodríguez-Martínez, Nordmann, et al., 2010).

La souche produisant ADC-256 se distinguait quant à elle des autres variants par une CMI du méropénème plus élevée que les autres variants (CMI = 8 $\mu\text{g/ml}$), de même que la souche produisant le variant ADC-200 avec une sensibilité diminuée au méropénème (CMI = 4 $\mu\text{g/ml}$) (Tableau 10). Cet

impact ne semble toutefois pas étendu à tous les carbapénèmes, car la sensibilité à l'imipénème n'est pas impactée de manière significative. Le point commun entre ces deux variants est la substitution S318T. Le rôle de cette substitution dans la diminution de la sensibilité au méropénème fait également l'objet d'un projet de publication qui est présenté dans le paragraphe 1.4. *Caractérisation de variants ADC contribuant à la diminution de sensibilité au des carbapénèmes.*

3. Caractérisation de 4 variants ADC impliqués dans la diminution de sensibilité au céfidérocol

3.1. Résumé et contexte

A ce jour, 3 ans se sont écoulés depuis l'autorisation de mise sur le marché du céfidérocol. Cette molécule étant utilisée en dernier recours et ayant un mécanisme d'entrée particulier par comparaison à d'autres antibiotiques, l'étude des mécanismes impliqués dans la perte de sensibilité du céfidérocol s'est montrée de rigueur. En effet des souches cliniques résistantes ont été décrites, et certains mécanismes impliqués dans la perte de sensibilité du céfidérocol ont déjà été identifiés. Ainsi l'acquisition d'enzymes telles que PER et NDM a été rapportée pour diminuer la sensibilité au céfidérocol des souches (Gaillot et al., 2023; Poirel et al., 2021). D'autres mécanismes comme la perte de transporteurs du fer (en particulier PirA et PiuA chez *A. baumannii*), des mutations dans la PLP3, décrite comme la cible du céfidérocol, ou dans le système à deux composantes BaeSR, régulant le système d'efflux MacAB/TolC et les gènes *adeA* et *adeB*, sont aussi suspectés de contribuer à la perte de sensibilité à cette molécule (Liu et al., 2023; Malik et al., 2020). Toutefois, d'autres mécanismes intrinsèques jouent également très probablement un rôle.

Au cours de ce travail, nous avons caractérisé plusieurs variants ADC modifiant la sensibilité du céfidérocol.

Initialement, ces variants ont été détectés dans deux souches (22A3386 et 23A3770) résistantes aux pénicillines (en association avec des inhibiteurs ou non), aux céphalosporines et aux carbapénèmes. Ces souches étaient aussi résistantes au céfidérocol, avec des CMI de 8 µg/mL et supérieure à 16 µg/mL pour les souches 22A3386 et 23A3770, respectivement. La souche 22A3386, appartenait aux ST^{Pas}636 et ST^{Ox}502 et la souche 23A3770 aux ST^{Pas}2 et ST^{Ox}451, d'après les schémas de Pasteur et Oxford respectivement. Ces souches produisaient une oxacillinase OXA-66, et surproduisaient leur céphalosporinase ADC, étant les variants ADC-276 (22A3386) et ADC-268 (23A3770) grâce à l'insertion de l'*ISAb*₁ en amont du gène *bla*_{ADC}. La comparaison des antibiogrammes réalisés sur des milieux de MH et de MH complémenté en cloxacilline (1000 µg/L) mettait en évidence une zone d'inhibition plus

importante autour du disque de céfidérocol sur gélose contenant de la cloxacilline suggérant une implication de la production d'ADC dans ce phénotype (**Figure 14**).

Ces deux variants n'avaient pas été caractérisés avant cette étude mais ils dérivent tous deux d'autres variants plus courants. En effet l'enzyme ADC-276 diffère d'ADC-74 par la substitution R148I, et le variant ADC-268 diffère d'ADC-73 par une substitution se trouvant à la même position, R148Q. Cette substitution, proche du motif conservé ¹⁵⁰YXN, a déjà été décrite dans le variant ADC-56 (variant ponctuel R148Q par rapport à ADC-30) et entraînait un phénotype ESAC ([Tian et al., 2011](#)).

Afin de mieux comprendre le rôle de ces variants dans la perte de sensibilité du céfidérocol, et notamment de préciser l'importance d'une substitution en position 148, les gènes codant tous ces variants (*bla*_{ADC-74} et *bla*_{ADC-276}, *bla*_{ADC-73} et *bla*_{ADC-268}, et enfin *bla*_{ADC-30} et *bla*_{ADC-56}) ont été clonés sous expression du promoteur fort d'*ISAb_a1*, permettant leur surexpression.

Toutes les souches produisant ces variants présentaient des spectres d'hydrolyse étendus (ESAC) avec au moins une valeur de CMI de ceftazidime élevée, et des valeurs de CMIs du céfépime très hautes (512 µg/ml) dans le cas des variants substitués en position R148 (ADC-56, ADC-268 et ADC-276). De manière intéressante, une hausse des CMIs du céfidérocol de 4 fois était constatée chez ces mêmes variants par rapport aux variants dont ils dériveraient. Ces résultats mettent ainsi en évidence le rôle de cette substitution dans la perte de sensibilité au céfidérocol.

L'intérêt clinique des variants substitués en position R148 reste à démontrer car ils semblent encore peu rapportés dans la littérature. Toutefois, le fait que cette mutation soit retrouvée dans des variants pouvant être assez différents, comme ADC-73 et ADC-74, démontre que son origine n'est pas clonale, mais semble avoir été sélectionnée. De plus, une substitution en position R148 dans AmpC a également été décrite chez une souche de *Citrobacter freundii*, isolée après traitement par céfépime ([Dahyot & Mammeri, 2012](#)). Ainsi, d'autres variants pourrait muter assez aisément en position R148 après une exposition au céfépime, entraînant peut-être aussi une augmentation des CMIs du céfidérocol.

De plus, une épidémie de souches produisant ADC-276 a eu lieu en France entre janvier et avril 2022. Les 4 souches impliquées ont toutes été collectées en région parisienne et sur 3 sites différents. La clonalité des souches a été mise en évidence par l'analyse des génomes complets, révélant également que tous les isolats appartenaient aux ST^{Pas}636 et ST^{Ox}502. Elles présentaient toutes des valeurs de CMIs du céfidérocol au moins 16 fois supérieures à celle d'une autre souche assez proche génétiquement (18A2228, 40 à 41 SNPs d'écart avec les souches ADC-276), isolée en 2018 et produisant le variant ADC-74. Cependant, les clonages des gènes codant les variants ADC-74 et ADC-276 n'a pas permis de retrouver les mêmes niveaux de résistance que dans les souches cliniques, et la seule présence d'une substitution en position R148 d'ADC ne semblait pas pouvoir expliquer des niveaux de résistance aussi élevés.

L'analyse des SNPs différenciant la souche 18A2228 des autres a pu mettre en évidence une substitution dans le gène codant TonB3 (E82G). Cette protéine fait partie d'un complexe qui fournit l'énergie nécessaire au fonctionnement de transporteurs du fer chez les bactéries à Gram négatif, dont *A. baumannii*. De plus, parmi les 4 souches productrices d'ADC-276, l'une d'elles (22A3386) présentait une CMI de céfidérol encore plus importante que les autres (de 4 ou 8 fois). L'analyse des génomes a mis en évidence que cette souche différait d'un seul SNP par rapport aux autres, situé dans le gène codant une protéine nommée PapC (ou FimD). Cette protéine est impliquée dans la biosynthèse des fimbriae (ou pili), et il semblerait qu'elle s'ancre dans la membrane et serve de passage à d'autres protéines. Son impact dans la perte de sensibilité au céfidérol reste à élucider, mais elle n'a jamais été identifiée dans des souches résistantes au céfidérol et ouvre ainsi une nouvelle piste de recherche.

Pour conclure, ce travail a démontré la contribution du résidu 148 de l'enzyme ADC dans la perte de sensibilité au céfidérol. Peu de variants substitués sur ce résidu ont été décrits, mais la pression de sélection pourrait favoriser la sélection de souches mutées, surtout à partir de variants déjà communément retrouvés dans les souches cliniques. La production de tels variants ne semblent toutefois pas suffisante pour conférer à eux seuls de hauts niveaux de résistance au céfidérol, mais peuvent contribuer à l'augmentation des CMIs dans des souches ayant accumulé d'autres mécanismes. Des mutations dans le gène codant TonB3 ont été identifiées, et ce travail met en avant pour la première fois, à notre connaissance, la possible participation de la protéine PapC dans la perte de sensibilité au céfidérol.

3.2. Projet d'article

Four ADC variants impact the cefiderocol susceptibility in *Acinetobacter baumannii* clinical strains

Susie Gaillot^a, Anna-Louise Tortey^a, Salomé Kiener^a, Maxime Bour^b, Pauline Triponney^b, Katy Jeannot^{a,b}, Anaïs Potron^{a,b}#

^a Université de Franche-Comté, CNRS, Chrono-environnement, F-25000 Besançon, France

^b Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques, Laboratoire associé, Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, F-25000 Besançon, France.

Corresponding author: Anaïs Potron ; anaïs.potron@univ-fcomte.fr ; postal address : Laboratoire de Bactériologie, CHU Jean Minjoz, 3 boulevard Alexandre Fleming, 25000 Besançon, France

Running title: Effect of ADC-variants in cefiderocol decreased susceptibility

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, cefiderocol, intrinsic resistance, ADC, ESAC

Abstract.

Background. Cefiderocol is a last-resort option for multidrug-resistant Gram-negative bacteria, particularly for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. Worryingly, resistance to cefiderocol is increasing worldwide and several acquired mechanisms, such as β -lactamases may contribute to a decrease in cefiderocol susceptibility. However, chromosomal resistance to cefiderocol is poorly characterised in this species and the role of the naturally-occurring cephalosporinase ADC remains unknown.

Method. Two novel ADC-variants-encoding genes, *bla*_{ADC-268} and *bla*_{ADC-276}, detected in cefiderocol resistant *A. baumannii* clinical strains, and possessing a mutation leading to a substituted 148 residue compared to ADC-73 and ADC-74, respectively, were cloned to evaluate their effect on cefiderocol decreased susceptibility. Another variant, ADC-56, differing from ADC-30 by a R148Q substitution was also included in this study. An outbreak phenomenon involving 4 ADC-276-positive isolates was genetically investigated by whole-genome sequencing and SNP analysis.

Results. Substitutions at position R148 were shown to contribute to reduced susceptibility to cefiderocol, resulting in a 4-fold increase in cefiderocol MIC compared to their non-substituted ADC counterparts. The clonal spread of 4 ADC-276-positive strains on the French territory was demonstrated and the comparison of the clonally related strains allowed the identification of other chromosomal mutations, such as mutations in the TonB- or PapC-encoding genes in the most resistant strains.

Conclusion. This study highlights the role of intrinsic resistance mechanisms in the reduced susceptibility to cefiderocol and reveals the effect of a peculiar residue of the ADC enzyme. It also reinforces the importance of the association of chromosomal mutations leading to increasing resistance levels in clinical strains.

Introduction

Acinetobacter baumannii is a Gram-negative pathogen that causes healthcare-associated infections, particularly in intensive care units (ICUs). Its propensity to develop multidrug resistance is a hallmark of this bacterium, and carbapenem-resistant *A. baumannii* (CRAB) are particularly threatening to human

health, because they are responsible for difficult-to-treat infections associated with high mortality [2]. Cefiderocol belongs to a new class of antibiotics called cephalosporin siderophores. Cefiderocol has recently been launched and has shown potent activity against Gram-negative bacteria that produce carbapenemases [3]. This antibiotic was initially reported to be particularly promising for the treatment of *A. baumannii* infections, as more than 80% of carbapenem-resistant isolates were initially found to be inhibited by a concentration as low as 2 µg/mL [4–6]. Given the difficulty of treating CRAB, cefiderocol may indeed be an additional option of last resort. However, resistant strains have already been described and transferable mechanisms, such as NDM and PER β -lactamases, may account for the reduced susceptibility of some strains to cefiderocol [7,8]. Furthermore, the two-component system BaeSR has recently been shown to be involved in reduced susceptibility to cefiderocol by upregulating MFS transporters and the efflux pump MacAB-TolC [9]. In addition, reduced expression or mutations in the siderophore receptor genes *pirA* or *piuA*, which mediate ferric uptake, as well as mutations in PBP3 have been reported in strains with high levels of resistance to cefiderocol [10]. In other species, the impact of AmpC mutations have been explored. In *Enterobacter cloacae*, an amino acid deletion in the R2 loop region of this enzyme might be responsible for a 4-fold decrease in cefiderocol susceptibility [11]. Mutations in the AmpC omega-loop region in *Pseudomonas aeruginosa* are also thought to contribute to cefiderocol resistance [12]. A L147F substitution in PDC (*Pseudomonas* derived-cephalosporinase), coupled with premature stop codons in the siderophore receptors PirA and PiuD, has also been identified in *P. aeruginosa* strains resistant to cefiderocol [13]. In *A. baumannii*, overexpression of certain *bla*_{ADC} subtypes (*bla*_{ADC-25} or *bla*_{ADC-33}), associated with reduced ferric iron uptake, was detected in clinical strains resistant to cefiderocol [14]. In this study, we focused on the role of peculiar ADC variants found in clinical strains on cefiderocol reduced susceptibility.

Material and methods

Bacterial strains and plasmid.

The *A. baumannii* clinical isolates were selected from the collection of the French National Reference Center for Antibiotic Resistance (NRC-AR, Besançon, France). The pABEC plasmid was used for

cloning experiments. *E. coli* DH5 α and *A. baumannii* CIP70.10 Δ ADC were used for cloning experiments and susceptibility testing.

Susceptibility testing.

MICs of β -lactams except cefiderocol were determined by the broth microdilution method in cation-adjusted Mueller-Hinton broth (MHB) or by using customized microplates (ThermoFisher, Illkirch-Graffenstaden, France). Cefiderocol MICs were determined using an Iron-Depleted and Cation-Adjusted Mueller-Hinton Broth (ID-CAMHB) and a titrated powder of cefiderocol (MedChem Express) according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute [15]. MIC values were interpreted according to the current EUCAST clinical breakpoints, except for cefiderocol, for which the EUCAST pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) breakpoint ($S \leq 2$; $R > 2$ mg/L) was applied [16].

Genomic data.

The isolates were submitted to whole genome sequencing (P2M platform, Institut Pasteur, Paris, France). Short reads were assembled using Shovill-SPAdes v.3.14.0 and the contigs were annotated with Prokka v1.14.5. Antimicrobial resistance genes (AMR) were identified by the NRC-AR pipelines and databases. Their sequence types (ST) were determined according to both the Oxford and Pasteur MLST schemes (<https://pubmlst.org/abaumannii/>). Single nucleotide polymorphism (SNP) analysis was conducted using SNIPPY v4.4.5, with a minimum sequencing depth at SNP position 10, and a minimum distance between SNPs equal to 8 bp.

Molecular experiment.

The ADC defective mutant was constructed from a wild-type *A. baumannii* CIP70.10 strain (See supplemental appendix 1). The *Acinetobacter baumannii* clinical strains 12A013, 19A2740, 18A2228, 22A3386, 21A3182 and 21A3770, which carry the *bla*_{ADC-30}, *bla*_{ADC-56}, *bla*_{ADC-74}, *bla*_{ADC-276}, *bla*_{ADC-73}, and *bla*_{ADC-268} genes, respectively, downstream of the strong promoter of IS*Aba*1, were used to clone the corresponding ADC-encoding genes into the pABEC plasmid using the primers PrIS*Aba*1_pABEC_fwd (5'-acgatcccctgaattctgcaagatgtgtcatagtattcgctc-3') and pABEC::PrIS*Aba*1-ADC-aval_rev (5'-cagtgtgatggatatctgcagatgatgactatttctctctttttatttag-3') as described previously [8]. The *bla*_{ADC-50} gene was amplified from the laboratory reference strain *A. baumannii* CIP70.10 and subsequently cloned

downstream the strong promotor of *ISAbal* using primer PrISAbal_pABEC_fwd with primer PrIS_rev (5'- taaatcgcatgattagctctctgtacac-3') for the amplification of the *ISAbal* promotor region and primer ADC-50_fwd (5'- ggagctaatacatgcgatttaaaaaatttcttg-3') with primer pABEC::PrISAbal-ADC-aval_rev for the amplification of the *bla*_{ADC-50} gene. The numbering of the residues follows the Structural-Alignment-based Numbering of class C β -lactamases (SANC) scheme, proposed by Mack et al. [1].

Results and discussion

Clinical isolates

Two carbapenem-resistant *A. baumannii* strains (22A3386 and 23A3770) were referred to the French National Reference Centre for Antibiotic Resistance (NRC-AR) for characterization of their antibiotic resistance mechanisms. These two isolates were resistant to penicillins associated or not with β -lactamase inhibitors, to cephalosporins and to carbapenems. Interestingly, both strains were resistant to cefiderocol (Table 1). WGS analysis revealed the presence of a carbapenemase-encoding gene *bla*_{OXA-72} and *bla*_{OXA-23} in isolates 22A3386 and 23A3770, respectively. Multi-locus sequence typing using the MLST schemes available at PubMLST (<https://pubmlst.org>) assigned *A. baumannii* strain 22A3386 to ST^{Pas}636 and ST^{Ox}502, and *A. baumannii* strain 23A3770 to ST^{Pas}2 and ST^{Ox}451 according to the Pasteur and Oxford MLST schemes, respectively (Table 1). Both strains possessed the naturally occurring *bla*_{OXA-66} gene and also overexpressed their natural cephalosporinase-encoding *bla*_{ADC} gene, due to the upstream insertion of *ISAbal*. Both strains carried a new *bla*_{ADC} allele, *bla*_{ADC-276} and *bla*_{ADC-268} in *A. baumannii* 22A3386 and 23A3770 and were deposited under accession numbers: NG_081686.1 and NG_081678.1, respectively. Interestingly, ADC-276 differs from ADC-74 only by the R148I substitution whereas ADC-268 differs from ADC-73 by a unique substitution at the same residue (R148Q), which is close to the conserved ¹⁵⁰YXN motif (Table S2). Residue 148 has indeed been shown to be involved in the hydrolysis of cefepime in some ADC variants such as ADC-56, which differs from the ESAC ADC-30 by the R148Q substitution [17]. ADC-73 and ADC-74 are not closely related and differ by 8 substitutions. However, ADC-73 is very similar to ADC-30 and differs by only one substitution (G222S). ADC-74 on the other hand is not closely related to any other common variant.

Both are frequently found in clinical strains [18–20]. The comparison of amino acid sequences of all those variants is shown in table S2.

Susceptibility testing

To investigate the role of this residue in reduced susceptibility to cefiderocol, the *bla*_{ADC-74}, *bla*_{ADC-276}, *bla*_{ADC-73} and *bla*_{ADC-268} as well as the *bla*_{ADC-56} and *bla*_{ADC-30} were cloned into the pABEC vector and expressed in the *bla*_{ADC}-deleted *Acinetobacter baumannii* CIP70.10 (CIP Δ ADC). Expression of all the *bla*_{ADC} genes was under the strong promoter provided by IS*Aba*1. The naturally occurring *bla*_{ADC-50} gene from *A. baumannii* CIP70.10 was also cloned under the same conditions as a control. With the exception of ADC-50, and in line with what has been described, all variants showed an extended spectrum hydrolysis profile, including at least ceftazidime and also cefepime for the variants substituted at position 148 (ADC-56, ADC-276 and ADC-268) (Table 2). In addition, a 4-fold increase in cefiderocol MIC was observed in the latter three, ranging from 0.5 mg/L for ADC-30, ADC-73 and ADC-74 to the PK/PD value of 2 mg/L for the variants substituted at residue 148 (Table 2). These results shed light on the role of residue 148 in the hydrolysis of cefiderocol.

Clonal dissemination of ADC-276-positive *A. baumannii* strains in France

Although ADC variants with R148 substitutions are still rare (NRC-AR data), they may have clinical significance. The ADC-276-positive strain 22A3386 was in fact responsible for an outbreak involving 4 French patients between January and May 2022. These 4 patients were hospitalized in 3 hospitals located in the same geographical area. Two of them were colonized with the ADC-276-positive *A. baumannii* clinical strain and two were infected (one with bacteraemia and one with pulmonary infection). WGS analysis showed that those 4 strains possessed the same resistome, including the *bla*_{OXA-72} gene encoding the carbapenemase OXA-72. They belong to ST^{Pas}636/ST^{Ox}502, which has been reported in outbreaks and is considered an emerging clone [21,22]. In addition, SNP analysis confirmed that all the strains were clonally related and differed from each other by a maximum of one SNP (Figure 1).

As shown by cloning, the single substitution R148I is not sufficient to confer the level of resistance observed in these clinical strains, which also varied between the isolates. To gain further insight into the genetic determinants involved in cefiderocol resistance, an additional clinical strain, *A. baumannii* 18A2228, which possessed the *bla*_{ADC-74} gene and which was collected in the same geographical area in 2018, was included in this study. This strain belonged to the same ST (Pasteur and Oxford schemes), possessed the *bla*_{OXA-72} gene and had a cefiderocol MIC at least 16-fold lower than the 4 ADC-276-positive strains (Figure 1). This strain 18A2228 (ADC-74) differed from the ADC-276 strains by 41 or 42 SNPs. We investigated the presence of acquired resistance genes that may be involved in cefiderocol resistance and analysed the sequence of other genes suspected of influencing cefiderocol susceptibility (*tonB*, *piuA*, *pirA*, PBP3). None of the ADC-276-positive strains acquired a resistance gene known to alter cefiderocol susceptibility, but all carried a mutated TonB3 (with substitution E82G), which is part of the cytoplasmic-membrane complex that provides energy for the siderophore translocation process [23]. Interestingly, this gene was found to be mutated in 14 cefiderocol-resistant strains collected in the United States [14]. In addition, spontaneous mutants of one *A. baumannii* strain, selected upon exposure to BAL30072, which is a monobactam-siderophore conjugate, carried frameshift mutations in the TonB3 protein [23]. Furthermore, a cefiderocol MIC gap was also observed for *A. baumannii* strain 22A3386, with a cefiderocol MIC 4 to 8 times higher than that of the other ADC-276-positive strains (Figure 1). WGS analysis highlighted the presence of one SNP in strain 22A3386, which occurred in the gene coding for PapC, leading to the P351S substitution. This protein is an ortholog of FimD, which forms a pore and is involved in the transport of other proteins participating in pili assembly in Gram-negative bacteria [24].

Discussion and conclusion

To the best of our knowledge, this work is the first to describe ADC-276 and ADC-268. These two variants confer reduced susceptibility to cefiderocol due to their substitution at residue 148. Among the 303 described ADC-variants, mutations at position R148 were detected in only eight variants, with R148Q being the most prevalent (n=6) (ADC-56, ADC-144, ADC-177, ADC-261, ADC-267, ADC-268), followed by R148I (n=1) (ADC-276) and R148L (n=1) (ADC-294). The R148Q substitution has

previously been reported by Tian *et al.* in their characterization of ADC-56, demonstrating its association with high level of resistance to cefepime [17]. It is also known that mutations close to conserved motif ¹⁵⁰YXN might influence the antibiotic resistance profile of a strain [25]. Given the structural similarity between cefepime and cefiderocol, it is not so surprising to observe a decrease in susceptibility for both molecules in the presence of this substitution. Cross resistance between cefiderocol and other cephalosporins, such as cefepime or ceftazidime, could explain the ease of selection of these variants, due to exposure to antibiotics commonly used in the clinic.

In summary, our data highlight the influence of some ADC-variants in reducing susceptibility to cefiderocol. Substitutions at position 148 seem to be particularly prone to increase cefiderocol MICs. In addition to ADC variants, mutations have been detected in others genes that may influence cefiderocol susceptibility in clinical strains. Consistent with what has been reported, the combination of substitutions in ADC with global reduced iron uptake, associated with substitutions occurring in TonB or TonB-dependent receptors, may result in strains resistant to cefiderocol [14]. In addition, this study suggests that PapC may also contribute to cefiderocol resistance, although further studies are needed to fully understand its influence. Given the high selective pressure in the hospital environment, the emergence of cefiderocol-resistant strains may soon become a major concern.

REFERENCES

- [1] Mack AR, Barnes MD, Taracila MA, Hujer AM, Hujer KM, Cabot G, et al. A Standard Numbering Scheme for Class C β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2020;64:10.1128/aac.01841-19. <https://doi.org/10.1128/aac.01841-19>.
- [2] Jiang Y, Ding Y, Wei Y, Jian C, Liu J, Zeng Z. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: A challenge in the intensive care unit. *Frontiers in Microbiology* 2022;13.
- [3] Yamano Y. In Vitro Activity of Cefiderocol Against a Broad Range of Clinically Important Gram-negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases* 2019;69:S544–51. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz827>.
- [4] Mushtaq S, Sadouki Z, Vickers A, Livermore DM, Woodford N. In vitro activity of cefiderocol, a siderophore cephalosporin, against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2020;64:10.1128/aac.01582-20. <https://doi.org/10.1128/aac.01582-20>.
- [5] Falagas ME, Skolidis T, Vardakas KZ, Legakis NJ, on behalf of the Hellenic Cefiderocol Study Group. Activity of cefiderocol (S-649266) against carbapenem-resistant Gram-negative bacteria collected from inpatients in Greek hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2017;72:1704–8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx049>.

- [6] Jacobs MR, Abdelhamed AM, Good CE, Rhoads DD, Hujer KM, Hujer AM, et al. ARGONAUT-I: Activity of cefiderocol (S-649266), a siderophore cephalosporin, against Gram-negative bacteria, including carbapenem-resistant nonfermenters and Enterobacteriaceae with defined extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2018;63:10.1128/aac.01801-18. <https://doi.org/10.1128/aac.01801-18>.
- [7] Poirel L, Sadek M, Nordmann P. Contribution of PER-Type and NDM-Type β -Lactamases to Cefiderocol Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2021;65:e0087721. <https://doi.org/10.1128/AAC.00877-21>.
- [8] Gaillot S, Oueslati S, Vuilleminot J-B, Bour M, Iorga BI, Triponney P, et al. Genomic characterization of an NDM-9-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate and role of Glu152Lys substitution in the enhanced cefiderocol hydrolysis of NDM-9. *Frontiers in Microbiology* 2023;14.
- [9] Liu X, Chang Y, Xu Q, Zhang W, Huang Z, Zhang L, et al. Mutation in the two-component regulator BaeSR mediates cefiderocol resistance and enhances virulence in *Acinetobacter baumannii*. *MSystems* 2023;0:e01291-22. <https://doi.org/10.1128/msystems.01291-22>.
- [10] Malik S, Kaminski M, Landman D, Quale J. Cefiderocol Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Roles of β -Lactamases, Siderophore Receptors, and Penicillin Binding Protein 3. *Antimicrob Agents Chemother* 2020;64:e01221-20, /aac/64/11/AAC.01221-20.atom. <https://doi.org/10.1128/AAC.01221-20>.
- [11] Kawai A, McElheny CL, Iovleva A, Kline EG, Sluis-Cremer N, Shields RK, et al. Structural Basis of Reduced Susceptibility to Ceftazidime-Avibactam and Cefiderocol in *Enterobacter cloacae* Due to AmpC R2 Loop Deletion. *Antimicrob Agents Chemother* 2020;64:e00198-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00198-20>.
- [12] Simner PJ, Beisken S, Bergman Y, Posch AE, Cosgrove SE, Tamma PD. Cefiderocol Activity Against Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Exhibiting Ceftolozane-Tazobactam Resistance. *Open Forum Infectious Diseases* 2021;8:ofab311. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab311>.
- [13] Streling AP, Al Obaidi MM, Lainhart WD, Zangeneh T, Khan A, Dinh AQ, et al. Evolution of Cefiderocol Non-Susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* in a Patient Without Previous Exposure to the Antibiotic. *Clinical Infectious Diseases* 2021;73:e4472–4. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1909>.
- [14] Asrat H, Samaroo-Campbell J, Ata S, Quale J. Contribution of Iron-Transport Systems and β -Lactamases to Cefiderocol Resistance in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* Endemic to New York City. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2023;0:e00234-23. <https://doi.org/10.1128/aac.00234-23>.
- [15] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100 S, 33th ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA. 2023 n.d.
- [16] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.1, 2023 2023. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.1_Breakpoint_Tables.pdf.
- [17] Tian G-B, Adams-Haduch JM, Taracila M, Bonomo RA, Wang H-N, Doi Y. Extended-Spectrum AmpC Cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*: ADC-56 Confers Resistance to Cefepime. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011;55:4922–5. <https://doi.org/10.1128/AAC.00704-11>.

- [18] Yang Y, Fu Y, Lan P, Xu Q, Jiang Y, Chen Y, et al. Molecular Epidemiology and Mechanism of Sulbactam Resistance in *Acinetobacter baumannii* Isolates with Diverse Genetic Backgrounds in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2018;62:10.1128/aac.01947-17. <https://doi.org/10.1128/aac.01947-17>.
- [19] Findlay J, Poirel L, Bouvier M, Nordmann P. In vitro activity of sulbactam-durlobactam against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and mechanisms of resistance. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 2022;30:445–50. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.05.011>.
- [20] Yusuf E, Tompa M, Strepis N, Klaassen CHW, Goessens WHF. High Prevalence of ST502 Carrying an OXA-24 Carbapenemase gene in Carbapenem-Nonsusceptible *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Isolates in Romania. *Microbial Drug Resistance* 2022;28:636–44. <https://doi.org/10.1089/mdr.2021.0274>.
- [21] Gajic I, Jovicevic M, Milic M, Kekic D, Opavski N, Zrnic Z, et al. Clinical and molecular characteristics of OXA-72-producing *Acinetobacter baumannii* ST636 outbreak at a neonatal intensive care unit in Serbia. *Journal of Hospital Infection* 2021;112:54–60. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2021.02.023>.
- [22] Makke G, Bitar I, Salloum T, Panossian B, Alousi S, Arabaghian H, et al. Whole-Genome-Sequence-Based Characterization of Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Hospital Outbreak. *MSphere* 2020;5:10.1128/msphere.00934-19. <https://doi.org/10.1128/msphere.00934-19>.
- [23] Moynié L, Luscher A, Rolo D, Pletzer D, Tortajada A, Weingart H, et al. Structure and Function of the PiuA and PirA Siderophore-Drug Receptors from *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2017;61:e02531-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02531-16>.
- [24] Nishiyama M, Horst R, Eidam O, Herrmann T, Ignatov O, Vetsch M, et al. Structural basis of chaperone–subunit complex recognition by the type 1 pilus assembly platform FimD. *The EMBO Journal* 2005;24:2075–86. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600693>.
- [25] Philippon A, Arlet G, Labia R, Iorga BI. Class C β -Lactamases: Molecular Characteristics. *Clinical Microbiology Reviews* 2022;35:e00150-21. <https://doi.org/10.1128/cmr.00150-21>.

Table 1. Characteristics of the cefiderocol-resistant *A. baumannii* isolates

Isolate	Pasteur ST / Oxford ST	Cefiderocol MIC (µg/mL)	Intrinsic β-lactamase encoding genes	Acquired resistance genes				
				β-Lactams	Aminoglycosides	Sulfonamides	Tetracyclines	Macrolides, lincosamides and streptogramins
18A2228	636/502	0.125	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{ADC-74}	<i>bla</i> _{OXA-72}	<i>aac(3)-Ia aadA1, aadA13, ant(3'')-IIa, aph(3')-Ia, aph(3')-VIa,</i>	<i>sul1</i>		
22A3386	636/502	8	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{ADC-276}	<i>bla</i> _{OXA-72}	<i>aac(3)-Ia aadA1, ant(3'')-IIa, aph(3')-Ia, aph(3')-VIa,</i>	<i>sul1</i>		
23A3770	2/451	>16	<i>bla</i> _{OXA-66} , <i>bla</i> _{ADC-268}	<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>ant(3'')-IIa, aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, armA</i>	<i>sul1</i>	<i>tetB</i>	<i>msrE, mphE</i>

Table 2. MICs (mg/L) of β-lactams and cefiderocol for *A. baumannii* CIP7010ΔADC, and *A. baumannii* CIP7010ΔADC producing several ADC variants

Antibiotic	<i>A. baumannii</i> CIP7010ΔADC							
	pABEC ADC-50	pABEC ADC-30	pABEC ADC-56	pABEC ADC-74	pABEC ADC-276	pABEC ADC-73	pABEC ADC-268	pABEC
	ADC-30-like			ADC-74-like		ADC-73-like		
Derivate								
ADC Residue 148	R	R	Q	R	I	R	Q	R
Ticarcillin	32	64	32	128	32	128	32	32
Piperacillin-tazobactam ^a	128	128	64	64	64	128	64	8
Ceftazidime	16	256	256	1024	512	512	512	8
Cefepime	8	32	512	16	512	64	512	4
Imipenem	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5
Meropenem	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5
Cefiderocol	0.5	0.5	2	0.5	2	0.5	2	0.25

^a tazobactam fixed concentration = 4 µg/mL

Figure 1. Phylogenetic analysis of the ADC-276-positive clinical strains involved in a French outbreak. The strain 23A3312 was used as reference for SNP analysis and the tree was constructed with the Neighbour Joining algorithm. The tree scale represents one SNP and the numbers indicated on the tree branches correspond to the number of SNPs. FDC: cefiderocol.



3.3. Supplementary data

Supplementary data.

Appendix 1. Supplementary methods.

Deletion of the *bla*_{ADC} gene

In order to observe the resistance phenotype conferred by each variant, the ADC defective mutant was constructed from a wild-type *A. baumannii* CIP70.10 strain. Gene inactivation was carried out using the suicide plasmid pMHL-2 [1] and homologous recombination events. Briefly, recombinant plasmids were constructed by cloning together the upstream and downstream region of the *bla*_{ADC} gene using the NEBuilder Hi-Fi DNA Assembly Cloning Kit (New England Biolabs, Evry, France), and the primers

“Upstream ADC _fwd” (tgaattcgcggccgctgcaaaaaccaaataatagtgcg), “Upstream ADC _rev” (tagggaaaaagattagctcataaattatttaaaaagaag), “Downstream ADC _fwd” (tgagctaattctttccctaaaataaaaagagagaaatagtcacatc) and “Downstream ADC _rev” (tcccatatggtcgacctgcattgctcagccgcagcttag). Assembly products were directly used to transform competent *Escherichia coli* strain DH5α. The recombinant plasmid was then transferred in *A. baumannii* CIP70.10 strain by natural transformation [2]. Transformants were selected on MH plates containing 20 µg/ml apramycine. Excision of remaining pMHL-2 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 10% (wt/vol) sucrose for 24 h, that were retaken and plated again on the same media for 72 h at room temperature. Negative selection on apramycin-containing MH plates allowed the identification of transformants that had lost the plasmid. Finally, the deletion was checked by PCR with primers “Upstream ADC _fwd” and “Downstream ADC _rev” confirmed with Sanger sequencing.

[1] Godeux AS, Lupo A, Haenni M, Guette-Marquet S, Wilharm G, Laaberki MH, et al. Fluorescence-Based Detection of Natural Transformation in Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. Journal of Bacteriology. 2018;200(19):14.

[2] Gaillot S, Oueslati S, Vuilleminot JB, Bour M, Iorga BI, Triponney P, et al. Genomic characterization of an NDM-9-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate and role of Glu152Lys substitution in the enhanced cefiderocol hydrolysis of NDM-9. Front Microbiol. 2023;14:1253160. doi: 10.3389/fmicb.2023.1253160.

Table S2. Substitutions found in the ADC variants ADC-30, -56, 74, -276, -73, -268. Residues in gray are representative of polymorphism. Residues in bold indicate known localization of ESAC-associated mutations identified in *A. baumannii*.

ADC variant	ADC amino-acid substitutions												
ADC-50	S56	Q126	K139	P143	R148	A192	V211	G222	F259	T278	P279	N320	N358
ADC-30		K		S		P			R	A	T	T	
ADC-56		K		S	Q	P			R	A	T	T	
ADC-74	R		Q			P	A			A	T	T	D
ADC-276	R		Q		I	P	A			A	T	T	D
ADC-73		K		S		P		S	R	A	T	T	
ADC-268		K		S	Q	P		S	R	A	T	T	

The ADC-50 sequence was used as reference

4. Caractérisation de variants ADC contribuant à la diminution de sensibilité des carbapénèmes

4.1. Résumé et contexte

Depuis 2019, 13 souches productrices d'ADC-200 et 1 souche productrice d'ADC-256 ont été reçues au CNR-RA. Elles montraient un phénotype particulier de perte de sensibilité aux carbapénèmes, avec une restauration de la sensibilité à ces antibiotiques sur cloxacilline, laissant penser que ces deux variants contribuaient à ce phénotype (**Figure 14**).

Les souches cliniques productrices des ADC-200 et ADC-256 ont été testées pour vérifier si elles possédaient une activité d'hydrolyse des carbapénèmes avec les tests CarbaNP et rCIM (*Carbapenem Inactivation Method*), mais aucune de ces deux méthodes n'a donné de résultat positif.

Afin de vérifier l'impact de ces variants sur le phénotype de résistance des souches, les gènes correspondants *bla*_{ADC-200} et *bla*_{ADC-256} ont été clonés. Le gène *bla*_{ADC-30}, codant le variant ADC-30, dont dérive ADC-200 par une seule substitution (S318T), a également été cloné. Cette substitution S318T est justement la seule qui soit commune aux variants ADC-200 et ADC-256 par rapport à ADC-50 (dont le gène a également été cloné). La comparaison entre ADC-200 et ADC-30 permet donc de mieux comprendre son impact potentiel.

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques a mis en évidence que tous les variants, sauf ADC-50, possédaient un phénotype ESAC avec des valeurs de CMI de la ceftazidime et du céfépime élevées (allant de 128 à 2048 µg/ml pour la ceftazidime et jusqu'à 512 µg/ml pour le céfépime). De manière intéressante, les valeurs de CMI du méropénème de la souche complémentée avec ADC-200 et ADC-256 étaient 8 fois supérieures à celle de ADC-50. En revanche, pour l'imipénème, bien qu'ADC-200 montre une différence de CMI de 2 dilutions par rapport à ADC-30, aucune différence n'est observée entre les variants ADC-256 et ADC-50.

Pour mieux comprendre l'impact possible de la mutation S318T dans un variant non-ESAC, des expériences de mutagenèse dirigée ont été réalisées afin d'obtenir le variant ADC-50 S318T. La détermination de CMI a été réalisée pour ce variant et les deux seules molécules impactées par cette substitution étaient le céfépime et le méropénème. L'impact observé sur le méropénème pour les deux variants provient donc bien de cette substitution.

Les paramètres enzymatiques ont ensuite été déterminés sur les enzymes purifiées ADC-200, ADC-256 et ADC-50 S318T (**Table 2** de l'article). Le k_{cat} correspond à l'activité catalytique de l'enzyme, ou son *turnover*, c'est-à-dire le nombre de molécules hydrolysés sur une période de temps donnée. Le K_m correspond à l'affinité de l'enzyme pour le substrat. La valeur de ce dernier est toutefois inversement

proportionnelle à l'affinité. Enfin, la détermination du k_{cat}/K_m permet ainsi d'avoir une idée générale de la capacité de l'enzyme à convertir le substrat en son produit en tenant compte de ces deux paramètres. Les enzymes ADC-50 et ADC-30, servant ici de références, ont également été purifiées dans les mêmes conditions. L'enzyme ADC-50 est le variant qui présentait la meilleure affinité et la meilleure hydrolyse pour la pénicilline G. Pour la céphalotine, une meilleure affinité était observée pour les variants ADC-30, ADC-200 et ADC-256 mais ces derniers présentaient une constante catalytique (k_{cat}) et une efficacité catalytique (k_{cat}/K_m) plus faibles par rapport à ADC-50. Dans le cas de la ceftazidime, l'affinité était également meilleure avec un k_{cat} plus important pour ces trois variants par rapport à ADC-50, à l'exception d'ADC-30. Pour cette dernière, il est possible qu'un phénomène de *trapping* explique la perte de sensibilité à la ceftazidime, plutôt qu'une hydrolyse. Pour le céfépime, le K_m n'a pas pu être déterminé en utilisant les concentrations les plus importantes possibles de substrat. Cela démontre que même dans les cas des variants ESAC, l'affinité pour cette molécule reste très faible. Pour le méropénème, aucune hydrolyse n'a pu être détectée pour ADC-30, en revanche, les variants ADC-200, ADC-256 et ADC-50 S318T démontraient tous des valeurs de k_{cat}/K_m 3 à 4 fois supérieures par rapport à ADC-50. La substitution S318T semble donc bien impacter les propriétés de l'enzyme, en permettant un meilleur *turnover* du substrat. Enfin, dans le cas de l'imipénème, le K_m n'a pas pu être déterminé pour les variants ADC-30 et ADC-256 en utilisant la concentration maximum de substrat possible, et les résultats ne semblent pas très différents entre les trois autres variants, pour lesquels une légère hydrolyse a tout de même été détectée.

Ces variants présentent un intérêt particulier du fait de leur spectre étendu incluant les carbapénèmes. De plus, entre 2019 et 2023, 13 souches ont été reçues au CNR-RA, toutes productrices du variant ADC-200. Sur les 13 souches, 11 provenaient de la même institution, et les deux autres de deux établissements distincts, situés dans deux autres régions françaises. L'analyse des génomes de six de ces souches a permis de mettre en évidence que ces souches étaient clonales, et qu'une épidémie répartie dans 3 régions différentes de France était en cours. Ces souches appartenaient majoritairement aux ST^{Pas}2 et SP^{Ox}208, ou au moins au même complexe clonal (variation d'un allèle).

Ce travail démontre finalement l'impact de deux variants, ADC-200 et ADC-256, sur la perte de sensibilité au méropénème de souches cliniques. La substitution S318T en particulier joue un rôle important dans l'élargissement du spectre des enzymes. Les variants ADC-200 et ADC-256 étant assez différents, il est fort probable que la sélection de cette substitution soit le résultat de la pression de sélection.

4.2. Projet d'article

Characterization of two meropenem-hydrolysing ADC variants, ADC-200 and ADC-256, in *Acinetobacter baumannii*

Susie Gaillot^a, Salomé Kiener^a, Saoussen Oueslati^c, Maxime Bour^b, Anna-Louise Tortey^a, Remy Bonnin^{c,d}, Katy Jeannot^{a,b}, Anaïs Potron^{a,b,#}

^a Université Franche-Comté, UMR CNRS 6249 Chrono-Environnement, F-25000 Besançon, France

^b Laboratoire associé -- Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques, Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, F-25000 Besançon, France.

^c Université Paris-Saclay, Equipe INSERM U1184 ReSIST, F-94275 Le Kremlin-Bicêtre, France

^d Laboratoire Associé – Centre National de Référence de la Résistance aux antibiotiques, F-94275 Le Kremlin-Bicêtre, France

Corresponding author: Anaïs Potron ; anais.potron@univ-fcomte.fr ; postal address :
Laboratoire de Bactériologie, CHU Jean Minjoz, 3 boulevard Alexandre Fleming, 25000
Besançon, France

Running title: Characterization of two ADC variants implicated in carbapenem resistance in
Acinetobacter baumannii clinical strains

Abstract

Objectives To demonstrate the impact of the key S318T substitution identified in the sequence of the two ADC-200 and ADC-256 variants in the decreased susceptibility of meropenem in *A. baumannii* clinical strains.

Methods The *bla*_{ADC-200} and *bla*_{ADC-256} genes were cloned into plasmids pABEC and pET41b, then transformed into *Escherichia coli* DH5α and *Acinetobacter baumannii* CIP70.10 for MICs determination and into *E. coli* BL21 Rosetta-Gami for enzyme purification. Steady-state kinetic parameters were determined using purified enzymes ADC-50, ADC-30, ADC-200, ADC-256 and ADC-50 S318T. Directed-site mutagenesis was also performed to confirm the impact of substitution S318T.

Results Production of ADC-200 and ADC-256 resulted in an 8-fold increase in meropenem MICs compared to ADC-50. Purification of the enzymes and determination of enzymatic parameters showed that variants ADC-200 and ADC-256, as well as ADC-50 S318T, had a higher catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) towards meropenem than ADC-50, indicating that the S318T substitution plays a role in the hydrolysis of meropenem. In addition, we reported that an outbreak of ADC-200-positive strains was ongoing on the French territory since 2019 and involved 13 patients hospitalized in three different geographical area.

Conclusion This study highlights the role of the S318T substitution in the ADC enzyme in *A. baumannii* in the loss of susceptibility to meropenem. This substitution can occur in any variant, and therefore, any strain might acquire a loss of susceptibility to meropenem without acquiring horizontally transferred genes nor overproducing their naturally-occurring oxacillinase.

Introduction

In recent years, the emergence of multidrug-resistant bacteria has become a major public health concern worldwide (1). Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) strains are well known for their ability to persist in the hospital environment (2). They are mainly responsible for outbreaks in the most vulnerable patients and, once established, are difficult to eradicate. In this species, carbapenem resistance is acquired mostly by horizontal gene transfer (HGT) through the acquisition of genes encoding carbapenemases, mainly belonging to the groups OXA-23, OXA-24/40, OXA-58 or NDM (3,4). In addition, the overexpression of the natural oxacillinase-encoding gene by insertion of an *ISAb_a1* insertion sequence upstream of the corresponding gene increases carbapenem resistance levels, by providing a strong promoter (5,6). *ISAb_a1* can also be inserted upstream of the *bla_{ADC}* gene, which codes for the cephalosporinase ADC, leading to its overproduction (7). Of the 303 ADC variants deposited (BLDB) (8), 8 have been described to have an extended hydrolysis spectrum towards oxyiminocephalosporins, due to substitutions mainly occurring in the Ω -loop or in the R2-loop (9–12). One single ADC variant, namely ADC-68, which differs from ADC-1 by 7 amino-acid substitutions, has been reported to contribute to reduced susceptibility to carbapenems (13). In this study, we have characterized two new variants, ADC-200 and ADC-256, which confer reduced susceptibility to meropenem. Their susceptibility profiles, their steady-state kinetic parameters and the contribution of their common S318T substitution were determined. In addition, the emergence of ADC-200-producing in *A. baumannii* clinical strains and their involvement in an outbreak phenomenon was investigated.

Material and methods

Bacterial strains and plasmids

The *A. baumannii* clinical isolates were selected from the collection of the French National Reference Center for Antibiotic Resistance (NRC-AR, Besançon, France). The pABEC plasmid (14) was used for cloning and susceptibility testing whereas the pET41b (Invitrogen, Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) plasmid was used for protein production and purification. *E. coli* DH5 α and *A. baumannii* CIP70.10 Δ ADC were used for cloning experiments and susceptibility testing. Protein production of ADC-50, ADC-200, ADC-256, ADC-30 and ADC-50 S318T was carried out using *E. coli* BL21 Rosetta-Gami.

Molecular experiments

The ADC defective mutant (CIP Δ ADC) was constructed from a wild-type *A. baumannii* CIP70.10 strain (Institut Pasteur - ATCC 15151) (See supplemental appendix 1). The genes *bla*_{ADC-30}, *bla*_{ADC-200}, and *bla*_{ADC-256} downstream of the strong promoter of IS*Aba*1 from the *A. baumannii* clinical strains 12A013, 19A2601 and 20A3025 respectively, were cloned into the pABEC plasmid using the primers PrIS*Aba*1_pABEC_fwd (5'-acgatcccctgaattctgcaagatgtgtcatagtattcgtc-3') and pABEC::PrIS*Aba*1-ADC-aval_rev (5'-cagtgtgatggatatctgcagatgatgactatttctctctttttatttttag-3') as described previously (15). The *bla*_{ADC-50} gene was amplified from the laboratory reference strain *A. baumannii* CIP70.10 with specific primers and subsequently cloned downstream the strong promoter of IS*Aba*1 using primer PrIS*Aba*1_pABEC_fwd and primer PrIS_rev (5'-taaatcgcatgattagctcctctgtacac-3') for the amplification of the IS*Aba*1 promoter region and primer ADC-50_fwd (5'-ggagctaatacatgcgatttaaaaaatttcttg-3') with primer pABEC::PrIS*Aba*1-ADC-aval_rev for the amplification of the *bla*_{ADC-50} gene.

The recombinant plasmids pET41b::ADC-50, pET41b::ADC-50 S318T, pET41b::ADC-30, pET41b::ADC-200 and pET41b::ADC-256 were obtained as described previously using primers listed in supplemental appendix 1 (15).

Site-directed mutagenesis

Site-directed mutagenesis was performed to obtain pABEC::ADC-50 S318T using the kit *GeneArt® Site Directed Mutagenesis System* kit (Invitrogen, Carlsbad, USA). The recombinant plasmid pABEC::ADC-50 was used as a template for the insertion of the S318T mutation with the primers ADC50-S318T_fwd (5'-GTACCATAAACTGGCACAACGTTTCGG-3') and ADC50-S318T_rev (5'-CCGAAACCGTTAGTTGTGCCAGTTTTATGGTAC-3').

Whole genome sequencing

The isolates were submitted to whole genome sequencing (P2M platform, Institut Pasteur, Paris, France). Short reads were assembled using Shovill-SPAdes v.3.14.0 and the contigs were annotated with Prokka v1.14.5. Antimicrobial resistance genes (AMR) were identified by the NRC-AR pipelines and databases. Their sequence types (ST) were determined according to both the Oxford and Pasteur MLST schemes (<https://pubmlst.org/abaumannii/>). Single nucleotide polymorphism (SNP) analysis was conducted using SNIPPY v4.4.5, with a minimum sequencing depth at SNP position 10, and a minimum distance between SNPs equal to 8 bp.

Susceptibility testing

MICs for ticarcillin, piperacillin-tazobactam, ceftazidime, cefepime, imipenem and meropenem were determined by broth microdilution method in cation-adjusted Mueller-Hinton broth (MHB). For the clinical strains, customized microplates (ThermoFisher, Illkirch-Graffenstaden, France) were used. Cefiderocol MICs were determined using an Iron-Depleted and Cation-Adjusted Mueller-Hinton Broth (ID-CAMHB) and a titrated powder of cefiderocol (MedChem Express) according to the recommendations of the Clinical and Laboratory

Standards Institute. MIC values were interpreted according to the current EUCAST clinical breakpoints (16).

Carbapenem hydrolysis

The ability of the strains to hydrolyze carbapenems was evaluated by the CIM method (17) and with the RAPIDEC® CarbaNP test (bioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) (18,19).

Protein purification and steady-state kinetic determinations

Preparation of recombinant plasmids and protein purification are detailed in the supplementary material (Appendix 1). Kinetic parameters (K_m and k_{cat}) were determined using purified ADC-50, ADC-50 S318T, ADC-30, ADC-200 and ADC-256 β -lactamases in 100 mM phosphate buffer (pH 7.4) at room temperature (30°C). The k_{cat} and K_m values were determined by analyzing β -lactam hydrolysis under initial-rate conditions using the Eadie-Hofstee linearization of the Michaelis-Menten equation with SFWIFT II software. The 50% inhibitory concentrations (IC50) were determined for ADC-30 as the concentrations of benzylpenicillin that reduced the rate of hydrolysis of 100 μ M ceftazidime by 50% under conditions in which ADC-30 were preincubated with 50, 100 and 200 μ M concentrations of reporter substrate for 3 min at 30°C before addition of the substrate.

Results and discussion

ADC-200 and ADC-256 effect the meropenem susceptibility

A. baumannii clinical strains 19A2601 and 20A3025 were resistant to penicillins with or without β -lactamase inhibitors, cephalosporins and to meropenem (Table 1). Strain 19A2601 was resistant to imipenem (MIC=8 μ g/mL) whereas strain 20A3025 was susceptible (MIC=2 μ g/mL). Biochemical tests based on carbapenem hydrolysis (CarbaNP test) and on carbapenem inactivation method (rCIM) gave negative results. Addition of cloxacillin restored

susceptibility to carbapenems (data not shown), suggesting the involvement of a class C β -lactamase in this phenotype. *In silico* analysis of β -lactamase content revealed no acquired β -lactamase in *A. baumannii* 19A2601 and 20A3025, but two unusual ADC variants, ADC-200 and ADC-256, respectively. While ADC-200 differed from ADC-50 from 8 amino-acids, ADC-256 differed from 7 different amino-acids, but shared the S318T amino-acid substitution. Interestingly, ADC-200 is a single amino acid variant (S318T) from the widespread ADC-30 variant. In both strains, the *bla*_{ADC} gene was overexpressed due to the insertion of IS*Aba*1 upstream of *bla*_{ADC}.

To evaluate the impact of ADC-200 and ADC-256 enzymes on carbapenem susceptibility, four 1281-bp long PCR fragments encompassing the *bla*_{ADC-50} (used as a reference), *bla*_{ADC-30} (also used as a reference in comparison with ADC-200), *bla*_{ADC-200} and *bla*_{ADC-256} genes, respectively, were cloned into the shuttle vector pABEC and subsequently expressed in the *A. baumannii* CIP70.10 Δ ADC mutant. Compared to ADC-50, the production of ADC-30, ADC-200 or ADC-256 resulted in a 4- or 8-fold increase in ceftazidime and cefepime MICs (Table 1). An 8-fold increase in meropenem MIC was observed for ADC-200 and ADC-256 without significant change in imipenem MIC (Table 1). Introduction of the S318T substitution by site-directed mutagenesis in the ADC-50 sequence of CIP Δ ADC pABEC::*ADC-50* resulted in an 8-fold increase in meropenem MIC to a level similar to those observed when the ADC-200 and ADC-256 enzymes are cloned, clearly indicating that the S318T substitution is associated with reduced meropenem susceptibility. However, meropenem MIC of the clinical strains were highest, suggesting the contribution of other genetic determinants. Cefepime MICs were also higher (32 μ g/mL for ADC-50 S318T vs 8 μ g/mL for ADC-50) but no significant changes were observed for imipenem, ceftazidime or any other antibiotic tested.

Kinetic studies

Kinetic studies were performed with purified ADC-type enzymes (Table 2). ADC-50 was used as a control for comparison. Compared to the other variants, ADC-50 possessed the higher affinity for penicillin G and the higher turnover rate, resulting in a catalytic efficiency 6 to 20 times higher than the other variants (Table 2). These results are consistent with the findings of Nordmann & Mammeri, who reported that ESAC enzymes usually have a reduced effect on penicillins (20). Cephalothin was the better substrate for all the variants tested. The variants ADC-30, ADC-200 and ADC-256 showed a slightly better affinity for this substrate compared to ADC-50, but with a lower k_{cat} value, resulting in a lower catalytic efficiency (k_{cat}/K_m). Insertion of the S318T substitution into ADC-50 led to a 2-fold reduction in the turnover rate and in the catalytic efficiency, to values close to those of ADC-200 and ADC-256. For ceftazidime, the K_m value was also lower for all the variants compared to the reference ADC-50, indicating a better affinity for this substrate. The turnover rate was low for all enzymes, and 10-times lower for ADC-30. Compared to ADC-50, the resulting k_{cat}/K_m ratios were higher for ADC-200, followed by ADC-256 and ADC-50 S318T, perfectly mirroring the ceftazidime MICs. However, the catalytic efficiency of ADC-30 towards ceftazidime was very low, suggesting a trapping mechanism rather than hydrolysis for ADC-30. Cefepime was also used as a substrate, but the K_m was not determinable with the highest concentration of antibiotic tested (1700 μM), even for ADC-30. Such results corroborate with those of Tian *et al*, who couldn't determine the enzymatic parameters of ADC-30 towards cefepime, despite its classification as an ESAC (21). All variants tested, including ADC-50, but not ADC-30, showed hydrolysis for meropenem. The ADC-200, ADC-256 and ADC-50 S318T variants all showed a higher k_{cat}/K_m (3 to 4 times) than for ADC-50, demonstrating that the S318T substitution contributes to the hydrolysis of meropenem, resulting in changes in the MIC. ADC-30 and ADC-

256 exhibited a very low affinity for imipenem, which prevented accurate determination of the other kinetic parameters. A slight hydrolysis of imipenem was observed for ADC-50, ADC-200 and ADC-50 S318T. Overall, the kinetic studies confirmed the role of the S318T substitution in meropenem hydrolysis and interestingly highlighted a slight hydrolysis of imipenem by several imipenem variants, including the naturally-occurring ADC-50 of *A. baumannii* strain CIP70.10. These results complicate interpretation of the effect of the S318T substitution on imipenem hydrolysis. As the k_{cat}/K_m ratios were not determined for ADC-30 and ADC-256, it is tempting to speculate that the S318T residue enhances imipenem hydrolysis but in association with another residue present in ADC-200 (and consequently in ADC-30).

Clonal diffusion of ADC-200 in French hospitals

ADC-200 and ADC-256 are rather rare variants. However, since 2019, 13 ADC-200-positive strains have been collected, of which 11 came from the same institution. The remaining two were recovered from two different establishments in two other distinct regions (Table S1). WGS was performed for 6 strains, and the majority belonged to ST^{Pas}2 and ST^{Ox}208, and other belonged to the same clonal complex (with one allele difference). A SNP analysis was performed to better discriminate the isolates, showing that the 6 ADC-200-positive isolates differed by 1 to 15 SNPs. Interestingly, the single isolate from hospital B (23A3711) differed by one SNP from the isolate collected from hospital C (23A3774), and both differed by only 1 to 3 SNPs from two strains collected from hospital A in 2022 and 2023 (Figure 1).

Conclusion

In this study, we demonstrate the contribution of the S318T substitution in two ADC variants in reducing susceptibility to meropenem. The appearance of the S318T substitution in two variants that are not closely related is worrying, as it suggests that more *A. baumannii* strains

could develop such a substitution. This mechanism of reduced susceptibility to meropenem diversifies the intrinsic armamentarium of carbapenem resistance in *A. baumannii*. In addition, an outbreak of ADC-200-positive strains is ongoing on French territory and has now involved 13 patients hospitalized in three different geographical areas. This variant doesn't seem to be very common, as the French NRC-AR was the first to deposit the sequence (Accession number: NG_066480) and no report on ADC-200 has been published recently. Concerning ADC-256, only two strains coming from the same patient have been recorded at the NRC-AR, and, to our knowledge, no other description of this variant has been made. However, ADC-200 has been identified in ST^{Pas2} isolates, which belong to the International Clone II, which itself includes the majority of carbapenem-resistant *A. baumannii* isolates. The presence of other carbapenem resistance determinants, such as an OXA-23, OXA-24/40, OXA-72 or NDM type carbapenemase, could greatly hinder the detection of these naturally occurring ADC variants, which can easily spread under the radar.

Acknowledgements

The authors thank medical microbiologists for referring the carbapenem resistant *A. baumannii* strains to the French NRC-AR. We thank Lison Schmidlin for technical assistance.

Funding

The NRC-AR is funded by the French Ministry of Health through the Santé publique France agency.

Transparency declaration

None to declare.

References

1. Antimicrobial Resistance in the EU/EEA (EARS-Net). Annual Epidemiological Report for 2021. [Internet]. 2022. Disponible sur: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER-EARS-Net-2021_2022-final.pdf
2. Longo F, Vuotto C, Donelli G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. New Microbiol. 1 avr 2014;37(2):119-27.
3. Chan KW, Liu CY, Wong HY, Chan WC, Wong KY, Chen S. Specific Amino Acid Substitutions in OXA-51-Type β -Lactamase Enhance Catalytic Activity to a Level Comparable to Carbapenemase OXA-23 and OXA-24/40. International Journal of Molecular Sciences. janv 2022;23(9):4496.
4. Liu N, Zheng X, Zhu Q, He Z, Hu S. The Dissemination of NDM-1 in *Acinetobacter baumannii* Strains. Curr Microbiol. 26 févr 2022;79(4):117.
5. Turton JF, Ward ME, Woodford N, Kaufmann ME, Pike R, Livermore DM, et al. The role of ISAb_a1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS Microbiology Letters. 1 mai 2006;258(1):72-7.
6. Figueiredo S, Poirel L, Papa A, Koulourida V, Nordmann P. Overexpression of the Naturally Occurring blaOXA-51 Gene in *Acinetobacter baumannii* Mediated by Novel Insertion Sequence ISAb_a9. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. sept 2009;53(9):4045-7.
7. Héritier C, Poirel L, Nordmann P. Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAb_a1 in *Acinetobacter baumannii*. Clinical Microbiology and Infection. févr 2006;12(2):123-30.

8. Naas T, Oueslati S, Bonnin RA, Dabos ML, Zavala A, Dortet L, et al. Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 1 janv 2017;32(1):917-9.
9. Philippon A, Arlet G, Labia R, Iorga BI. Class C β -Lactamases: Molecular Characteristics. *Clinical Microbiology Reviews*. 18 avr 2022;35(3):e00150-21.
10. Pérez A, Pérez-Llarena FJ, García P, Kerff F, Beceiro A, Galleni M, et al. New mutations in ADC-type β -lactamases from *Acinetobacter* spp. affect cefoxitin and ceftazidime hydrolysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 sept 2014;69(9):2407-11.
11. Rodríguez-Martínez JM, Poirel L, Nordmann P. Genetic and Functional Variability of AmpC-Type β -Lactamases from *Acinetobacter baumannii*. *AAC*. nov 2010;54(11):4930-3.
12. Rodríguez-Martínez JM, Nordmann P, Ronco E, Poirel L. Extended-Spectrum Cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*. *AAC*. août 2010;54(8):3484-8.
13. Jeon JH, Hong MK, Lee JH, Lee JJ, Park KS, Karim AM, et al. Structure of ADC-68, a novel carbapenem-hydrolyzing class C extended-spectrum β -lactamase isolated from *Acinetobacter baumannii*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 1 nov 2014;70(11):2924-36.
14. Gaillot S, Oueslati S, Vuilleminot JB, Bour M, Iorga BI, Triponney P, et al. Genomic characterization of an NDM-9-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate and role of Glu152Lys substitution in the enhanced cefiderocol hydrolysis of NDM-9. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2023 [cité 28 août 2023];14. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1253160>
15. Vuilleminot JB, Bour M, Beyrouthy R, Bonnet R, Laaberki MH, Charpentier X, et al. Genomic analysis of CTX-M-115 and OXA-23/-72 co-producing *Acinetobacter baumannii*, and their potential to spread resistance genes by natural transformation. *J Antimicrob Chemother*. 29 mai 2022;77(6):1542-52.

16. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.1, 2023 [Internet]. 2023. Disponible sur: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.1_Breakpoint_Tables.pdf
17. Zwaluw K van der, Haan A de, Pluister GN, Bootsma HJ, Neeling AJ de, Schouls LM. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram-Negative Rods. PLOS ONE. 23 mars 2015;10(3):e0123690.
18. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid Detection of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis. sept 2012;18(9):1503-7.
19. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid Detection of Carbapenemase-Producing *Pseudomonas* spp. Journal of Clinical Microbiology. 21 déc 2020;50(11):3773-6.
20. Nordmann P, Mammeri H. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. Future Microbiology. juin 2007;2(3):297-307.
21. Tian GB, Adams-Haduch JM, Taracila M, Bonomo RA, Wang HN, Doi Y. Extended-Spectrum AmpC Cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*: ADC-56 Confers Resistance to Cefepime. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1 oct 2011;55(10):4922-5.

Table 1. MICs (mg/L) of β -lactams for ADC-200 and ADC-256-positive *A. baumannii* clinical strains 19A2601 and 20A3025 and for *A. baumannii* CIP7010 Δ ADC with an empty pABEC plasmid and with pABEC plasmid carrying different *bla*_{ADC} genes.

Antibiotic	<i>A. baumannii</i>		<i>A. baumannii</i> CIP7010 Δ ADC					
	19A2601	20A3025	pABEC	pABEC	pABEC	pABEC	pABEC	pABEC
	(ADC-200)	(ADC-256)	ADC-50	ADC-30	ADC-200	ADC-256	ADC-50 S318T	
Ticarcillin	128	128	64	32	256	128	128	16
Piperacillin-tazobactam ^a	>256	128	128	128	128	128	128	32
Ceftazidime	>128	64	32	256	256	128	64	8
Cefepime	128	16	8	32	64	32	32	4
Imipenem	8	2	0.5	0.25	1	0.5	0.5	0.25
Meropenem	16	16	0.5	0.5	4	4	4	0.5
Cefiderocol	1	0.5	0.25	0.25	0.25	0.5	0.25	0.25

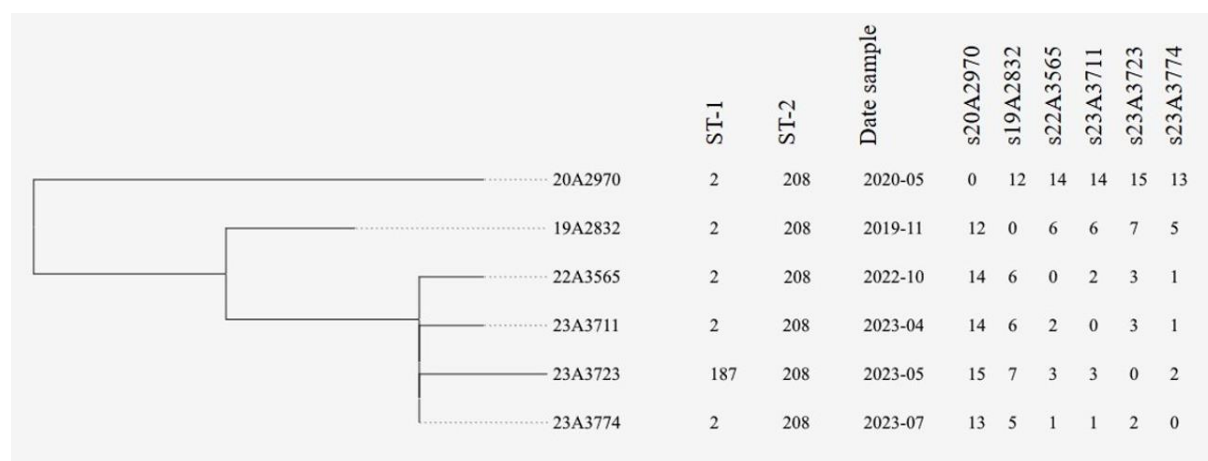
^a MIC values of piperacillin with a fixed concentration of tazobactam equal to 4 mg/L

Table 2. Kinetic parameters of ADC variants and the ADC-50 S318T mutant.

Substrate	<i>K_m</i> (mM)					<i>k_{cat}</i> (s ⁻¹)					<i>k_{cat}/K_m</i> (mM ⁻¹ ·s ⁻¹)				
	ADC-30	ADC-50	ADC-200	ADC-256	ADC-50 S318T	ADC-30	ADC-50	ADC-200	ADC-256	ADC-50 S318T	ADC-30	ADC-50	ADC-200	ADC-256	ADC-50 S318T
Penicilline G	17	6	20	17	24	3	25	11	10	11	196	3927	543	627	449
Cephalothin	187	297	233	189	210	99	1236	493	516	599	531	4167	2118	2735	2844
Ceftazidime	9	22	15	17	8	0.002	0.02	0.06	0.04	0.02	0.2	0.9	4	2	2
Cefepime	>1700	>1700	>1700	>1700	>1700	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Meropenem	NH	19	20	12	21	NH	0.01	0.04	0.03	0.05	NH	0.7	2	3	2
Imipenem	>1000	239	278	>1000	129	ND	0.02	0.03	ND	0.02	ND	0.1	0.09	ND	0.15

ND, not determined; NH, no detectable hydrolysis.

Figure 1. Phylogenetic analysis of the ADC-200-producing *A. baumannii* clinical strains. The tree was constructed using the Neighbour Joining algorithm. ST-1 corresponds to the ST obtained using the Pasteur scheme and ST-2 to the ST obtained using the Oxford scheme. The matrix compares the number of SNPs of difference between two clinical strains.



4.3. Supplementary data

Supplementary data.

Appendix 1. Supplementary methods.

Deletion of the *bla*_{ADC} gene

In order to observe the resistance phenotype conferred by each variant, the ADC defective mutant was constructed from a wild-type *A. baumannii* CIP70.10 strain. Gene inactivation was carried out using the suicide plasmid pMHL-2 (1) and homologous recombination events. Briefly, recombinant plasmids were constructed by cloning together the upstream and downstream region of the *bla*_{ADC} gene using the NEBuilder Hi-Fi DNA Assembly Cloning Kit (New England Biolabs, Evry, France), and the primers

“Upstream ADC _fwd” (tgaattcgcggccgctgcaaaaacaaaataaatatagtgcg), “Upstream ADC _rev” (tagggaaaaagattagctcataaattatttaaaaagaaag), “Downstream ADC _fwd” (tgagctaactttttccctaaaataaaaagagagaaatagtcacatc) and “Downstream ADC _rev” (tcccatatggtcgacctgcattgctcagccgcagcttag). Assembly products were directly used to transform competent *Escherichia coli* strain DH5 α . The recombinant plasmid was then transferred in *A. baumannii* CIP70.10 strain by natural transformation (2). Transformants were selected on MH plates containing 20 μ g/ml apramycin. Excision of remaining pMHL-2 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 10% (wt/vol) sucrose for 24 h, that were retaken and plated again on the same media for 72 h at room temperature. Negative selection on apramycin-containing MH plates allowed the identification of transformants that had lost the plasmid. Finally, the deletion was checked by PCR with primers “Upstream ADC _fwd” and “Downstream ADC _rev” confirmed with Sanger sequencing.

Protein purification

The recombinant plasmids pET41b::ADC-50, pET41b::ADC-50 S₃₁₈T, pET41b::ADC-30, pET41b::ADC-200 and pET41b::ADC-256 were obtained using the NEBuilder Hifi DNA assembly cloning kit and the primers Exp_ADC_pET41b_fwd (5' - aaggagatatacatatgGGAATACACCAAAAGACC - 3') and Exp_ADC_pET41b_rev (5' - ggtggtggtgctcgagTTTCTTTATTGCATTGAGC - 3') or Exp_ADC-256_pET41b_fwd (5' - aaggagatatacatatgGGAATACCCCAAAAGACC - 3') and Exp_ADC_pET41b_rev in the case of ADC-256. They were subsequently transformed into *E. coli* BL21

Rosetta-gami and an overnight culture was used to inoculate 2 L of brain heart infusion broth medium containing 30 mg/L kanamycin. Induction, crude protein extract preparation and His-tag purification were as adapted from the protocol previously described (2). Production of recombinant proteins harboring the His tag was induced overnight at 22°C with 0.2 mM IPTG. Then, the cultures were centrifuged at 5,000 g for 10 min and the pellets were resuspended with 10 ml of binding buffer (40 mM imidazole, 100 mM buffer phosphate pH 7.4 and 150 mM NaCl). Bacterial cells were lysed by 200 µL lysozyme 50 mg/ml for one hour, then sonicated. Two hundred microliters of DNase (10 mg/ml) was added and incubated O.N at 4°C. The pellet was removed by a centrifugation at 20,000 g for 1 h at 4°C; the supernatant was then centrifuged at 13,000 g for 1 h at 4°C. The soluble fractions were filtered with a 0.45 µm filter then passed through a HisTrap™ HP column (GE Healthcare) and proteins were eluted with the elution buffer (500 mM imidazole, 100 mM buffer phosphate, pH 7.4). Dialyze of the pure fractions was performed in buffer phosphate 0.05 mM, NaCl 150 mM, pH 7.40 O.N at 4°C. Finally, gel filtration was performed with 100 mM buffer phosphate pH 7.4 and 150 mM NaCl with a Superdex 75 column (GE Healthcare). The fractions were pooled according to purity by SDS–PAGE, dialyzed in 100 mM sodium phosphate pH 7, 50 µM ZnSO₄, and concentrated using Vivaspin columns. The concentration was determined by measuring the OD at 280 nm and with the extinction coefficients obtained from the ProtParamtool (Swiss Institute of Bioinformatics online resource portal).

1. Godeux AS, Lupo A, Haenni M, Guette-Marquet S, Wilharm G, Laaberki MH, et al. Fluorescence-Based Detection of Natural Transformation in Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology*. 2018;200(19):14.
2. Gaillot S, Oueslati S, Vuilleminot JB, Bour M, Iorga BI, Triponney P, et al. Genomic characterization of an NDM-9-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate and role of Glu152Lys substitution in the enhanced cefiderocol hydrolysis of NDM-9. *Front Microbiol*. 2023;14:1253160. doi: 10.3389/fmicb.2023.1253160.

Table S1. Features of patients harboring the ADC-200-producing *A. baumannii* strains.

Isolate	ST ^{Pas} / ST ^{Ox}	Gender	Region	Sampling date	Specimen source	Infection/ colonization
19A2601	ND	M	A	May 2019	Skin	Infection
19A2602	ND	F	A	May 2019	Skin	NA
19A2832	2/195	F	A	Nov 2019	Rectal swab	Colonization
20A2970	2/208	M	A	Jun 2020	Rectal swab	Colonization
22A3565	2/208	M	A	Nov 2022	Rectal swab	Colonization
23A3648	ND	M	A	Feb 2023	Skin	Infection
23A3670	ND	F	A	Feb 2023	Rectal swab	Colonization
23A3711	2/208	M	B	May 2023	Urine	Colonization
23A3723	187/208	M	A	May 2023	Bone	Infection
23A3774	2/208	M	C	Jul 2023	Rectal swab	Colonization
23A3810	ND	NA	A	Aug 2023	Skin	Infection
23A3838	ND	M	A	Sep 2023	Rectal swab	Colonization
23A3848	ND	M	A	Sep 2023	Rectal swab	Colonization

ND: Not determined; NA: data not available

4.4. Résultats complémentaires

Afin de vérifier l'impact d'une surproduction de variants ADC contribuant à l'hydrolyse des carbapénèmes en combinaison avec d'autres mécanismes de résistance, le plasmide portant le gène codant ADC-200 a été transformé chez des mutants surproduisant des pompes d'efflux. Ces mutants ont été décrits plus précisément dans les travaux de Yoon et collègues (Yoon et al., 2015). Les mutants dérivait de la souche de référence BM4587 ayant un phénotype sauvage de résistance aux antibiotiques, et surproduisaient AdeIJK (BM4666) ou AdeABC (BM4689). L'enzyme ADC-56 a été utilisée comme référence. Bien que l'expression des variants ADC-56 ou ADC-200 ait contribué à la hausse des CMI des β -lactamines, et plus particulièrement au céfépime et carbapénèmes respectivement, la surproduction d'un système d'efflux n'a pas mis en évidence d'effet additionnel ou synergique entre les mécanismes (Tableau 11). Toutefois, dans le fond génétique de la souche BM4587, l'expression d'ADC-200 entraînait une hausse significative de la CMI d'imipénème par rapport à la souche sans ADC-200.

Tableau 11 : CMI des antibiotiques vis-à-vis de souches de *A. baumannii* surproduisant les systèmes d'efflux AdeIJK (BM4666) ou AdeABC (BM4689), en absence ou présence des variants ADC-56 ou ADC-200.

<i>A. baumannii</i>	Antibiotique (μ g/ml)						
	CIP	TIC	CAZ	FEP	IPM	MEM	FDC
BM4587	0,25	4	≤ 2	1	0,125	0,25	$\leq 0,25$
BM4587 + ADC-56	0,125	32	128	64	0,25	0,25	0,5
BM4587 + ADC-200	0,25	128	128	16	1	2	$\leq 0,25$
BM4666 ($\nearrow$ AdeIJK)	0,5	32	2	4	0,125	2	0,5
BM4666 + ADC-56	0,5	64	128	64	0,25	1	0,5
BM4666 + ADC-200	0,5	128	64	16	1	2	$\leq 0,25$
BM4689 ($\nearrow$ AdeABC)	4	8	4	32	0,5	2	$\leq 0,25$
BM4689 + ADC-56	4	16	128	256	0,5	1	1
BM4689 + ADC-200	4	64	128	32	1	2	$\leq 0,25$

CIP : Ciprofloxacine ; TIC : Ticarcilline ; CAZ : Ceftazidime ; FEP : Céfépime ; IPM : Imipénème ; MEM : Méropénème ; FDC : Céfiderocol. Les valeurs en gras correspondent à une augmentation des CMI par rapport à la souche BM4587, et résultant donc de la surproduction des systèmes d'efflux.

II. Modification des PLPs et résistance au céfidérocol

Cette partie de l'étude visait à sélectionner des mutants résistants à la ceftazidime, au céfépime, ou au céfidérocol à partir de la souche de *A. baumannii* CIP70.10 qui est dépourvue de la séquence d'insertion IS*Aba*1 sur des milieux gélosés renfermant différentes concentrations d'antibiotiques. Des suspensions bactériennes de la souche *A. baumannii* CIP70.10 ont été calibrées puis ensemencées sur des géloses contenant de la ceftazidime, du céfépime, du céfidérocol ou de l'imipénème à différentes concentrations, variant de 4 à 32 fois la CMI de la souche de départ, comme décrit dans le paragraphe I.5. du matériel et méthode (I.5. *Obtention de mutants sur milieux gélosés avec antibiotiques*).

Trois expérimentations ont été réalisées en utilisant des concentrations de 4 à 16 fois la CMI de l'imipénème de la souche de départ CIP70.10, mais aucun mutant n'a été obtenu, même au bout de 48 h d'incubation.

En revanche, la sélection de mutants a été possible en utilisant les trois autres antibiotiques. La fréquence d'apparition des mutants a été calculée et sont présentées dans la **Figure 16**.

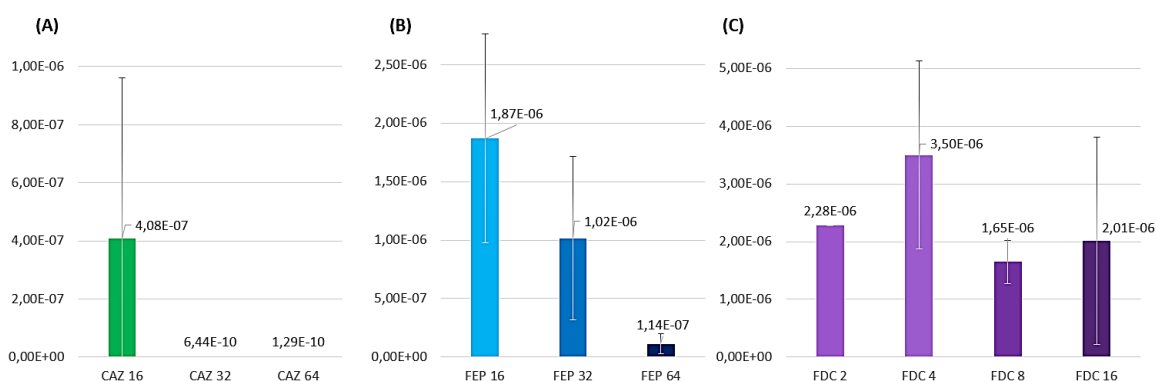


Figure 16 : Taux de mutants obtenus à partir de la souche *A. baumannii* CIP70.10 sur (A) ceftazidime, (B) céfépime et (C) céfidérocol après 24 h d'incubation. Les barres représentent les écart-types lorsqu'ils ont pu être déterminés. Une seule expérimentation a été réalisée pour la détermination du nombre de mutants obtenus sur céfidérocol 2 µg/ml. CAZ : ceftazidime ; FEP : céfépime ; FDC : céfidérocol. La concentration d'antibiotique utilisée est indiquée sur l'axe des abscisses.

Dans le cas de la ceftazidime, seuls deux essais ont été réalisés, le premier n'ayant pas permis d'obtenir de mutants sur des concentrations de 32 et 64 µg/ml. De manière attendue, la sélection de mutants était de plus en plus complexe lorsque la concentration en antibiotique augmentait (passant à un taux de mutant de 4.10^{-7} sur gélose avec 16 µg/ml de ceftazidime à un taux de $1,29.10^{-10}$ sur gélose avec 64 µg/ml de ceftazidime). Cette tendance était aussi observée dans le cas du céfépime ($1,87.10^{-6}$ versus $1,14.10^{-7}$ sur céfépime 16 µg/ml et 64 µg/ml respectivement), mais pas pour le céfidérocol.

Certains des mutants obtenus ont ensuite été sélectionnés en fonction de leur profil de résistance aux antibiotiques. Parmi les mutants qui présentaient une résistance au céfidérol stable, différents profils ont été sélectionnés pour un séquençage génomique complet des souches correspondantes. L'analyse des génomes n'a pas permis d'identifier de mutations dans tous les cas, en raison notamment d'une mauvaise qualité des *reads* pour certains mutants. Au final, quatorze mutants, présentant une résistance stable au céfidérol et dont la qualité de séquençage du génome était suffisante avec au moins une mutation, ont été retenus.

Cinq des mutants ont été sélectionnés sur ceftazidime, 4 sur céfépime et 5 sur céfidérol. La sensibilité de ces mutants à différents antibiotiques a été déterminée (**Tableau 12**). Les mutations identifiées dans le génome de ces mutants sont également présentées dans le **Tableau 12**.

Le mutant FDC8.119 présentait des CMI de tous les antibiotiques testés très proches de celles de la souche de départ CIP70.10 à l'exception du céfidérol, dont la CMI passait de 0,25 µg/ml à 8 µg/ml. De manière intéressante, ce mutant était muté dans le gène codant TonB3, impliqué dans l'apport d'énergie nécessaire au fonctionnement des récepteurs participant à l'import de fer (**Tableau 12**).

Le mutant FEP16.053 présentait quant à lui une hausse des CMI de la ceftazidime et du céfépime, ainsi que de céfidérol. L'analyse du génome de ce mutant a mis en évidence une mutation dans AdeR, un régulateur du système d'efflux AdeABC, connu pour avoir comme substrats la ceftazidime, le céfépime, et le méropénème, en plus des aminosides ([Yoon et al., 2015](#)).

Deux autres mutants (FDC16.107 et FDC4.112) présentaient des mutations dans ou en amont du gène *baeS*, codant la protéine du même nom faisant partie du système à deux composantes BaeS-BaeR qui sert notamment à la régulation des systèmes d'efflux comme MacAB/TolC, ou des gènes codant AdeA et AdeB chez *A. baumannii* ([Lin et al., 2014](#)).

Tableau 12 : Senibilité aux antibiotiques et mutations identifiées dans les mutants résistants au céfidérocol sélectionnés à partir de la souche CIP70.10 sur des milieux supplémentés en CAZ, FEP, ou FDC.

Souche	Antibiotique (mg/L)							Mutations identifiées chez les mutants résistants au FDC			
	TIC	TZP	CAZ	FEP	IMP	MEM	FDC	Cible	Mutation	Altération	Description
CIP70.10	32	16	8	4	≤0,5	≤0,5	0,25			Référence	
CAZ16.001 ⁴	512	>256	>64	>64	≤0,5	≤0,5	>16	tRNA-Asn-GTT Protéine hypothétique	C → A T → C	- M1T	ARNt PH
CAZ64.009	512	>256	>64	64	≤0,5	≤0,5	16	MorA	C → G	H451Q	Intervient dans le maintien des biofilms en condition limitée en nutriments
CAZ16.022	256	>256	>64	64	≤0,5	≤0,5	16	-	C → T	Q14*	Hydrolase Zn-dépendante
CAZ32.027	64	>256	64	64	≤0,5	≤0,5	8	PLP1b	C → A	R363S	Intervient dans la synthèse de la paroi
CAZ32.028	64	128	>64	32	≤0,5	≤0,5	8	MltG	ATCTTTA → ATCTTTTCTTA	Y220*	Intervient dans la synthèse de la paroi
								Protéine hypothétique	C → CAACTCC	197_198insTP	PH (T6SS ?)
FEP32.042	>512	>256	128	>128	≤0,5	≤0,5	>16	AbrP	G → A	W106*	Perméabilité de la membrane et croissance cellulaire
FEP16.051	256	>256	64	>128	≤0,5	1	>16	Aspartyl-tRNA synthetase	G → A	R153H	Synthèse des ARNt
FEP16.053	64	64	64	128	≤0,5	≤0,5	4	AdeR	T → G	I27M	Régulateur du système d'efflux AdeABC
FEP64.078	>512	>256	>128	128	≤0,5	1	>16	TktA	C → T	A32V	Intervient dans le métabolisme du glycérol
FDC2.079	128	256	128	32	≤0,5	0,5	8	RI	C → T	-	Intervient dans la synthèse de la paroi en amont <i>mrcB</i> (PLP1b) (Promoteur ?)
FDC4.098	128	>256	>64	64	≤0,5	1	8	RI	T → C	-	Intervient dans la synthèse de la paroi en amont <i>mrda</i> (PLP2) (Promoteur ?)
FDC16.107	256	>256	>128	>128	≤0,5	≤0,5	>16	PirA	AATTGA → AA	FS706	Transporteur du fer
FDC4.112	128	>256	>128	>128	≤0,5	≤0,5	16	RI	G → A	-	Entre BaeS et PH (non caractérisée)-
FDC8.119	64	>256	16	4	≤0,5	1	8	BaeS	G → A	R475C	Senseur du système à deux composantes BaeSR
								TonB3	InsA	FS82	Confère l'énergie nécessaire aux transporteurs du fer

TIC : Ticarcilline, TZP : Pipéracilline-Tazobactam, CAZ : Ceftazidime, FEP : Céfépime, IMP : Imipénème, MEM : Méropénème, FDC : Céfiderocol, PH : Protéine hypothétique, RI : Région intergénique.

⁴ **Nomenclature des noms des mutants** : sigle de 3 lettres de l'antibiotique de sélection, concentration de sélection et numéro de variant. CAZ : ceftazidime, FEP : céfépime, FDC : céfidérocol

Enfin, quatre mutants (CAZ32.027, CAZ32.028, FDC2.079, FDC4.098) présentaient des mutations dans des gènes (ou dans la région intergénique les précédant) impliqués dans la formation du peptidoglycane, et en particulier dans les gènes codant des PLPs pour 3 d'entre eux. Le mutant CAZ32.027 possédait une seule mutation dans le gène codant la PLP1b, aboutissant à la substitution R363S, le mutant FDC2.079 était muté en amont du gène codant la PLP1b et enfin, le mutant FDC4.098 possédait quant à lui 2 mutations : une se situait en amont du gène codant la PLP2 et l'autre dans le gène codant PirA, une protéine impliquée dans le transport du fer.

Comme deux mutants étaient mutés en amont des gènes codant les PLP1b ou PLP2, nous avons émis l'hypothèse que ces mutations pouvaient se trouver dans le promoteur des gènes et que leur expression pouvait être modifiée (**Figure 17**). En effet, après analyse des séquences en amont des gènes, des séquences assez proches de celles du motif $\sigma 70$ de *E. coli* (TTGACA – 17 nucléotides – TATAAT) ont été identifiées comme promoteur potentiel dans la souche FDC2.079 et la mutation était retrouvée dans ce que nous supposons être la boîte -10 du promoteur. Dans le cas du mutant FDC4.098, aucun promoteur putatif n'a pu être identifié, les séquences des boîtes -35 et -10 étant probablement moins proches de la séquence consensus du $\sigma 70$ de *E. coli*.

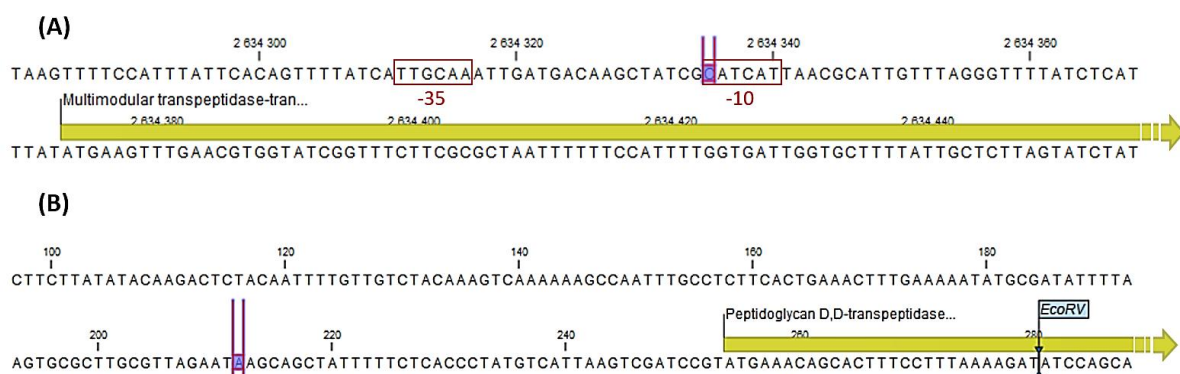


Figure 17 : Séquence en amont des gènes codant (A) la PLP1b du mutant FDC2.079 et (B) la PLP2 du mutant FDC4.098. Les positions des mutations retrouvées dans les mutants sont indiquées en violet. La séquence codante du début des gènes est indiquée par la flèche verte au-dessus de la séquence. Pour la PLP1b, un promoteur putatif a été suggéré (encadré en rouge pour les motifs -35 et -10), basé sur la séquence consensus du motif $\sigma 70$ (TTGACA – 17 nucléotides – TATAAT).

Pour confirmer cette hypothèse, une expérience de RTqPCR préliminaire a été réalisée sur le mutant FDC2.079, confirmant la surexpression de la PLP1b (résultat non présenté). Afin de continuer à explorer la piste de l'impact des PLPs sur la résistance au céfidérol, plusieurs constructions ont été réalisées. Le clonage des PLPs en aval de leur promoteur naturel ou du promoteur d'*ISAbal* (PrIS) a été réalisé. L'utilisation du promoteur fort d'*ISAbal* devrait permettre la surexpression des gènes codant les PLPs en aval et permettre ainsi de vérifier l'impact de cette dernière. Le clonage des PLP1b et PLP2 dont l'expression dépendait des promoteurs des souches FDC2.079 et FDC4.098 respectivement a aussi été réalisé (**Figure 17**). Enfin, pour vérifier l'impact de la substitution R363S

dans la PLP1b, identifiée dans le mutant CAZ32.027, la construction avec le gène codant ce variant a également été réalisée.

Bien que la PLP3 n'ait pas été retrouvée mutée dans les mutants obtenus précédemment, sa description comme cible du céfidérocol rendait son étude intéressante. Le gène correspondant a donc été cloné (i) en aval de son promoteur naturel (ii) en aval du promoteur d'ISAb_a1 (iii) et avec une substitution (A515V) qui est fréquemment retrouvée dans les souches cliniques.

Les clonages ont été réalisés dans la souche *A. baumannii* CIP70.10 dans laquelle les gènes codant les PLPs étaient présents. La délétion de ces gènes n'a pas été entreprise car bien que la PLP2 ne soit pas indispensable à la survie de *A. baumannii*, la PLP3 l'est et sa délétion est donc impossible. Nous avons donc souhaité conserver des conditions de clonages les plus proches possibles entre les constructions. Un schéma reprenant les différentes constructions est proposé en **Figure 18**.

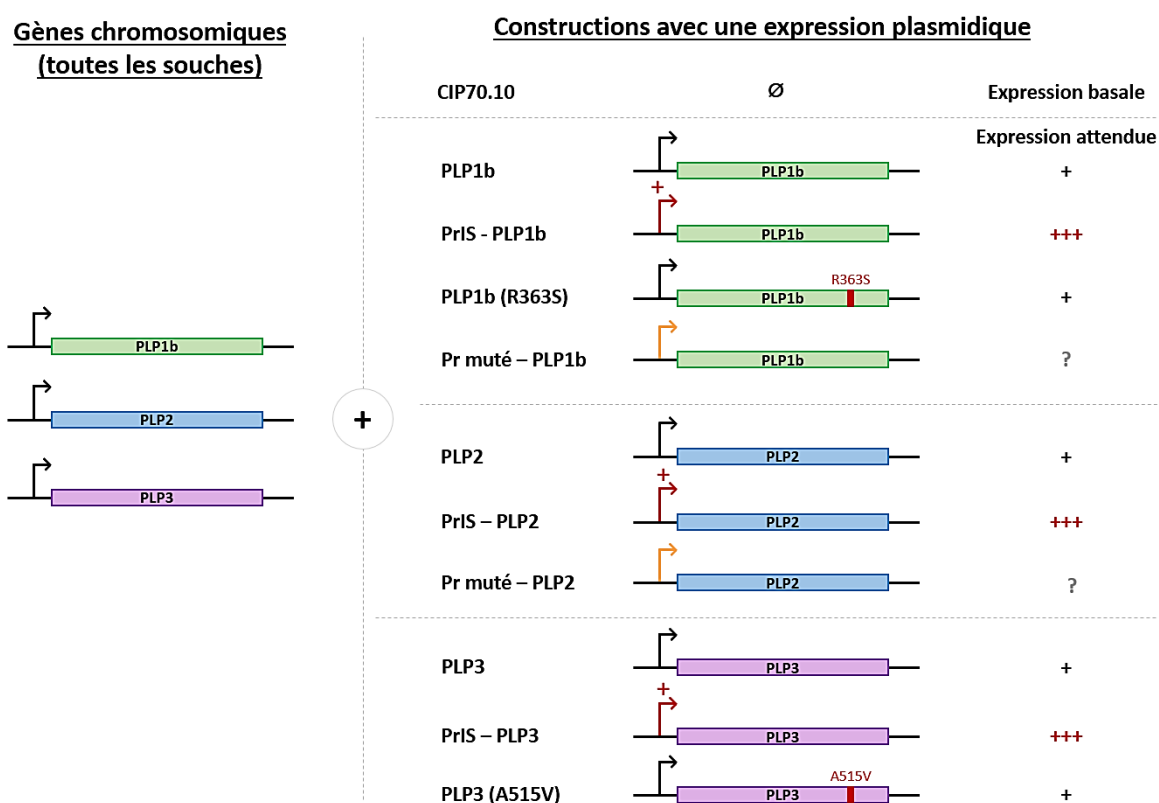


Figure 18 : Schéma reprenant les différentes constructions contenant des gènes codant les PLP1b, PLP2 et PLP3. Les flèches noires correspondent aux promoteurs naturels retrouvés dans la souche CIP70.10. Les flèches rouges correspondent au promoteur fort apporté par ISAb_a1. Les flèches orange correspondent aux promoteurs supposés mutés provenant des mutants FDC2.079 (Pr muté - PLP1b) et FDC4.098 (Pr muté - PLP2). Les mutations présentes dans les gènes sont indiquées par un carré rouge sur le gène avec la substitution en résultant, indiquée au-dessus. La substitution R363S dans la PLP1b a été observée dans le mutant CAZ32.027, et la substitution A515V dans la PLP3 est couramment retrouvée dans les souches cliniques. L'expression attendue correspond au niveau d'expression supposé, et non mesuré, par rapport à la souche de référence CIP70.10 pour les PLP respectives.

Il a déjà été décrit que l'altération ou la surproduction de PLP, et en particulier de la PLP3, pouvait être néfaste pour la bactérie et impacter notamment sa croissance (K. Kang & Boll, 2022). Pour vérifier si cela pouvait être le cas dans les différentes constructions évoquées précédemment, des courbes de croissance ont été réalisées afin de voir si le fitness des souches était affecté (Figure 19).

Dans le cas de la PLP2, la souche *A. baumannii* CIP70.10 et celle dans laquelle le gène codant la PLP2 avec son promoteur naturel a été cloné présentaient des courbes de croissance comparables. En revanche, la croissance des souches possédant le gène codant la PLP2 et dont l'expression dépendait soit du promoteur fort d'*ISAb*1 soit du promoteur muté retrouvé dans le mutant FDC4.098, semblait affectée (Figure 19 B). Dans le cas des constructions avec la PLP1b, toutes les souches avaient une croissance ralentie en comparaison à la CIP70.10, à l'exception de la construction possédant la PLP1b mutée (R363S) retrouvée dans le mutant CAZ32.027, qui présentait une croissance similaire à celle de la CIP70.10 (Figure 19 A). Dans le cas de la PLP3, toutes les constructions ralentissaient la croissance des souches, avec un impact encore plus marqué pour la PLP3 sous expression de son promoteur naturel (Figure 19 C).

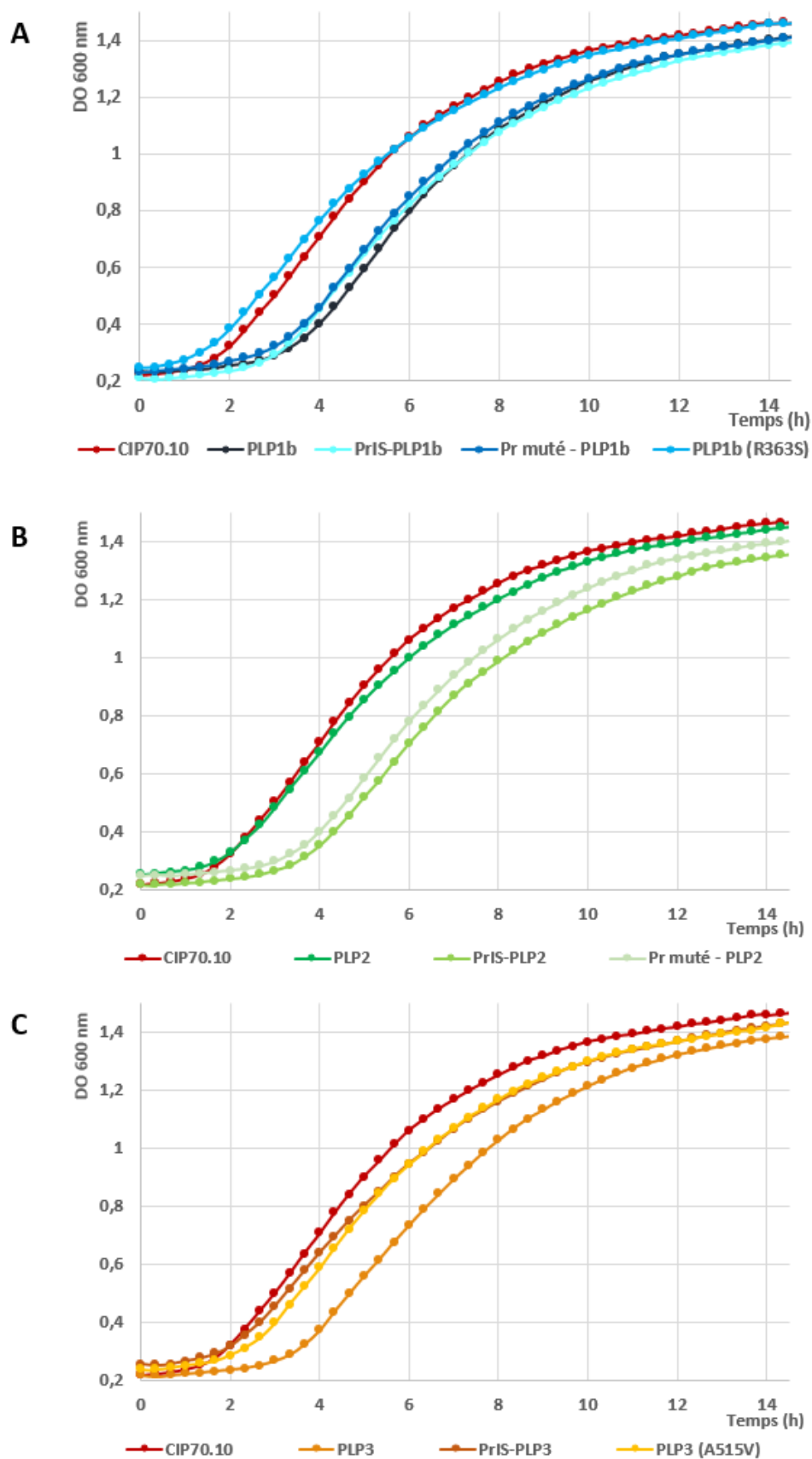


Figure 19 : Courbe de croissance des souches possédant les gènes codant la PLP1b (A), PLP2 (B), ou PLP3 (C), dont l'expression dépendait de différents promoteurs. La souche CIP70.10 (rouge) est utilisée comme référence car elle a été utilisée comme souche réceptrice.

Pour vérifier également l'impact des variations d'expression et/ou des mutations dans les PLPs sur le phénotype de résistance aux β -lactamines, les CMI de différents antibiotiques ont été déterminées (**Tableau 13**). La surproduction de la PLP1 médiée par ISAb_a1 entraîne une augmentation des CMI de l'association pipéracilline-tazobactam, de la ceftazidime, du céfépime et surtout du céfidérocol (avec un ratio de 32 par rapport à la souche sauvage). L'apport d'une PLP1b mutée (R363S) conduit également à une augmentation importante des CMI de ces mêmes antibiotiques. Bien que moins importante que pour la PLP1b, l'augmentation des CMI du céfidérocol liée à l'apport de la PLP2 est significative (ratio x 8) lorsque l'expression du gène correspondant est sous la dépendance du promoteur d'ISAb_a1. L'apport d'une PLP3 n'a pas entraîné de changement de CMI, à l'exception de la PLP3 mutée (A515V) qui a entraîné une hausse de la CMI du méropénème d'au moins 4 fois.

Tableau 13 : CMI de différentes β -lactamines vis-à-vis des souches possédant les gènes codant la PLP1b, PLP2, ou PLP3, dont l'expression dépendait de différents promoteurs.

	TIC	PTZ ^a	CAZ	FEP	IPM	MEM	FDC
CIP70.10	32	16	8	8	≤0,5	≤ 0,5	0,125
PLP1b	32	32	8	8	≤ 0,5	≤ 0,5	0,125
PrIS - PLP1b	32	64	32	32	≤ 0,5	≤ 0,5	8
PLP1b (R363S)	64	256	32	64	≤ 0,5	1	8
Pr muté - PLP1b	32	8	8	4	≤0,5	≤ 0,5	0,125
PLP2	32	16	4	4	≤ 0,5	≤ 0,5	0,125
PrIS-PLP2	64	64	32	16	≤ 0,5	1	1
Pr muté - PLP2	32	16	8	8	≤0,5	1	0,125
PLP3	32	32	8	8	≤ 0,5	≤ 0,5	0,125
PrIS-PLP3	32	16	8	4	≤ 0,5	≤ 0,5	0,125
PLP3 (A515V)	32	8	4	4	≤0,5	2	0,06

TIC : Ticarcilline, PTZ : Pipéracilline-tazobactam, CAZ : Ceftazidime, FEP : Céfépime, IPM : Imipénème, MEM : Méropénème, FDC : Céfidérocol.

^a Concentration fixe de tazobactam : 4 μ g/mL

Suite à l'obtention des résultats de CMI, il semble en effet que différents niveaux d'expression des PLP puissent avoir un impact sur la résistance au céfidérocol. Cependant, une variation significative des CMI de cet antibiotique n'est observée que dans les constructions où les gènes codant les PLP1b ou PLP2 étaient sous l'expression du promoteur fort d'ISAb_a1. Des régulations compensatoires pourraient avoir lieu, et la surproduction d'une PLP pourrait entraîner une diminution d'expression d'une autre PLP. Pour mieux comprendre quels pourraient être les mécanismes responsables de la hausse de CMI observée, notamment de céfidérocol, des expériences préliminaires de RTqPCR ont été réalisées **Figure 20** (les données brutes sont indiquées en **Annexe 3**).

Bien que des manipulations supplémentaires soient indispensables pour permettre une interprétation solide des résultats, ces premières données permettent de constater plusieurs éléments : tout d'abord, le mutant FDC2.079, muté en amont de la PLP1b, semble bien surexprimer celle-ci. En revanche, le mutant FDC4.098 ne semble pas surexprimer la PLP2 (**Figure 20**). Les constructions avec les PLP1b et

PLP2 sous expression du promoteur naturel permettent aussi la surexpression des gènes codant ces protéines. Sous la dépendance du promoteur fort d'*ISAb1*, il semblerait là encore que l'expression des gènes codant chaque PLP respective augmente. Les constructions avec les PLP1b et PLP2 sous promoteurs des mutants FDC2.079 (Pr muté - PLP1b) ou FDC4.098 (Pr muté - PLP2) respectivement semblent également conduire à une surexpression des gènes codant les PLPs, et de manière plus importante que dans les constructions avec les PLP sous leur promoteur naturel.

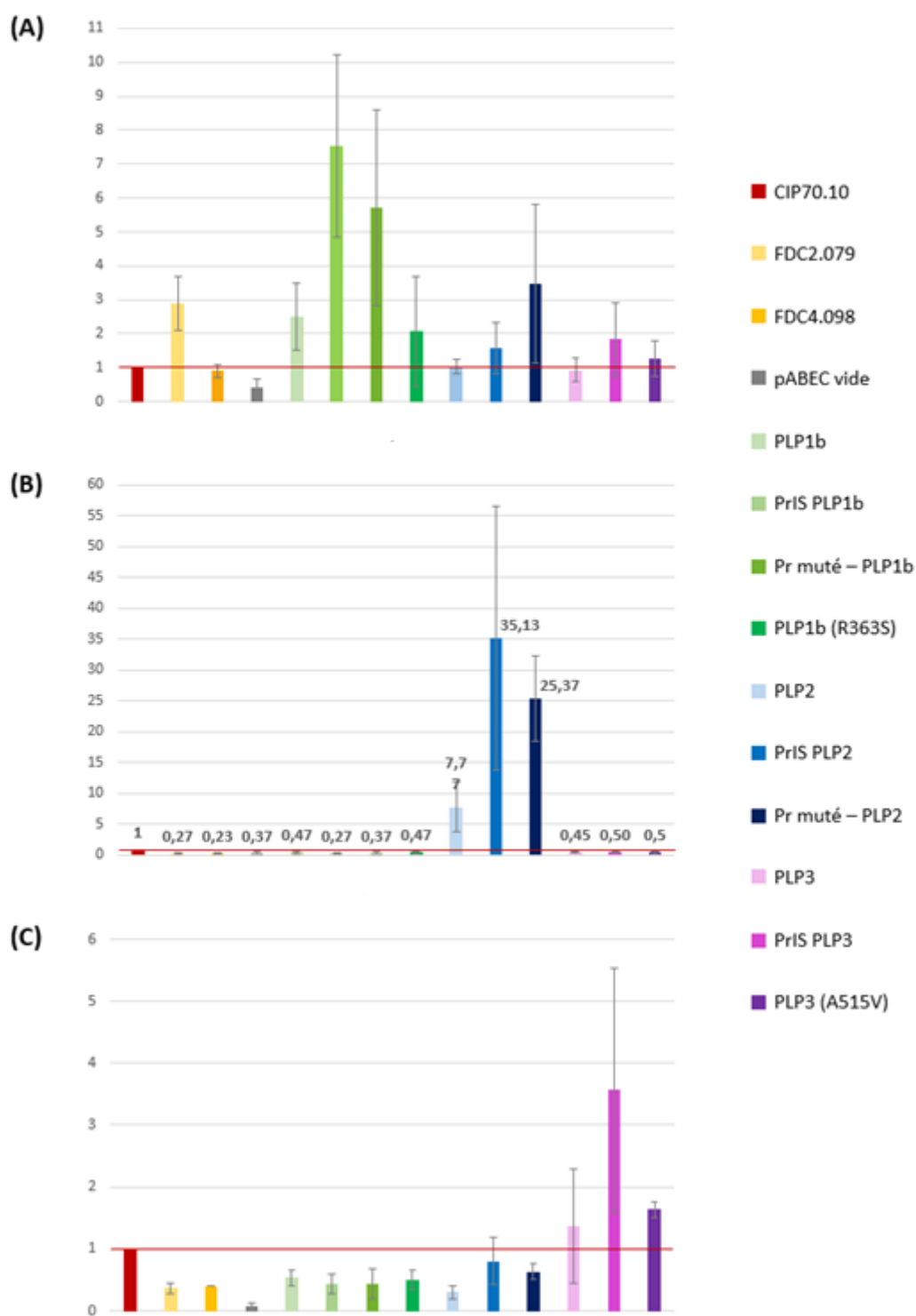


Figure 20 : Niveaux d'expression relatifs des gènes codants (A) la PLP1b, (B) la PLP2 et (C) la PLP3 des différentes constructions de PLPs et des mutants par rapport à la souche de référence CIP70.10. L'erreur standard moyenne est représentée par les barres.

III. Rôle des enzymes de type NDM dans la résistance au céfidérocol

1. Contexte et résumé

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'impact des enzymes de types NDM dans la résistance au céfidérocol. Elles sont surtout étudiées pour conférer une résistance aux carbapénèmes, molécules de derniers recours. L'intérêt porté à ces enzymes provient de l'observation systématique de CMI du céfidérocol toujours plus élevées pour les souches productrices de NDM que pour les autres souches reçues au CNR-RA. Aujourd'hui, sur les 198 souches de *A. baumannii* pour lesquelles la CMI du céfidérocol a été déterminée, 100 étaient sensibles ($CMI \leq 2 \mu\text{g/ml}$), soit 51,28 % des souches. Sur ces 198 souches, 53 produisaient une enzyme de type NDM, et seulement 15,1 % d'entre elles étaient sensibles au céfidérocol ($n = 8/53$). Les souches productrices d'une enzyme de type PER étaient quant à elles toutes résistantes à haut niveau, mais seulement 7 d'entre elles ont été testées. Quant aux souches produisant une enzyme de type oxacillinase mais pas NDM ni PER, elles restaient majoritairement sensibles (65,77 % ; $n = 73/111$). Pour ces dernières, le taux de sensibilité des souches non NDM peut sembler faible, mais le pourcentage des souches ayant perdu leur sensibilité au céfidérocol est probablement surestimé en raison d'un biais de sélection des souches. En effet un antibiogramme est réalisé sur l'ensemble des souches reçues au CNR, en revanche une CMI n'est déterminée généralement que pour les souches qui présentent un diamètre d'inhibition réduit autour du disque de céfidérocol ($< 22 \text{ mm}$).

Face au faible taux de sensibilité au céfidérocol des souches de *A. baumannii* productrices de NDM et leur prévalence importante parmi les souches productrices de carbapénémase (21,6 % concernant les souches reçues au CNR-RA en 2022), nous nous sommes donc intéressés à l'impact de ces enzymes sur la résistance au céfidérocol.

Toutes les souches de *A. baumannii* productrices d'une enzyme de type NDM dans la collection disponible au CNR produisaient le variant NDM-1, à l'exception d'une seule (13A297), qui produisait l'enzyme NDM-9. A notre connaissance, l'enzyme NDM-9 a été décrite uniquement chez des entérobactéries, et sa caractérisation chez *A. baumannii* a donc été entreprise. La souche 13A297 était résistante à toutes les β -lactamines, dont le céfidérocol ($CMI > 32 \mu\text{g/ml}$), aux aminoglycosides et aux fluoroquinolones mais conservait une sensibilité à la colistine et aux tétracyclines. Le séquençage complet du génome de la souche a mis en évidence la présence des gènes *bla*_{OXA-64} et *bla*_{ADC-26} codant les β -lactamases naturelles, en plus du gène *bla*_{NDM-9}. Le gène codant NDM-9 se situait sur un plasmide de 166 154 pb, et plus précisément au sein d'un transposon composite Tn125. Ce dernier est

couramment retrouvé, au moins partiellement, dans les souches de *A. baumannii* produisant une carbapénémase de type NDM.

Le clonage des gènes *bla*_{NDM-1} et *bla*_{NDM-9} a ensuite été réalisé afin de mieux comprendre l'impact des enzymes codées par ces gènes sur la résistance au céfidérol et également de comparer les variants NDM-1 et NDM-9 entre eux. En effet la souche produisant NDM-9 présentait un très haut niveau de résistance (CMI > 32 µg/ml) alors que les souches productrices de NDM-1 ont des niveaux de résistance plus modérés avec une CMI₅₀ de 8 µg/ml (données du CNR sur 51 souches NDM-1).

Les souches productrices de ces deux variants NDM ont été ensemencées sur géloses et des disques de céfidérol imprégnés d'EDTA, un inhibiteur des enzymes de type NDM, y ont été déposés. Cela a permis d'observer une augmentation du diamètre d'inhibition autour du disque de céfidérol avec EDTA en comparaison des disques sans EDTA, qui restait faible dans le cas de NDM-1 mais beaucoup plus marquée pour NDM-9. Ces résultats démontraient que l'inhibition de NDM augmentait la sensibilité au céfidérol et ainsi que l'enzyme contribuait à la perte de sensibilité à cet antibiotique (**Figure 21**, données non publiées).

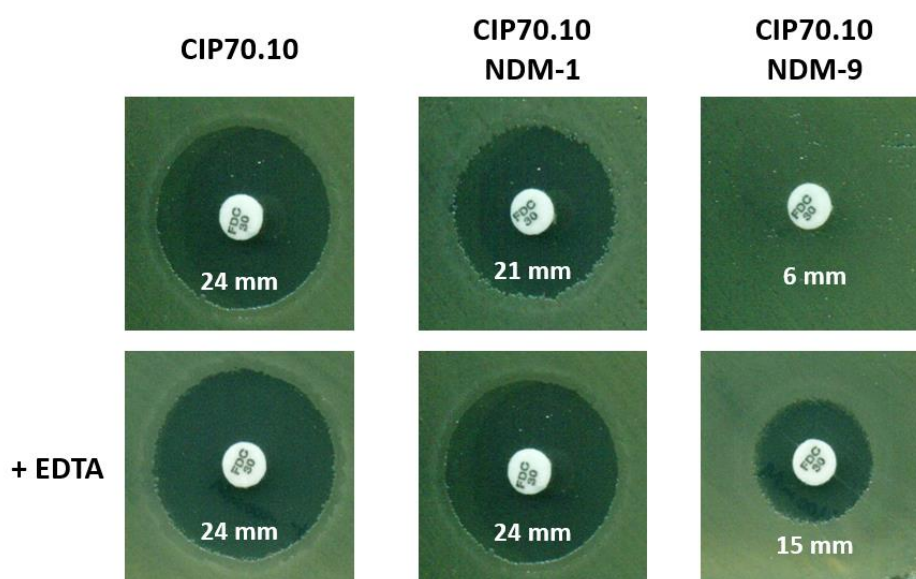


Figure 21 : Diamètre d'inhibition autour des disques de céfidérol de la souche CIP70.10 WT, productrice de NDM-1 ou NDM-9 et comparaison en présence d'EDTA. Les diamètres des zones d'inhibition sont indiqués en millimètres sous les disques de céfidérol.

La sensibilité au céfidérol a également été déterminée et la production d'une enzyme de type NDM était associée à des CMI du céfidérol plus élevées, avec une augmentation des CMI de plus de 64 et 256 fois chez *E. coli* pour NDM-1 et NDM-9 respectivement, et d'un facteur 16 et de plus de 128 fois lorsque ces mêmes enzymes étaient produites par *A. baumannii*, par rapport à une souche sauvage.

Ces résultats ont également mis en évidence que NDM-9 conférait une résistance au céfidérocol plus importante que NDM-1.

Cette différence peut s'expliquer par la présence de la substitution E152K, qui est la seule différenciant NDM-9 de NDM-1, et qui pourrait impacter les propriétés de l'enzyme. Afin de confirmer cette hypothèse, les paramètres enzymatiques des deux variants vis-à-vis de la ceftazidime et du céfidérocol ont été déterminés et montraient que cette substitution conférait au variant NDM-9 une affinité trois fois plus importante pour le céfidérocol, conduisant à une activité enzymatique deux fois plus importante. La prédiction par docking moléculaire a permis de mettre en évidence que la meilleure affinité observée pour NDM-9 résultait d'une interaction entre la lysine 152, l'asparagine 223 et le groupe R1 du céfidérocol. Dans le cas de NDM-1, l'acide glutamique situé en position 152 créait une interaction répulsive.

Ce travail confirme la participation des enzymes de types NDM dans la diminution de sensibilité au céfidérocol. De plus, le niveau de résistance varie selon le variant impliqué et les substitutions retrouvées. La substitution E152K n'a été observée que dans le variant NDM-9 jusqu'à présent, mais soulève la question de l'importance des substitutions identifiées dans les autres variants NDM. L'impact de ces enzymes dans la diminution de sensibilité au céfidérocol risque d'être problématique, car le céfidérocol, qui devait être une nouvelle option de traitement en particulier pour les souches résistantes aux carbapénèmes peut être inefficace. De plus, ces enzymes sont de plus en plus courantes parmi les souches productrices de carbapénémases. Au niveau mondial, leur prévalence est passée de 14 % à 51 % entre les périodes 2011-2015 et 2016-2020.

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Saoussen Oueslati, Rémy Bonnin, Thierry Naas et Bogdan Iorga, associés aux équipes INSERM ReSIST et CNRS Institut de Chimie des Substances Naturelles de l'université de Paris Saclay. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication, présentée dans le paragraphe suivant.

2. Article

Titre : Genomic characterization of an NDM-9-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate and role of Glu152Lys substitution in the enhanced cefiderocol hydrolysis of NDM-9

Publié dans la revue : Frontiers in Microbiology, Volume 14, 2023

Indices de la revue : Impact factor : 5,2 ; Quartile : Q1 (2023)



OPEN ACCESS

EDITED BY

Benjamin Andrew Evans,
University of East Anglia, United Kingdom

REVIEWED BY

Abid Ali,
Texas A&M University, United States
Mariagrazia Perilli,
University of L'Aquila, Italy

*CORRESPONDENCE

Anaïs Potron
✉ anaïs.potron@univ-fcomte.fr

RECEIVED 04 July 2023

ACCEPTED 08 August 2023

PUBLISHED 28 August 2023

CITATION

Gaillot S, Oueslati S, Vuilleminot J-B, Bour M, Iorga BI, Triponney P, Plésiat P, Bonnin RA, Naas T, Jeannot K and Potron A (2023) Genomic characterization of an NDM-9-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate and role of Glu152Lys substitution in the enhanced cefiderocol hydrolysis of NDM-9. *Front. Microbiol.* 14:1253160. doi: 10.3389/fmicb.2023.1253160

COPYRIGHT

© 2023 Gaillot, Oueslati, Vuilleminot, Bour, Iorga, Triponney, Plésiat, Bonnin, Naas, Jeannot and Potron. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). 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.

Genomic characterization of an NDM-9-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate and role of Glu152Lys substitution in the enhanced cefiderocol hydrolysis of NDM-9

Susie Gaillot¹, Saoussen Oueslati², Jean-Baptiste Vuilleminot^{1,3}, Maxime Bour³, Bogdan I. Iorga⁴, Pauline Triponney³, Patrick Plésiat^{1,3}, Rémy A. Bonnin^{2,5}, Thierry Naas^{2,5}, Katy Jeannot^{1,3} and Anaïs Potron^{1,3*}

¹Université de Franche-Comté, UMR CNRS 6249 Chrono-Environnement, Besançon, France,

²Université Paris-Saclay, Equipe INSERM ReSIST, Faculté de Médecine, Le Kremlin-Bicêtre, France,

³Laboratoire Associé du Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques, Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, Besançon, France, ⁴Université Paris-Saclay, CNRS Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette, France, ⁵Laboratoire Associé du Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques: Entérobactéries Résistantes aux Carbapénèmes, Le Kremlin-Bicêtre, France

Here, we characterized the first French NDM-9-producing *Acinetobacter baumannii* isolate. *A. baumannii* 13A297, which belonged to the ST^{Pas}25 (international clone IC7), was highly resistant to β -lactams including cefiderocol (MIC >32mg/L). Whole genome sequencing (WGS) using both Illumina and Oxford Nanopore technologies revealed a 166-kb non-conjugative plasmid harboring a *bla*_{NDM-9} gene embedded in a Tn125 composite transposon. Complementation of *E. coli* DH5 α and *A. baumannii* CIP70.10 strains with the pABEC plasmid carrying the *bla*_{NDM-1} or *bla*_{NDM-9} gene, respectively, resulted in a significant increase in cefiderocol MIC values (16 to >256-fold), particularly in the NDM-9 transformants. Interestingly, steady-state kinetic parameters, measured using purified NDM-1 and NDM-9 (Glu152Lys) enzymes, revealed that the affinity for cefiderocol was 3-fold higher for NDM-9 (K_m =53 μ M) than for NDM-1 (K_m =161 μ M), leading to a 2-fold increase in catalytic efficiency for NDM-9 (0.13 and 0.069 μ M⁻¹. s⁻¹, for NDM-9 and NDM-1, respectively). Finally, we showed by molecular docking experiments that the residue 152 of NDM-like enzymes plays a key role in cefiderocol binding and resistance, by allowing a strong ionic interaction between the Lys152 residue of NDM-9 with both the Asp223 residue of NDM-9 and the carboxylate group of the R1 substituent of cefiderocol.

KEYWORDS

Acinetobacter baumannii, cefiderocol, carbapenemases, NDM, resistance

1. Introduction

Acinetobacter baumannii is definitely one of the most successful pathogens responsible for healthcare-associated infections. Its propensity to acquire and accumulate antibiotic resistance genes has led to its classification by the WHO as one of the 12 top priority resistant bacteria

(Tacconelli et al., 2018). Carbapenem resistance in *A. baumannii* (CRAB) is a serious threat to public health, and prevalence of CRAB, which varies widely between countries, has been increasing worldwide [Antimicrobial Resistance in the EU/EEA (EARS-Net), 2022]. Resistance of *A. baumannii* strains to carbapenems most commonly results from the acquisition of carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases (CHDL), belonging to the OXA-23-like, OXA-24/40-like, OXA-58-like, OXA-143-like and OXA-235-like groups (Rodríguez et al., 2018; Ramirez et al., 2020). However, the incidence of NDM-like class B (MBL) β -lactamases has steadily grown recently (Ramirez et al., 2020). Of the 55 NDM variants listed in the Beta-Lactamase DataBase (Naas et al., 2017), NDM-1 is the most frequently NDM-type carbapenemase identified in CRAB but strains producing other variants, such as NDM-2, NDM-5, NDM-6 or more recently NDM-42, have been sporadically reported (Kaase et al., 2011; Khalid et al., 2020; Xanthopoulou et al., 2020; Quiñones Pérez et al., 2022). While the *bla*_{NDM-9} variant was very rarely detected in *A. baumannii* (Poirel et al., 2021; Le Terrier et al., 2023), NDM-9 has been reported more frequently in *Enterobacteriales* (*K. pneumoniae* and *E. coli*), especially in East Asia (South Korea, Taiwan, China and French Polynesia) and sporadically in Europe (Switzerland, Italy) (Wang et al., 2014; Di et al., 2017; Nüesch-Inderbinen et al., 2018; Lin et al., 2019; Falcone et al., 2020; Oueslati et al., 2021). More recently, it has been shown that the production of the NDM-9 enzyme in *Enterobacteriales* and in an *A. baumannii* strain impairs the activity of new combinations of β -lactam- β -lactamase inhibitors (ceftazidime/avibactam, imipenem/relebactam, and meropenem/vaborbactam), including one under development (cefepime/taniborbactam) (Le Terrier et al., 2023). The most worrying threat of NDM-like producing *A. baumannii* is the inconsistent efficacy of cefiderocol, a recently commercialized molecule that is considered a last-resort antibiotic in the fight against CRAB. Even though some NDM-producing *A. baumannii* strains are fully susceptible to cefiderocol (Yamano, 2019; Mushtaq et al., 2020), cefiderocol MICs tend to be higher for NDM-producing organisms as compared to strains expressing other carbapenemases (Yamano, 2019; Mushtaq et al., 2020; Poirel et al., 2021). Undoubtedly, additional factors likely contribute to the high cefiderocol resistance of some bacteria (Yamano, 2019; Kohira et al., 2020; Simner and Patel, 2020), and in *A. baumannii*, downregulation or absence of specific siderophore receptors (PirA and PiuA) and alterations of PBP3 have been suggested (Malik et al., 2020). In this study, we report the genetic environment of the *bla*_{NDM-9} gene identified in a clinical strain of *A. baumannii*, and the comparison of steady-state kinetic parameters between the NDM-9 and NDM-1 purified enzymes for cefiderocol.

2. Materials and methods

2.1. Strains used in the study

Acinetobacter baumannii clinical strain 13A297 was isolated in 2013 from a urine sample collected from a patient hospitalized in France. Species identification was performed by MALDI-TOF mass spectrometry and confirmed by whole genome sequencing. Clinical *A. baumannii* strains 19A2597 and 13A297, producing the NDM-1 and NDM-9 β -lactamase, respectively, were selected for cloning of the respective genes into the pABEC vector and then transferred into *E. coli* DH5 α and *A. baumannii* CIP70.10 (Vuilleminot et al., 2022).

Mating out assays were carried out using the rifampicin-resistant BM4547 strain derived from CIP70.10 as the recipient strain (Potron et al., 2014). The transconjugants were selected on Mueller-Hinton agar plates supplemented with ticarcillin (100 mg/L) and rifampicin (100 mg/L). *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen, Fontenay-sous-Bois, France) was used for overproduction of NDM-1 and NDM-9 enzymes.

2.2. Susceptibility testing

MICs of β -lactams (ticarcillin, piperacillin-tazobactam, ceftazidime, cefepime, imipenem, meropenem), ciprofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, amikacin, tigecycline, minocycline and colistin were determined by the broth microdilution method in cation-adjusted Mueller-Hinton broth (MHB), by using customized microplates (ThermoFisher, Illkirch-Graffenstaden, France). Cefiderocol MICs were determined using an Iron-Depleted and Cation-Adjusted Mueller-Hinton Broth (ID-CAMHB) and a titrated powder of cefiderocol (MedChem Express) according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (2020). MIC values were interpreted according to the current EUCAST or CLSI (for minocycline and tigecycline) clinical breakpoints, except for cefiderocol, for which the EUCAST pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) breakpoint ($S \leq 2$; $R > 2$ mg/L) was applied [Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020; The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 2021].

2.3. Genomic data

Total DNA of strains 13A297 and 19A2597 was purified (NucleoSpin Microbial DNA, Macherey-Nagel, Germany), and then quantified spectrophotometrically (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, France). Preparation of DNA libraries and whole-genome sequencing experiments were outsourced to services using Illumina platforms generating paired-end reads (P2M platform, Institut Pasteur, Paris, France). In addition, long-reads sequencing using the Oxford Nanopore technology was performed for the strain 13A297 (MinION, R9.4.1 flow cell). Short and long reads were assembled as hybrid using SPAdes v.3.15.5 and Trycycler v.0.5.0. Quality control of reads, assembly, and genome annotation were carried out using FastQC v.0.11.9, QUAST v.5.0.2, and RASTtk on the PATRIC 3.6.9 platform. Antimicrobial resistance genes (AMR) were identified by the National Reference Center for Antimicrobial Resistance (NRC-AR) pipelines and databases. The sequence type (ST) of isolates was determined according to the MLST schemes available at PubMLST.¹

2.4. Molecular experiments

From genomic DNA extracted using the QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), the *bla*_{NDM-1} and *bla*_{NDM-9} genes were amplified with the specific primers NDM_fwd (5'-CAAGC

¹ <https://pubmlst.org>

TTGGTACCGAGCTCGTGGCTTTTGAAACTGTTCGC-3') and NDM_rev (5'-ACTGGCGGCCGTTACTAGTGTGCGAGGTCAGGATAGGGG-3') and subsequently cloned into the shuttle vector pABEC using the NEBuilder Hifi assembly kit according to the manufacturer's recommendations (New England Biolabs, Evry, France) (Vuilleminot et al., 2022).

For the production of NDM-1 and NDM-9 proteins, the complete coding sequences of the β -lactamase genes were amplified by PCR using the specific primers NdeI-NDM₂₉₋₂₇₀ (5'-AAAAACATATGGGTGAAATCCGCCCGACG-3') and NDM-XhoI_{delta STOP} (5'-AAACTCGAGGCGCAGCTTGTCCGCCAT-3'). The amplicons and the plasmid pET41b were digested with the restriction enzymes NdeI and XhoI before ligation. The recombinant plasmids pET41b-NDM-1 and pET41b-NDM-9 were transferred by transformation into *E. coli* BL21 (DE3).

2.5. Protein purification

Two liters of brain heart infusion broth medium containing 30 mg/L kanamycin were inoculated with 2 mL overnight cultures of *E. coli* strains BL21 (DE3) pET41b-NDM-1 and of *E. coli* BL21 (DE3) pET41b-NDM-9. Production of recombinant proteins harboring the His tag was induced overnight at 22°C with 0.2 mM IPTG. Then, the cultures were centrifuged at 6,000 g for 15 min and the pellets were resuspended with the binding buffer (10 mM imidazole, 25 mM sodium phosphate pH 7.4 and 300 mM NaCl). Bacterial cells were lysed by sonication and the pellet was removed by two consecutive centrifugation steps at 10,000 g for 1 h at 4°C; the supernatant was then centrifuged at 96,000 g for 1 h at 4°C. The soluble fractions were filtered, passed through a HisTrap™ HP column (GE Healthcare) and proteins were eluted with the elution buffer (500 mM imidazole, 25 mM sodium phosphate pH 7.4 and 300 mM NaCl). Finally, gel filtration was performed with 50 mM sodium phosphate buffer pH 7 and 150 mM NaCl with a Superdex 75 column (GE Healthcare). The fractions were pooled according to purity by SDS-PAGE, dialyzed in 100 mM sodium phosphate pH 7, 50 μ M ZnSO₄, and concentrated using Vivaspinn columns. The concentration was determined by measuring the OD at 280 nm and with the extinction coefficients obtained from the ProtParamtool (Swiss Institute of Bioinformatics online resource portal).

2.6. Steady-state kinetic determinations

Kinetic parameters were determined using purified NDM-1 and NDM-9 β -lactamases in 20 mM Hepes pH 7.5 supplemented with 50 μ M ZnSO₄. The k_{cat} and K_m values were determined by analyzing β -lactam hydrolysis under initial-rate conditions with an ULTROSPEC 2000 UV spectrophotometer with the SWIFT II software (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France) and the Eadie-Hofstee linearization of the Michaelis-Menten equation.

2.7. Molecular modeling

Three-dimensional structure of NDM-9 was generated by *in silico* mutagenesis from the structure of NDM-1 (PDB code 4RL0) (Feng et al., 2014) using UCSF Chimera (version 1.14) (Pettersen et al.,

2004). Molecular docking of cefiderocol (open form) into the active sites of both NDM-1 and NDM-9 was performed using CCDC Gold (part of CSD 2021 software) (Verdonk et al., 2003) with the GoldScore scoring function and the binding site defined as a sphere with 20 Å radius around Zn301.

2.8. Nucleotide sequence accession number

The whole genome sequences generated in the study have been submitted to the Genbank nucleotide sequence database under the accession number PRJNA989410.

3. Results and discussion

3.1. Phenotypic and genomic characterization of *Acinetobacter baumannii* 13A297 clinical isolate

Acinetobacter baumannii 13A297 strain was resistant to all β -lactams, including cefiderocol (MIC >32 mg/L), aminoglycosides, fluoroquinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole and remained susceptible to colistin and tetracyclines (Table 1). WGS sequencing of *A. baumannii* 13A297 revealed a genome of 4,229,816 bp with a mean coverage of 280 X. Analysis of WGS data revealed that this isolate possessed the naturally-occurring *bla*_{OXA-64} and *bla*_{ADC-26} genes. Its resistance profile to β -lactams was the result of acquisition of the carbapenemase NDM-9, that differs from NDM-1 by a single amino-acid substitution (Glu152Lys). NDM-9 was first reported in a clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate from China in 2013 (Wang et al., 2014). This enzyme was also identified in a *mcr-1*-harboring *Escherichia coli* strain, in three environmental *Klebsiella variicola* isolates in South Korea (Yao et al., 2016; Di et al., 2017) and in a *K. pneumoniae* strain isolated from wastewater in Switzerland in 2015 (Nüesch-Inderbinen et al., 2018). Since then, NDM-9 was sporadically detected in clinical, environmental or animal strains belonging to various *Enterobacterales* species including *Salmonella* sp. in Asia and Europe (Italy), but also in Africa (Tunisia) and in French Polynesia (Falcone et al., 2020; Li et al., 2021; Oueslati et al., 2021; Song et al., 2022; Sun et al., 2023; Zouaoui et al., 2023). MLST assigned *A. baumannii* 13A297 strain to ST^{Pas}25, and ST^{Ox}2280, according to the MLST Pasteur and Oxford schemes, respectively. In addition to the globally disseminated multidrug-resistant ST^{Pas}1 and ST^{Pas}2, ST^{Pas}25, which belongs to international clone 7 (IC7), has emerged worldwide as epidemic, endemic or sporadic cases in the last two decades (Sahl et al., 2015; Rodríguez et al., 2018; Rafei et al., 2022). A hallmark of this clone is its evolution toward multidrug resistance and a high capacity for biofilm formation (Rafei et al., 2022). In addition, it has been associated with high mortality rates among infected patients (da Silva et al., 2018).

3.2. Genetic support and environment of *bla*_{NDM-9} gene

Analysis of Nanopore sequencing data showed that the *bla*_{NDM-9} gene was located on a full-length Tn125 composite transposon, carried

TABLE 1 MICs (mg/L) of β -lactams and other antibiotics for *A. baumannii* 13A297, *A. baumannii* CIP70.10 (pABEC), *A. baumannii* CIP70.10 (pABEC-NDM-1), *A. baumannii* CIP70.10 (pABEC-NDM-9), *E. coli* DH5 α (pABEC), *E. coli* DH5 α (pABEC-NDM-1), and *E. coli* DH5 α (pABEC-NDM-9).

Antibiotic	<i>A. baumannii</i> 13A297	<i>E. coli</i> DH5 α			<i>A. baumannii</i> CIP70.10		
		pABEC-NDM-1	pABEC-NDM-9	pABEC	pABEC-NDM-1	pABEC-NDM-9	pABEC
Ticarcillin	>512	>512	>512	2	>512	>512	32
Piperacillin-tazobactam ^a	64	>64	>64	≤ 2	>64	>64	4
Ceftazidime	>128	>32	>32	<0.5	>32	>32	4
Cefepime	>128	32	>32	<0.5	>32	>32	2
Imipenem	64	>16	>16	<0.5	>16	>16	0.5
Meropenem	>64	16	>16	<0.12	>16	>16	0.5
Cefiderocol ^b	>32	2	8	<0.03	4	>32	0.25
Amikacin	128	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Tigecycline	0.5	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25
Minocycline	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5
Trimethoprim-sulfamethoxazole	>8	$\leq 1/19$	$\leq 1/19$	$\leq 1/19$	$\leq 1/19$	$\leq 1/19$	$\leq 1/19$
Ciprofloxacin	>16	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25
Colistin	1	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25	1	1	1

^aTazobactam 4 mg/L.

^bThe values higher than that of the EUCAST clinical PK-PD cefiderocol concentration (> 2 μ g/mL) are indicated in bold.

by a 166,254-bp long plasmid named pNDM-9. A 3-bp target site duplication (TTT) identified on both sides of Tn125 was indicative of a transposition event. Interestingly, the genetic environment of *bla*_{NDM-9} in *A. baumannii* 13A297 corresponded to the original Tn125 and differed from that identified in *Enterobacteriales*. Indeed, IS26 was associated with *bla*_{NDM-9} in all but one of the plasmids identified in *Enterobacteriales*, highlighting that IS26 may play a key role in the transfer of the *bla*_{NDM-9} gene between *Enterobacteriales* (Li et al., 2021). Plasmid pNDM-9 encoded 165 open reading frames and possessed a GC content of 39.1%. It exhibited significant similarity (99.9%) to 75% of the sequence of plasmid pIOMTU433 (accession number: AP014650) (Figure 1). Plasmid pIOMTU433 is a 189,354 bp long plasmid identified in an *A. baumannii* clinical strain isolated in Nepal in 2013. Interestingly, pIOMTU433 did not carry a *bla*_{NDM-like} gene but a *bla*_{PER-7} ESBL-encoding gene. In addition to *bla*_{NDM-9}, pNDM-9 also carried other resistance genes, such as *sul2*, *aph(3'')-Ib* and *aph(6)-Id*, which confer resistance to sulfonamides and aminoglycosides, respectively. Furthermore, the pNDM-9 plasmid shared 99.9% nucleotide identity with 90% of the sequence of the *bla*_{NDM-1} positive plasmid pPM194122 (150,385 bp-long, accession number CP050426), which was sequenced from an *A. baumannii* strain from India (Figure 1). Consistent with the identification of an incomplete *tra* operon, attempts to transfer the pNDM-9 plasmid by mating-out assays were unsuccessful.

3.3. Antibiotic susceptibilities of transformants with NDM-1 and NDM-9

To clarify the impact of NDM-9 on cefiderocol susceptibility and to compare it to that of NDM-1, both corresponding *bla*_{NDM-1} and *bla*_{NDM-9} genes were cloned and expressed in *E. coli* and

A. baumannii reference strains. NDM expression from the plasmid pABEC in *E. coli* DH5 α conferred resistance to ceftazidime, imipenem, meropenem, and cefiderocol for NDM-9 (8 mg/L) and a decrease in susceptibility to cefiderocol (at least 64-fold) for NDM-1 (2 mg/L), using the pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) cut-off of 2 mg/L ($S \leq 2$ mg/L; $R > 2$ mg/L) (Table 1). Interestingly, DH5 α cells transformed with *bla*_{NDM-9}-carrying vector pABEC-NDM-9 were 4-fold more resistant to cefiderocol and at least 2-fold to meropenem than those containing pABEC-NDM-1. In agreement with this result, the transfer of the vector pABEC-NDM-9 into the *A. baumannii* CIP70.10 strain led to a higher level of resistance to cefiderocol (MIC >32 mg/L) than that of pABEC-NDM-1 (MIC = 4 mg/L) (Table 1).

3.4. Biochemical properties of NDM-1 and NDM-9 against ceftazidime and cefiderocol and molecular modeling

NDM-9 was previously shown to possess slightly increased hydrolytic activity toward meropenem, imipenem and cefotaxime as compared to NDM-1 (Wang et al., 2014). To gain insight into the structural features that may explain the different levels of resistance of NDM-1 and NDM-9 to cefiderocol, both enzymes were purified and steady-state kinetic parameters of ceftazidime and cefiderocol were determined. NDM-9 exhibited a 7-fold higher hydrolytic efficiency (k_{cat}/K_m) toward ceftazidime, which is linked to a higher turnover rate (k_{cat}) of this antibiotic by NDM-9 (Table 2). Although weak, a slight hydrolysis of cefiderocol by NDM-1 was evidenced. As compared to NDM-1, NDM-9 possessed a 3-fold higher affinity for cefiderocol, which was associated with a 2-fold increase in its catalytic efficiency (Table 2).

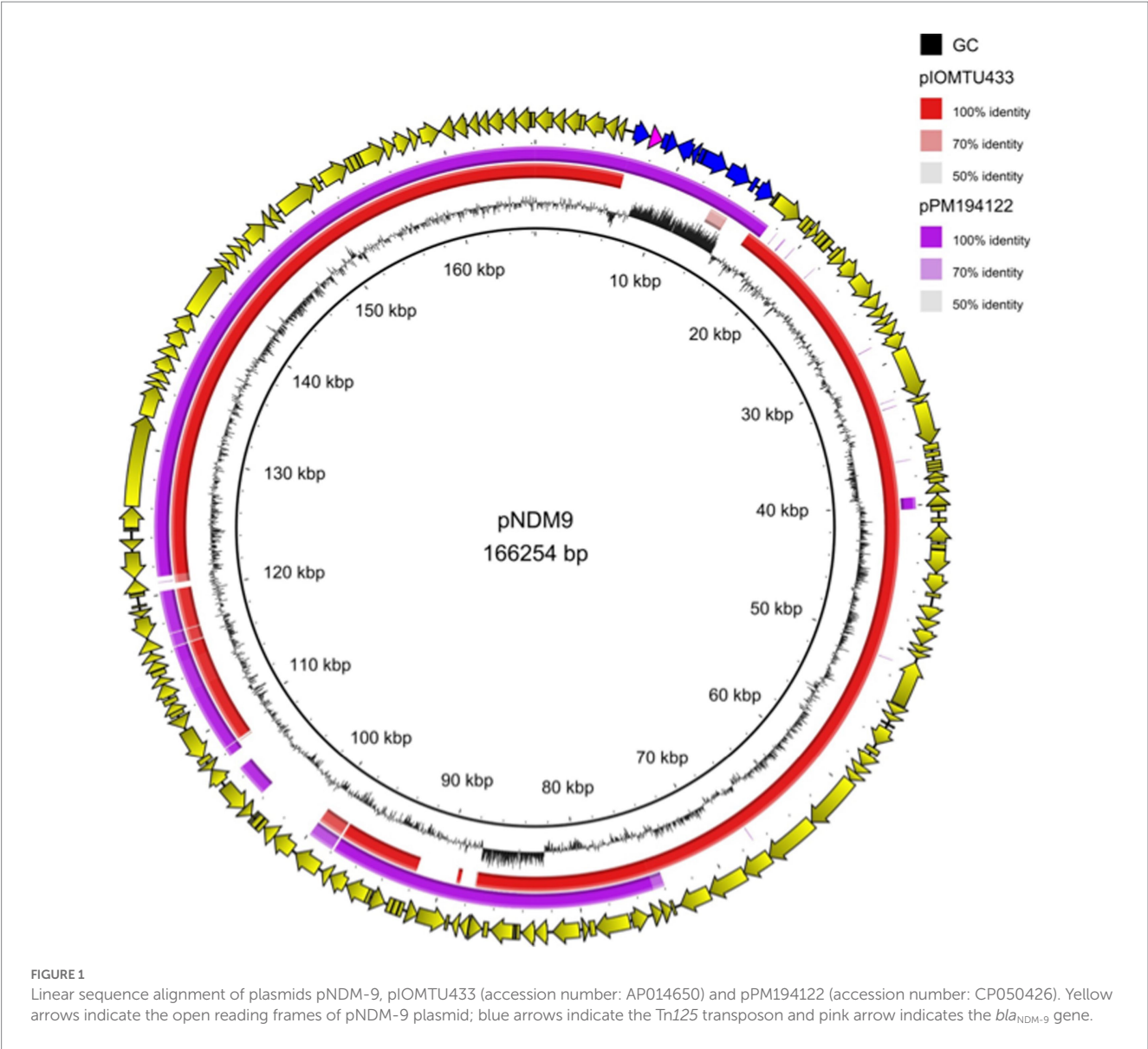


TABLE 2 Steady-state kinetic parameters for hydrolysis of ceftazidime and cefiderocol by NDM-1 and NDM-9.

Substrate	K_m (μM)		k_{cat} (s^{-1})		k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	
	NDM-1	NDM-9	NDM-1	NDM-9	NDM-1	NDM-9
Ceftazidime	37 ± 5	36 ± 3.6	20 ± 1.8	144 ± 17.7	0.55 ± 0.05	3.99 ± 0.5
Cefiderocol	161 ± 14.8	53 ± 3.6	11 ± 1.4	7 ± 0.9	0.069 ± 0.01	0.13 ± 0.008

Data are the mean of three independent experiments. Standard deviations were within 10% of the mean value.

Molecular modeling revealed stabilizing interactions between cefiderocol and residues Lys211, Lys216, Asn220 of NDM-9, and a strong ionic interaction of Lys152 with both Asp223 and the carboxylate group of R1 substituent in cefiderocol (Figure 2). In NDM-1, this latter favorable interaction is replaced by a repulsive interaction with Glu152, leading to a lower affinity for cefiderocol. Altogether, these results explain the higher cefiderocol MIC and catalytic efficiency observed for NDM-9 as compared to NDM-1.

4. Conclusion

To the best of our knowledge, this is the first characterization of an NDM-9 *A. baumannii* clinical isolate, assigned to ST^{Pas}25, which belongs to the emerging international clone 7 (IC7). The high level of resistance to cefiderocol of this clinical isolate is at least partly due to the Glu152Lys substitution of NDM-9, but further studies are needed to investigate the contribution of other genetic determinants.

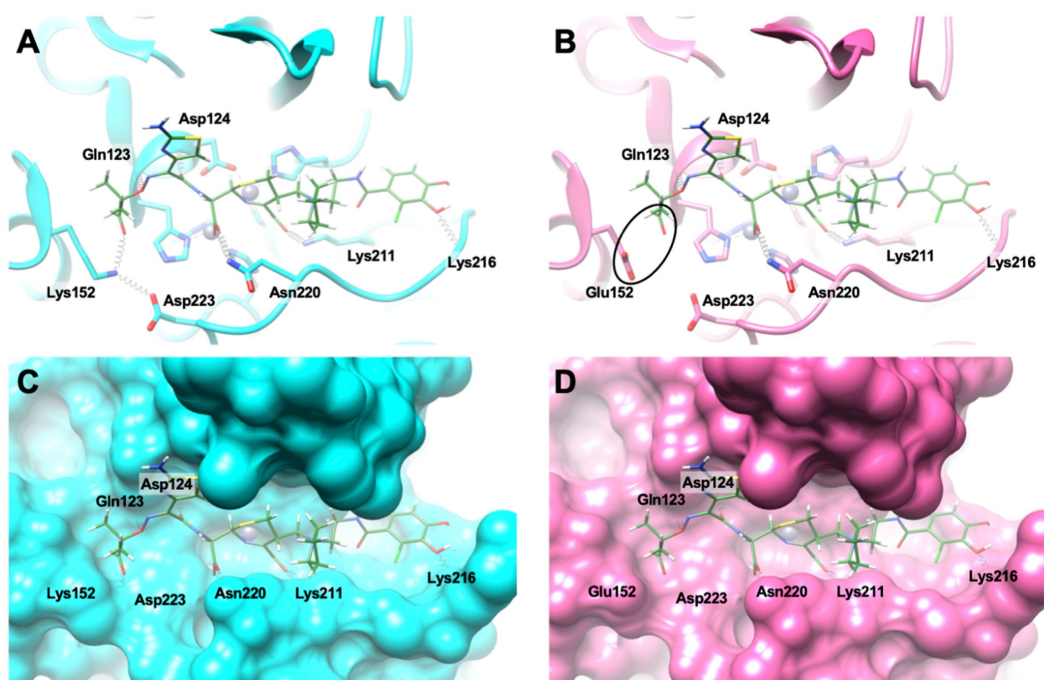


FIGURE 2

(A,C) Docking conformation of cefiderocol (represented as green sticks) in the active site of NDM-9 (represented as cyan cartoon and surface, respectively). (B,D) The same docking conformation superposed with the active site of NDM-1 (represented as pink cartoon and surface, respectively). The black ellipse highlights the repulsive interaction between the side chain of Glu152 and the carboxylate group from the R1 substituent in cefiderocol. Hydrogen bonds are represented as black springs.

The substitution of residue 152 in NDM-9 is unique among NDM variants and it remains to be elucidated whether other substitutions in other NDM variants may have impacts on cefiderocol hydrolysis. Since cefiderocol is the only new active molecule against CRAB strains, the emergence of the NDM-9 variant, which may contribute to high levels of resistance to cefiderocol, is a major threat to human health, given the subsequent therapeutic dead end. As the rates of NDM-positive isolates among carbapenemase-producing *A. baumannii* isolates is increasing in France (1.7% in 2012, 15.9% in 2016 and 32.2% in 2021, French National Reference Centre for Antimicrobial Resistance) and in other countries (Adams et al., 2020; Fam et al., 2020; Kindu et al., 2020; Lukovic et al., 2020) it may seriously compromise the efficacy of cefiderocol for this highly drug resistant pathogen that is among the WHO list of critical bacteria,² for which new antibiotics are urgently needed.

Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repository and accession number(s) can be found in the article/supplementary material.

² [https://www.who.int/news/](https://www.who.int/news/item/27-02-2017s-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed)

[item/27-02-2017s-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed](https://www.who.int/news/item/27-02-2017s-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed)

Author contributions

KJ, RAB, TN, and AP contributed to conception and design of the study. SG, PT, J-BV, SO, and BII performed the experiments. SG, BII, AP, and MB analyzed the data. SG and AP wrote the first draft of the manuscript. AP, PP, KJ, RAB, TN, and BII reviewed and edited the manuscript. All authors read and approved the version.

Funding

The French National Reference Centre for Antimicrobial Resistance is funded by the French Ministry of Health through the Santé publique France agency.

Acknowledgments

The authors thank medical microbiologists for referring the carbapenem resistant *A. baumannii* strains to the French NRC-AR.

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.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated

References

- Adams, M. D., Pasteran, F., Traglia, G. M., Martinez, J., Huang, F., Liu, C., et al. (2020). Distinct mechanisms of dissemination of NDM-1 metallo- β -lactamase in *Acinetobacter* species in Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* 64:20. doi: 10.1128/aac.00324-20
- Antimicrobial Resistance in the EU/EEA (EARS-Net). (2022). Annual Epidemiological Report for 2021. Available at: https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/AER-EARS-Net-2021_2022-final.pdf
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2020). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing M100 S, 33th Edn*; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA. 2023.
- da Silva, K. E., Maciel, W. G., Croda, J., Cayó, R., Ramos, A. C., de Sales, R. O., et al. (2018). A high mortality rate associated with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* ST79 and ST25 carrying OXA-23 in a Brazilian intensive care unit. *PLoS One* 13:e0209367. doi: 10.1371/journal.pone.0209367
- Di, D. Y. W., Jang, J., Unno, T., and Hur, H.-G. (2017). Emergence of *Klebsiella variicola* positive for NDM-9, a variant of New Delhi metallo- β -lactamase, in an urban river in South Korea. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 1063–1067. doi: 10.1093/jac/dkw547
- Falcone, M., Giordano, C., Barnini, S., Tiseo, G., Leonildi, A., Malacarne, P., et al. (2020). Extremely drug-resistant NDM-9-producing ST147 *Klebsiella pneumoniae* causing infections in Italy, May 2020. *Euro Surveill.* 25:2001779. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.48.2001779
- Fam, N. S., Gamal, D., Mohamed, S. H., Wasfy, R. M., Soliman, M. S., El-Kholy, A. A., et al. (2020). Molecular characterization of carbapenem/colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Egypt by whole-genome sequencing. *Infect. Drug Resist.* 13, 4487–4493. doi: 10.2147/IDR.S288865
- Feng, H., Ding, J., Zhu, D., Liu, X., Xu, X., Zhang, Y., et al. (2014). Structural and mechanistic insights into NDM-1 catalyzed hydrolysis of cephalosporins. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 14694–14697. doi: 10.1021/ja508388e
- Kaase, M., Nordmann, P., Wichelhaus, T. A., Gatermann, S. G., Bonnin, R. A., and Poirel, L. (2011). NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1260–1262. doi: 10.1093/jac/dkr135
- Khalid, S., Ahmad, N., Ali, S. M., and Khan, A. U. (2020). Outbreak of efficiently transferred carbapenem-resistant *bla*_{NDM}-producing gram-negative bacilli isolated from neonatal intensive care unit of an Indian hospital. *Microb. Drug Resist.* 26, 284–289. doi: 10.1089/mdr.2019.0092
- Kindu, M., Derseh, L., Gelaw, B., and Moges, F. (2020). Carbapenemase-producing non-glucose-fermenting gram-negative bacilli in Africa, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Microbiol.* 2020:e9461901. doi: 10.1155/2020/9461901
- Kohira, N., Hackel, M. A., Ishioka, Y., Kuroiwa, M., Sahm, D. F., Sato, T., et al. (2020). Reduced susceptibility mechanism to cefiderocol, a siderophore cephalosporin, among clinical isolates from a global surveillance programme (SIDERO-WT-2014). *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 22, 738–741. doi: 10.1016/j.jgar.2020.07.009
- Le Terrier, C., Nordmann, P., Buchs, C., Di, D. Y. W., Rossolini, G. M., Stephan, R., et al. (2023). Wide dissemination of gram-negative bacteria producing the taniborbactam-resistant NDM-9 variant: a one health concern. *J. Antimicrob. Chemother.* doi: 10.1093/jac/dkad210. Online ahead of print
- Li, Y., Wang, Q., Xiao, X., Li, R., and Wang, Z. (2021). Emergence of *bla*_{NDM-9}-bearing tigecycline-resistant *Klebsiella aerogenes* of chicken origin. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 26, 66–68. doi: 10.1016/j.jgar.2021.04.028
- Lin, Y. C., Kuroda, M., Suzuki, S., and Mu, J. J. (2019). Emergence of an *Escherichia coli* strain so-harboring mcr-1 and *bla*_{NDM-9} from a urinary tract infection in Taiwan. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 16, 286–290. doi: 10.1016/j.jgar.2018.10.003
- Lukovic, B., Gajic, I., Dimkic, I., Kekic, D., Zornic, S., Pozder, T., et al. (2020). The first nationwide multicenter study of *Acinetobacter baumannii* recovered in Serbia: emergence of OXA-72, OXA-23 and NDM-1-producing isolates. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 9:101. doi: 10.1186/s13756-020-00769-8
- Malik, S., Kaminski, M., Landman, D., and Quale, J. (2020). Cefiderocol resistance in *Acinetobacter baumannii*: roles of β -lactamases, siderophore receptors, and penicillin binding protein 3. *Antimicrob. Agents Chemother.* 64:1221. doi: 10.1128/AAC.01221-20
- Mushtaq, S., Sadouki, Z., Vickers, A., Livermore, D. M., and Woodford, N. (2020). *In vitro* activity of cefiderocol, a siderophore cephalosporin, against multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 64:20. doi: 10.1128/aac.01582-20
- Naas, T., Oueslati, S., Bonnin, R. A., Dabos, M. L., Zavala, A., Dortet, L., et al. (2017). Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 32, 917–919. doi: 10.1080/14756366.2017.1344235
- Nüesch-Inderbilen, M., Zurfluh, K., Stevens, M. J. A., and Stephan, R. (2018). Complete and assembled genome sequence of an NDM-9- and CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 wastewater isolate from Switzerland. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 13, 53–54. doi: 10.1016/j.jgar.2018.03.001
- Oueslati, S., Emeraud, C., Grosperin, V., Levy, M., Cotellon, G., Creton, E., et al. (2021). Polyclonal dissemination of NDM-1- and NDM-9-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in French Polynesia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 65:20. doi: 10.1128/aac.02437-20
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., et al. (2004). UCSF chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612. doi: 10.1002/jcc.20084
- Poirel, L., Sadek, M., and Nordmann, P. (2021). Contribution of PER-type and NDM-type β -lactamases to cefiderocol resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 65:e0087721. doi: 10.1128/AAC.00877-21
- Potron, A., Poirel, L., and Nordmann, P. (2014). Derepressed transfer properties leading to the efficient spread of the plasmid encoding carbapenemase OXA-48. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 467–471. doi: 10.1128/aac.01344-13
- Quiñones Pérez, D., Aung, M. S., Carmona Cartaya, Y., González Molina, M. K., Pereda Novales, N., and Kobayashi, N. (2022). Clonal diversity of *Acinetobacter* clinical isolates producing NDM-type carbapenemase in Cuba, 2013–19. *IJID Reg.* 5, 93–96. doi: 10.1016/j.ijregi.2022.08.008
- Rafei, R., Koong, J., Osman, M., Al Atrouni, A., Hamze, M., and Hamidian, M. (2022). Analysis of pCl107 a large plasmid carried by an ST25 *Acinetobacter baumannii* strain reveals a complex evolutionary history and links to multiple antibiotic resistance and metabolic pathways. *FEMS Microbes 3:xtac027*. doi: 10.1093/femsmc/xtac027
- Ramirez, M. S., Bonomo, R. A., and Tolmasky, M. E. (2020). Carbapenemases: transforming *Acinetobacter baumannii* into a yet more dangerous menace. *Biomol. Ther.* 10:720. doi: 10.3390/biom10050720
- Rodriguez, C. H., Nastro, M., and Famiglietti, A. (2018). Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. *Rev. Argent. Microbiol.* 50, 327–333. doi: 10.1016/j.ram.2017.10.006
- Sahl, J. W., Del Franco, M., Pournaras, S., Colman, R. E., Karah, N., Dijkshoorn, L., et al. (2015). Phylogenetic and genomic diversity in isolates from the globally distributed *Acinetobacter baumannii* ST25 lineage. *Sci. Rep.* 5:15188. doi: 10.1038/srep15188
- Simner, P. J., and Patel, R. (2020). Cefiderocol antimicrobial susceptibility testing considerations: the Achilles' heel of the Trojan horse? *J. Clin. Microbiol.* 59, e00951–e00920. doi: 10.1128/JCM.00951-20
- Song, Y., Wang, Z., Wang, C., Zhang, G., Li, J., and Feng, J. (2022). An urban soil environmental *E. coli* ST354 isolate co-harboring mcr-1 and *bla*_{NDM-9}. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 29, 173–175. doi: 10.1016/j.jgar.2022.03.011
- Sun, Y., Han, Y., Qian, C., Zhang, Q., Yao, Z., Zeng, W., et al. (2023). A novel transposon Tn7540 carrying *bla*_{NDM-9} and *fosA3* in chromosome of a pathogenic multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Indiana isolated from human faeces. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 33, 72–77. doi: 10.1016/j.jgar.2023.01.013
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D. L., et al. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* 18, 318–327. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2021). Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0, 2021. Available at: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables.pdf
- Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W., and Taylor, R. D. (2003). Improved protein–ligand docking using GOLD. *Proteins* 52, 609–623. doi: 10.1002/prot.10465
- Vuilleminot, J.-B., Bour, M., Beyrouthy, R., Bonnet, R., Laaberk, M.-H., Charpentier, X., et al. (2022). Genomic analysis of CTX-M-115 and OXA-23/–72 co-producing *Acinetobacter baumannii*, and their potential to spread resistance genes by natural transformation. *J. Antimicrob. Chemother.* 77, 1542–1552. doi: 10.1093/jac/dkac099
- Wang, X., Li, H., Zhao, C., Chen, H., Liu, J., Wang, Z., et al. (2014). Novel NDM-9 metallo- β -lactamase identified from a ST107 *Klebsiella pneumoniae* strain isolated in China. *Int. J. Antimicrob. Agents* 44, 90–91. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.04.010

Xanthopoulou, K., Urrutikoetxea-Gutiérrez, M., Vidal-Garcia, M., de Tuesta, D., del Arco, J.-L., Sánchez-Urtaza, S., et al. (2020). First report of New Delhi Metallo- β -lactamase-6 (NDM-6) in a clinical *Acinetobacter baumannii* isolate from northern Spain. *Front. Microbiol.* 11:589253. doi: 10.3389/fmicb.2020.589253

Yamano, Y. (2019). *In vitro* activity of cefiderocol against a broad range of clinically important gram-negative bacteria. *Clin. Infect. Dis.* 69, S544–S551. doi: 10.1093/cid/ciz827

Yao, X., Doi, Y., Zeng, L., Lv, L., and Liu, J.-H. (2016). Carbapenem-resistant and colistin-resistant *Escherichia coli* co-producing NDM-9 and MCR-1. *Lancet Infect. Dis.* 16, 288–289. doi: 10.1016/S1473-3099(16)00057-8

Zouaoui, E., Mercuri, P. S., Radaoui, A., Ben Salah, N., Galleni, M., Ben-Mahrez, K., et al. (2023). High prevalence of *bla*_{NDM} among carbapenem non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian hospital first report of *bla*_{NDM-9}, *bla*_{KPC-20} and *bla*_{KPC-26} genes. *Curr. Microbiol.* 80:152. doi: 10.1007/s00284-023-03268-2

Discussion

I. Impact des variants ADC sur la résistance aux β -lactamines

1. Impact des mutations sur le spectre

Au total, 12 variants de l'enzyme ADC ont été étudiés dans ce travail, chacun comportant différentes substitutions par rapport à l'enzyme ADC-50, identifiée dans la souche de référence CIP70.10. La construction d'une souche délétée du gène *bla*_{ADC-50} ne diminuait pas significativement les valeurs de CMI des β -lactamines testées (à savoir ticarcilline, ceftazidime, céfotaxime, céfépime, céfidérol, imipénème et méropénème), montrant que l'enzyme ADC a un faible impact lorsque celle-ci n'est pas surproduite. La surproduction d'ADC confère une diminution de sensibilité aux pénicillines et aux céphalosporines de troisième génération mais n'altère pas la sensibilité des souches au céfépime ou aux carbapénèmes. Cette surproduction d'ADC est fréquente chez les souches multi-résistantes et est le principal mécanisme de résistance aux céphalosporines de troisième génération chez les souches cliniques de *A. baumannii* résistantes à la ceftazidime (Bou & Martínez-Beltrán, 2000; Jia et al., 2019).

La surproduction des variants ADC étudiés dans ce travail montre en revanche que la modification de la séquence protéique par rapport à l'enzyme ADC-50 peut entraîner une modification du spectre d'hydrolyse, avec notamment un impact sur le céfépime, comme cela avait déjà été démontré pour les variants, ADC-30, ADC-33 et ADC-56 qui sont donc ESAC (Rodríguez-Martínez, Nordmann, et al., 2010; Rodríguez-Martínez, Poirel, et al., 2010; Tian et al., 2011). Dans cette étude, neuf variants (ADC-30, ADC-33, ADC-56, ADC-64, ADC-200, ADC-211, ADC-256, ADC-268 et ADC-276) sur les 12 étudiés présentaient des valeurs de CMI du céfépime au moins 4 fois supérieures à celle de l'enzyme ADC-50 de référence.

Les variants ADC-30, ADC-33 et ADC-56 ont déjà été caractérisés mais les clonages des gènes correspondants et la détermination des CMI avaient été réalisés chez *E. coli* (TOP10 ou DH10B) en utilisant les plasmides de clonage TOPO ou pBC-SK (Rodríguez-Martínez, Poirel, et al., 2010, 2010; Tian et al., 2011).

L'impact de certaines substitutions peut même être mis en évidence par le fait que certains variants sont très proches entre eux et ne présentent qu'une seule substitution de différence. C'est le cas avec ADC-30, duquel plusieurs variants ne diffèrent que par une seule substitution : ADC-56 (R148Q), ADC-73 (G222S), ADC-82 (A220L) et ADC-200 (S318T). Ainsi, il est assez évident que la substitution R148Q (ADC-56) joue un rôle important dans l'augmentation des valeurs de CMI du céfépime. De plus, le fait

que la même valeur de CMI soit retrouvée pour le variant ADC-268, également porteur de cette substitution, corrèle avec cette observation et celle de Tian et collègues, qui avaient caractérisé l'enzyme ADC-56 (Tian et al., 2011). La substitution G222S (ADC-73) semble quant à elle présenter un impact plus modeste, la CMI du céfépime ne changeant que d'une dilution entre les souches dans lesquelles les gènes codant ADC-30 et ADC-73 ont été clonés. Dans ce cas, il est possible que comme ADC-30 présente déjà un phénotype ESAC, l'impact de la substitution G222S soit masqué, ou alors que cette substitution ne contribue finalement pas à l'élargissement du spectre de l'enzyme. L'accumulation de mutations n'entraîne donc pas de hausse supplémentaire des CMIs dans tous les cas. A l'inverse, la comparaison des variants ADC-30 et ADC-82 révèle la substitution P220L qui aboutit à une augmentation de la sensibilité au céfépime, conduisant finalement à la perte du phénotype de type ESAC. De manière plus générale, les variants semblaient présenter des CMIs du céfépime d'autant plus importantes que les CMIs de la ticarcilline étaient basses, et inversement. Cette corrélation inverse entre résistance à la ticarcilline et au céfépime a déjà été décrite (Nordmann & Mammeri, 2007).

La nature de l'acide aminé est aussi importante. Les substitutions R148Q et R148I sont situées au même endroit mais leur impact diffère, avec une valeur de CMI du céfépime de 512 µg/ml pour la première et de 128 µg/ml pour la seconde. Ces résultats corroborent ceux obtenus par Tian et collègues, qui ont réalisé des expériences de mutagenèse dirigée sur ce résidu (en insérant les substitutions R148A, R148E et R148K) (Tian et al., 2011). Les auteurs proposent que l'impact d'une substitution à cette position s'explique probablement par sa proximité avec le motif conservé ¹⁵⁰YXN et permettrait de rendre l'hélice 10 plus flexible. De plus, ils ont constaté que les acides aminés plus petits et moins chargés que l'arginine semblaient être ceux ayant le plus d'impact sur la sensibilité au céfépime. Ils entraîneraient une modification de la conformation du site actif qui permettrait une meilleure fixation du céfépime. Celui-ci pourrait alors interagir avec le résidu R343, entraînant une meilleure affinité de l'enzyme pour son substrat ainsi qu'un meilleur *turnover* (Tian et al., 2011). L'importance du résidu R148 dans l'élargissement du spectre a aussi été démontré dans d'autres céphalosporinases, notamment CMY-2 et chez l'AmpC de *Citrobacter freundii* (Dahyot & Mammeri, 2012). Des expériences de mutagenèse dirigée ont été réalisées sur l'enzyme AmpC d'une souche de *C. freundii* qui possède naturellement une arginine en position 148, afin de générer la substitution R148H. Le clonage du variant initial (avec le résidu R148) et du variant H148 a prouvé que la hausse des CMIs du céfépime était bien due au résidu R148, puisque la CMI du céfépime diminuait de 16 fois quand le résidu R148 était remplacé par H148.

Quatre des variants ADC surproduits conféraient des valeurs de CMIs du céfidérocol 4 fois supérieures à celle de l'enzyme ADC-50. Nous avons montré dans ce travail qu'une substitution en position R148 de l'enzyme ADC, identifiée dans les variants ADC-56, ADC-268 et ADC-276, participait à ce phénotype.

Pour le variant ADC-33 en revanche, la substitution impliquée n'a pas été identifiée, même s'il est probable que les altérations identifiées dans l' Ω -loop soient la cause de la modification du spectre de l'enzyme (P213R et/ou InsA218). L'implication du variant ADC-33 dans la diminution de sensibilité au céfidérol a déjà été décrite dans une précédente étude, avec également un impact du variant ADC-25 (Asrat et al., 2023). La surproduction de ces deux variants était d'ailleurs nécessaire pour observer un effet sur le céfidérol. Les substitutions proposées comme étant responsables de ce spectre ne semblent toutefois pas corrélées avec les données de nos travaux. En effet, les substitutions G217D et R321G (par rapport à ADC-1) identifiées dans ces variants par les auteurs sont également présentes dans l'ensemble des variants que nous avons caractérisés au cours de ces travaux, sans que ceux-ci ne contribuent tous à une diminution de sensibilité au céfidérol.

Il est intéressant de constater que les quatre variants (ADC-33, ADC-56, ADC-268, ADC-276) participant à une diminution de sensibilité au céfidérol (CMI = 2 μ g/ml) confèrent également de très hauts niveaux de résistance à la ceftazidime ou au céfépime (de 16 à plus de 64 fois et de 8 à 64 fois la CMI de la souche produisant ADC-50, respectivement). Ainsi, les variants ADC qui ont un impact sur la sensibilité au céfidérol semblent également être ceux capables de conférer de hauts niveaux de résistance à la ceftazidime ou au céfépime.

Chez d'autres espèces, la contribution de l'enzyme AmpC dans la baisse de sensibilité au céfidérol a également été décrite. Chez *Enterobacter cloacae*, ce sont des substitutions dans la région du R2-loop qui semblent entraîner une perte de sensibilité au céfidérol d'un facteur 4 (Kawai et al., 2020).

Par ailleurs, des substitutions situées dans l' Ω -loop de l'enzyme PDC (*Pseudomonas Derived Cephalosporinase*) ont été identifiées dans des souches de *P. aeruginosa* résistantes au céfidérol. Cependant ces souches présentaient également des modifications en amont du gène *pvdS*, un régulateur de la synthèse de pyoverdine (un sidérophore) ou dans l'opéron *fecIRA*, un régulateur de la synthèse des transporteurs du fer (Simner et al., 2021). La substitution F121L dans l'enzyme PDC de *P. aeruginosa*, déjà connue pour conférer un phénotype ESAC, a aussi été identifiée dans des souches résistantes au céfidérol présentant des codons stop prématurés dans les protéines PirA et PiuD, impliquées dans le transport des sidérophores (Philippon et al., 2022; Streling et al., 2021). Les mutations dans l' Ω -loop et/ou conduisant à un phénotype ESAC semblent donc être les plus susceptibles de conduire à une perte de sensibilité au céfidérol (Simner et al., 2021).

Nous avons montré dans ce travail que la substitution S318T présente chez l'enzyme ADC-200 en comparaison à l'enzyme ADC-30 conduit à une augmentation des valeurs de CMI du méropénème et de l'imipénème d'un facteur 8 et 4, respectivement. Cette substitution a aussi été identifiée chez le variant ADC-256, présentant lui aussi une CMI du méropénème plus élevée que les autres variants. En revanche, il n'y avait pas de différence significative entre les CMIs de l'imipénème des variants ADC-256 et ADC-50. De plus, l'insertion de la substitution S318T dans le variant ADC-50 n'a pas non plus

entraîné de variation significative de sensibilité à l'imipénème. Ainsi les résultats ne permettent pas de confirmer que la substitution S318T est responsable de la différence de sensibilité à l'imipénème entre les souches produisant ADC-200 et ADC-30. Concernant l'absence de différence significative des CMI de l'imipénème pour les variants ADC-256 et ADC-50, il est en fait probable qu'ADC-50 contribue très légèrement à la perte de sensibilité à l'imipénème. En effet, les valeurs de CMI de l'imipénème montraient deux dilutions de différence entre la souche délétée du gène *bla*_{ADC-50} et la souche surexprimant *bla*_{ADC-50} grâce au promoteur d'*ISAb*₁. De plus, la détermination des paramètres enzymatiques a mis en évidence une affinité et une hydrolyse faible de l'imipénème par ADC-50, qui viennent renforcer cette hypothèse. La littérature a également rapporté que d'autres variants ADC (ADC-7, ADC-11, ADC-14, ADC-16, ADC-18, ADC-33 et ADC-68) avaient une affinité pour l'imipénème, mais l'hydrolyse de ce dernier était très faible, voire non détectable (Beceiro et al., 2009; K. Hujer et al., 2005; Jeon et al., 2014; Rodríguez-Martínez, Nordmann, et al., 2010). Ces résultats confortent donc l'hypothèse que certains variants pourraient contribuer très légèrement à la perte de sensibilité à l'imipénème, même si dans ces études, ceci n'a pas toujours pu être vérifié phénotypiquement. Mais tous les variants ADC ne semblent pas contribuer à une perte de sensibilité à l'imipénème puisque la surproduction de certains d'entre eux, comme ADC-73, n'a pas entraîné de modification de sensibilité à l'imipénème d'après nos résultats. A ce jour, seule l'enzyme ADC-68 avait été rapportée comme pouvant contribuer à une perte de sensibilité aux carbapénèmes. Cependant, aucune substitution commune avec ADC-50 n'a pu être identifiée comme étant responsable de ce phénotype (Jeon et al., 2014). En revanche, l'obtention du variant ADC-50 S318T par mutagenèse dirigée a permis de confirmer l'impact de cette substitution sur la valeur de CMI du méropénème. Cette substitution est identifiée dans 3 variants (ADC-200 et ADC-256 qui ont été caractérisés pour cette étude et ADC-145, qui n'a pas été caractérisé mais identifié dans une souche isolée aux Etats-Unis). L'impact de cette substitution pourrait s'expliquer par sa proximité avec le motif ³¹⁵KTG, impliqué dans l'activité catalytique de l'enzyme et lui-même à proximité du R2-loop. Cette région pourrait être d'intérêt dans la baisse de sensibilité aux carbapénèmes conférée par la production d'une β -lactamase appartenant à la classe C de Ambler. En effet, CMY-10, qui est également une céphalosporinase partageant 44,5 % d'identité en acides aminés avec l'enzyme ADC-200 confère aussi une perte de sensibilité aux carbapénèmes (J. Kim et al., 2006). Kim et collègues ont souligné l'importance d'une délétion de 3 acides aminés dans la région du R2-loop dans cette enzyme, entraînant des modifications de structure qui expliqueraient ainsi le phénotype observé.

La différence de CMI de l'imipénème entre les variants ADC-30 et son dérivé ADC-200 pourrait quant à elle s'expliquer par l'existence d'une synergie entre la substitution S318T et une des autres substitutions présentes dans le variant ADC-30 ou ADC-200. Des expériences de mutagenèse dirigée permettant de remplacer progressivement les résidus d'ADC-50 S318T par ceux présents dans ADC-30

(Q126K, P143S, A192P, F259R, T278A, P279T et N320T) pourraient permettre de vérifier si certaines combinaisons de substitutions peuvent en effet conduire à une hausse des CMI de l'imipénème.

Lors de la détermination des paramètres enzymatiques des variants ADC-200, ADC-256, ADC-30, ADC-50 et ADC-50 S318T, les constantes catalytiques (k_{cat}) de tous ces variants étaient basses pour la céphalotine et également pour le couple ADC-30 et ceftazidime, démontrant que l'hydrolyse des molécules était faible. Le mécanisme en cause serait donc plutôt du *trapping*, c'est-à-dire que l'enzyme « emprisonne » l'antibiotique sans l'hydrolyser, ne lui permettant alors plus d'agir. Ces expériences ont aussi mis en évidence que le phénotype observé pour le méropénème était probablement dû à une meilleure activité catalytique des enzymes portant la substitution S318T.

Un bilan des substitutions et de leur impact sur le spectre de résistance est proposé en **Tableau 14**.

Tableau 14 : Liste des substitutions identifiées chez les variants de l'enzyme ADC caractérisés au cours de ce travail.

Mutation	Variant étudié dans ce travail	Nombre d'autres variants ADC avec cette substitution (n= 306)	Autres substitutions identifiées à la même position	ESAC	Référence
S56R	ADC-74, ADC-276	12	5 (S56G) ; 2 (S56N)	Non	(Rodríguez-Martínez, Nordmann, et al., 2010)
T70N	ADC-211	4	1 (T70I)	Oui	(Fraile-Ribot et al., 2018) [PDC-222]
E95V	ADC-256	21	3 (E95K) ; 1 (E95G)	Non	(Rodríguez-Martínez, Poirel, et al., 2010)
Q126K	ADC-30, -33, -56, -73, -82, -200 et -268	84	-	A démontrer	(Pérez et al., 2014; Rodríguez-Martínez, Nordmann, et al., 2010; Rodríguez-Martínez, Poirel, et al., 2010)
K139Q	ADC-74, ADC-276	50	-	Non	(Rodríguez-Martínez, Nordmann, et al., 2010)
P143S	ADC-30, -33, -56, -73, -82, -200 et -268	91	5 (P143A) ; 6 (P143Q)	A démontrer	(Pérez et al., 2014; Rodríguez-Martínez, Nordmann, et al., 2010)
R148Q/I	ADC-56, ADC-268 / ADC-276	6 / 1	1 (R148L)	Oui	(Tian et al., 2011)
A192P	Tous	285	1 (A192T)	Non	(Rodríguez-Martínez, Nordmann, et al., 2010)
F201V	ADC-211	2	5 (F201Y)	A démontrer	
V211A	ADC-74, ADC-276	8	1 (V211I)	Oui	(Rodríguez-Martínez, Poirel, et al., 2010)
P213R	ADC-33	9	2 (P213S)	Oui	(Rodríguez-Martínez, Nordmann, et al., 2010)
Ins218	ADC-33, ADC-199	25	-	Oui	(Rodríguez-Martínez, Nordmann, et al., 2010)
P219L	ADC-82	3	3 (P213A) ; 1 (P213S)	Perte du phénotype ESAC	
G222S	ADC-73, ADC-268	11	2 (G222D)	A démontrer	
A246T	ADC-211	57	31 (A246K)	Non	(Rodríguez-Martínez, Poirel, et al., 2010)
F259R	ADC-30, -33, -56, -73, -82, -200, -211 et -268	170	8 (F259H) ; 1 (F259L)	Non	(Rodríguez-Martínez, Poirel, et al., 2010)
T278A	Tous	303	-	Non	ADC-50 ; Non ESAC
P279T	Tous	235	9 (P279M) ; 5 (P279L) ; 1 (P279S)	Non	ADC-50 ; Non ESAC
S318T	ADC-200, ADC-256	3		Oui	Cette étude
N320T/S	ADC-30, -56, -73, -74, -82, -199, -200, -211, -276, et -268 / ADC-256	59 / 10	1 (N320K)	A démontrer	
E347K	ADC-256	1		A démontrer	
N358D	ADC-74, ADC-276	15	25 (N358S)	Non	(Rodríguez-Martínez, Nordmann, et al., 2010)

Les substitutions sont annotées par rapport à l'enzyme ADC-50 et en respectant la nomenclature SANC (Mack et al., 2020). Les substitutions indiquées en orange sont impliquées dans la perte de sensibilité au céfidérocol et celles en rouge dans la perte de sensibilité au méropénème.

2. Importance des ADC dans les souches cliniques

Le travail réalisé pour caractériser la substitution du résidu 318 a permis de montrer qu'elle était responsable d'une perte de sensibilité au méropénème chez les souches cliniques. En revanche, les expérimentations réalisées ne permettent pas de savoir si la surproduction d'un de ces variants est suffisante pour conduire à une augmentation de CMI assez importante pour catégoriser la souche résistante. En effet, le clonage dans la souche CIP70.10 des gènes codant l'un ou l'autre des variants ADC-200 et ADC-256 a conduit à des CMI du méropénème égales à 4 µg/ml, alors qu'une souche est considérée comme résistante pour une valeur de CMI supérieure à 8 µg/ml ([The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing \(EUCAST\), 2023](#)). Afin d'évaluer la contribution de l'enzyme ADC chez les souches cliniques, nous avons essayé de déléter le gène codant l'enzyme. Malgré plusieurs tentatives, celles-ci sont restées infructueuses. Il est possible que le phénotype de résistance soit finalement la combinaison entre la production d'une ADC particulière et d'un autre mécanisme, d'autant plus que les souches cliniques ont tendance à accumuler des mécanismes de résistance variés. Chez *P. aeruginosa*, les enzymes PDC sont connues pour contribuer à la perte de sensibilité aux carbapénèmes dans des souches surproduisant des systèmes d'efflux ou ne produisant plus certaines de leurs porines (en particulier OprD, dont l'implication dans la perte de sensibilité aux carbapénèmes est bien connue) ([Grosjean et al., 2021](#); [Quale et al., 2006](#)). Le rôle des PDC en elles-mêmes semblait très modeste, mais plus important si couplé à d'autres mécanismes ([Livermore, 1992](#); [Quale et al., 2006](#)). Un certain nombre de souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes, notamment de *E. coli*, qui présentaient une perte de porines et une surproduction de leur AmpC, a été décrit ([Jacoby, 2009](#); [Mammeri et al., 2008](#)). Ceci est aussi observé chez *A. baumannii* dans des souches ayant une expression réduite des gènes codant les porines Omp33/36 ou Omp37/44/47 ([Philippon et al., 2022](#)).

3. Epidémiologie des ADC

Pour mieux comprendre les liens pouvant exister entre les différents variants étudiés au cours de ce travail, une matrice permettant de comparer le nombre de substitutions et/ou insertions différenciant chaque variant a été réalisée, ainsi qu'un schéma comparant les variants proches (1 à 2 substitutions/insertions) (**Figure 22**). De manière assez intéressante, le variant ADC-30 est celui qui présente le plus de variants proches (4 avec une seule substitution, dont ADC-73 et un différent par 2 substitutions). Les deux variants ADC-30 et ADC-73 représentent quasiment 55 % des variants séquencés au CNR. Cette observation n'est pas surprenante, étant donné que ces variants sont retrouvés dans des clones internationaux, notamment le ST^{Pas}2, qui contribue largement à la diffusion

des souches multi-résistantes à l'échelle mondiale (T. Chen et al., 2021; D'Souza et al., 2019; Findlay et al., 2022; A. Hujer et al., 2021; Ingiti et al., 2020; Iovleva, 2019; H. Li et al., 2015; Yang et al., 2018). Ces deux ADC sont des ESAC et il est donc possible que le spectre d'action de ces enzymes sur les antibiotiques apporte un atout pour les souches cliniques.

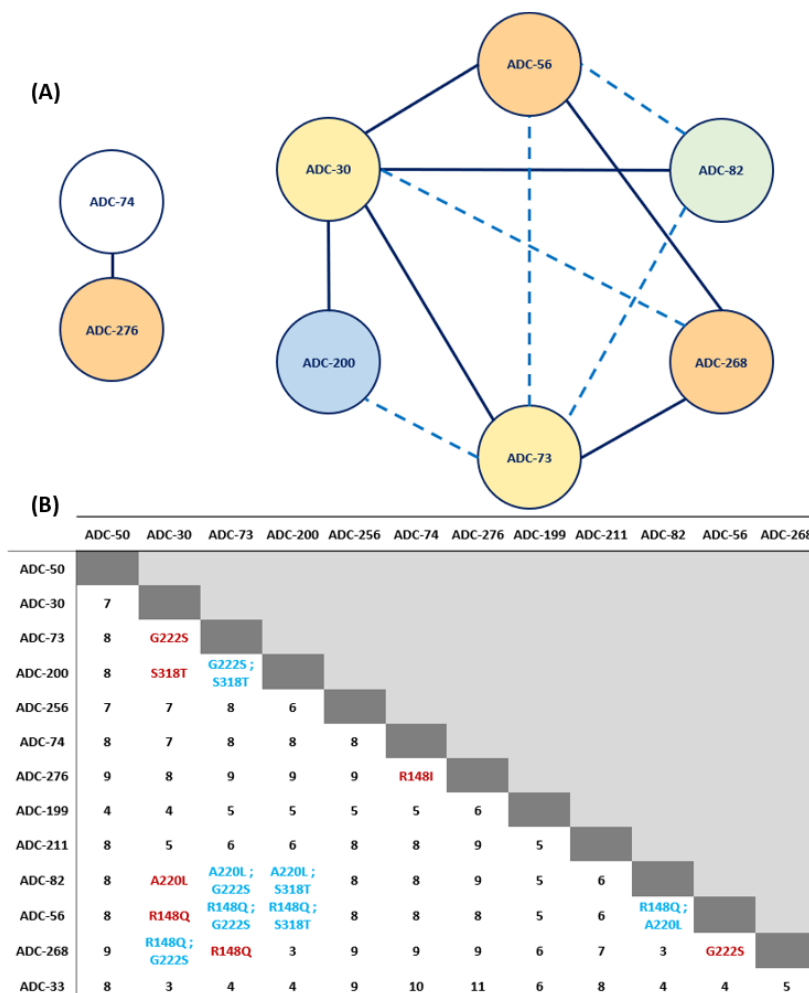


Figure 22 : Lien entre les différents variants ADC, dont les gènes ont été clonés. (A) Les traits pleins indiquent une substitution de différence, et les traits en pointillés 2 substitutions de différence. En orange : les variants avec un impact sur le céfidérol, en bleu avec un impact sur le méropénème, en vert sur la ticarcilline, et en jaune sur le céfépime, par rapport à ADC-50. (B) La matrice indique le nombre de substitution différenciant les variants entre eux. Les substitutions sont indiquées en rouge quand il n'y a qu'une différence entre variants et en bleu s'il y a deux substitutions d'écart.

Certains des variants étudiés au cours de ce travail sont couramment retrouvés dans les souches cliniques multi-résistantes comme les variants ADC-30, ADC-73, ADC-74 ou ADC-33 (Asrat et al., 2023; T. Chen et al., 2021; Findlay et al., 2022; Yang et al., 2018; Yusuf et al., 2022). Les variants ADC-82, ADC-211, ADC-199 et ADC-56 sont plus rares, mais parfois rencontrés dans les souches cliniques, alors que les variants ADC-200, ADC-256, ADC-268 et ADC-276 n'avaient jamais encore été décrits. Plusieurs souches ADC-200 ont été décrites dans ce travail, toutes clonales. Ces souches, responsables d'une

épidémie qui évolue depuis 2019, appartiennent au ST^{Pas}2, tout comme les souches possédant le variant ADC-30, dont ADC-200 ne diffère que par une seule substitution.

Au CNR-RA, 73 variants ADC différents ont été identifiés dans les souches dont le gène *bla*_{ADC} a été séquencé. Seulement 8 d'entre eux sont des variants ponctuels d'ADC-30 et 5 diffèrent de ce dernier par 2 substitutions. Les autres variants sont assez différents et ne semblent pas dériver d'un variant particulier (**Figure 23**).

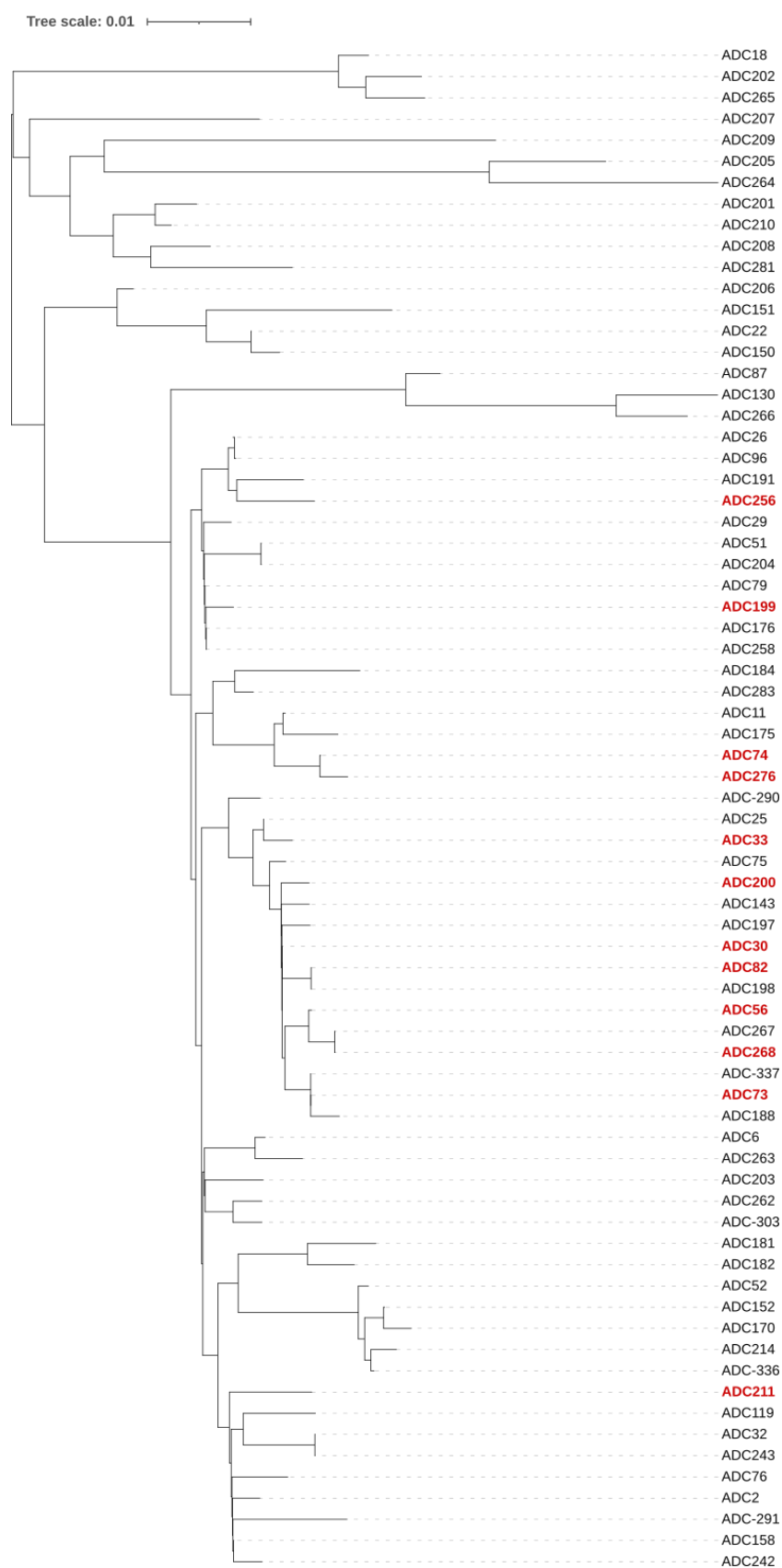


Figure 23 : Arbre comparant les différents variants de l'enzyme ADC identifiés dans les souches cliniques reçues au CNR-RA. Les variants indiqués en rouge sont ceux qui ont été clonés au cours de cette étude. L'arbre a été réalisé en se basant sur la méthode des distances séparant les ADC avec le logiciel Seaview (Gouy et al., 2010). La visualisation a été réalisée avec ItoI (Letunic & Bork, 2021).

II. Obtention de mutants et modification des PLPs

Quatorze mutants résistants au céfidérocol (CMI > 4 µg/ml) obtenus à partir de milieux supplémentés avec des concentrations de ceftazidime, céfépime ou céfidérocol d'au moins 4 fois celle de la souche de départ CIP70.10 ont été caractérisés dans ce travail. La sélection des mutants résistants s'est avérée aisée pour tous ces antibiotiques. Les fréquences d'obtention des mutants obtenus étaient variables mais proches, avec des taux de l'ordre de 10^{-6} sur céfépime et céfidérocol et de 10^{-7} sur ceftazidime. Dans leur étude, Ito et collègues ont obtenu des mutants de *P. aeruginosa* sur des milieux gélosés (MHA) contenant du céfidérocol ou de la ceftazidime (Ito et al., 2016). La sélection à partir d'un milieu contenant une concentration 4 fois supérieure à la CMI de la souche de référence de *P. aeruginosa* (PAO1) a montré une fréquence de sélection des mutants plus faible pour le céfidérocol ($2,9 \cdot 10^{-8}$) que la ceftazidime ($3,1 \cdot 10^{-7}$), contrairement à ce que nous avons observé pour nos mutants ($2,3 \cdot 10^{-6}$ versus $4,1 \cdot 10^{-7}$). Les auteurs ont également tenté d'obtenir des mutants sur des milieux contenant des concentrations d'antibiotiques 10 fois supérieures à la CMI de la souche de départ. Bien que des mutants aient été obtenus sur ceftazidime, le taux de mutants obtenus sur céfidérocol était trop faible pour être déterminé correctement. Il conviendrait de multiplier le nombre de sélections de mutants ainsi que de diversifier les souches utilisées, afin de pouvoir confirmer ou non cette différence observée chez *P. aeruginosa* et chez *A. baumannii*.

A noter qu'aucun mutant n'a été sélectionné sur imipénème, quelle que soit la concentration utilisée. Le mécanisme intrinsèque principal associé à une baisse de sensibilité aux carbapénèmes chez *A. baumannii* est la surproduction de l'oxacillinase naturelle, secondaire à l'insertion d'une séquence d'insertion (de type IS_{Aba1} dans la plupart des cas) en amont du gène correspondant. La souche que nous avons choisie pour obtenir les mutants résistants aux carbapénèmes, *A. baumannii* CIP70.10, possède des IS (notamment IS_{Aba22} et IS_{Aba21}, d'après ISfinder, <https://www-is.biotoul.fr/index.php>), mais aucune n'est connue pour pouvoir venir s'insérer en amont du gène codant l'oxacillinase naturelle. Ainsi il est possible que l'un des seuls moyens pour sélectionner des mutants avec une perte de sensibilité aux carbapénèmes sur des concentrations élevées (4 à 16 fois la CMI de la souche de départ) soit ce mécanisme d'insertion d'IS, mais que seules certaines soient en mesure de venir s'insérer en amont du gène codant l'oxacillinase naturelle. La sélection de mutants ADC (soit par surproduction avec insertion d'une IS, soit par des mutations dans le gène) n'a pas non plus été constatée. Il est possible que la surproduction médiée par une IS spécifique soit requise (IS_{Aba1} ou IS_{Aba125}) (Hamidian et al., 2013; Hamidian & Hall, 2014). La surproduction d'ADC semble indispensable pour atteindre des niveaux de résistance significatifs et il est probable qu'une enzyme avec un spectre élargi, mais non surproduite, ne permette pas de conférer une perte de sensibilité significative. Il aurait été intéressant de réaliser le clonage d'un variant présentant un phénotype ESAC

sous l'expression du promoteur naturel du gène *bla_{ADC}* afin de vérifier le phénotype conféré dans ces conditions.

L'analyse des génomes de certains mutants résistants au céfidérocol n'a pas permis de mettre en évidence de mutation chez ceux-ci par comparaison à la souche parentale. L'absence de variation peut s'expliquer par l'usage de filtres trop stricts, excluant ainsi certains résultats. Ainsi seules les mutations détectées dans au moins 80 % des *reads* alignés, avec un minimum de 10 *reads* ont été pris en compte. Une analyse complémentaire avec un seuil plus faible (mutation présente sur 45 % des *reads* alignés) a aussi été réalisée, sans identifier d'autre mutation. Cela aurait permis de détecter des mutations dans des gènes dupliqués. L'utilisation de filtres plus amples risquait à l'inverse de mettre en avant des artefacts, imputables à une qualité de séquençage trop faible, et le choix des paramètres s'est donc fait en prenant cet aspect en compte. L'analyse s'est également basée sur la comparaison de SNPs, et des insertions, délétions ou duplications de gènes peuvent s'être produites sans que l'analyse ne les ait détectées.

Il est également possible qu'une résistance transitoire se soit mise en place et que cette dernière ne dépende ainsi pas de mutations mais d'autres mécanismes. De plus, une hétérorésistance au céfidérocol est couramment observée chez *A. baumannii*, définie comme la présence d'une sous-population résistante au sein d'une population plus large, qui elle conserve une sensibilité au céfidérocol (Stracquadanio et al., 2022). Ce mécanisme, encore mal connu, pourrait aussi contribuer à des phénotypes particuliers sans toutefois parvenir à identifier un événement génétique précis. Une analyse du profil des populations (*population analyse profil*, PAP) peut être réalisée pour confirmer l'hétérorésistance. Toutefois, la vérification de la stabilité de la résistance au céfidérocol pour nos mutants a été effectuée par repiquage sur MH puis MH contenant du céfidérocol et devrait permettre de limiter la sélection de telles populations. Une analyse approfondie des phénotypes et génotypes pourrait être intéressante, mais n'a pu être réalisée au cours de ce travail.

La littérature rapporte en général que la surproduction des systèmes d'efflux, notamment AdeABC et AdeM chez *A. baumannii*, ne permet pas à la bactérie d'acquérir une perte de sensibilité au céfidérocol (Iregui et al., 2020; Soriano & Mensa, 2022). La détermination de la CMI du céfidérocol au laboratoire sur des mutants de la souche BM4587 surproduisant les systèmes d'efflux AdeABC, AdeIJK ou AdeFGH (décrits par (Yoon et al., 2015)) n'a pas permis d'observer une différence de sensibilité entre les mutants et la souche de départ BM4587 (résultats non présentés dans ce travail). Cependant, l'obtention du mutant FEP16.053 semble à l'opposé de ces données. En effet, ce dernier présentait une substitution dans le régulateur de réponse AdeR (I27M) du système à deux composants AdeS-AdeR, qui régule l'opéron codant le système d'efflux actif de type RND, AdeABC (Yoon et al., 2015). Cette substitution se trouve plus précisément dans le domaine receveur de AdeR, qui sert à la phosphorylation et donc à l'activation du régulateur (Wen et al., 2017). De manière intéressante, ce

mutant présentait une baisse de la sensibilité aux antibiotiques substrat de la pompe AdeABC, tels que la ceftazidime et le céfépime (Yoon et al., 2015). De plus, le mutant FEP16.053 présentait une augmentation de la CMI du céfidérol par un facteur 8 par rapport à la souche parentale. Ainsi, la surproduction de ce système d'efflux n'entraîne pas de phénotype identique dans toutes les souches. La souche utilisée initialement pour l'étude de la sensibilité au céfidérol de souches surproduisant des systèmes d'efflux était la souche BM4689, également mutée dans AdeR (A91V) au niveau du domaine receveur et surproduisait AdeABC. Il est possible que d'autres événements génétiques (indels, déplacements d'IS) aient eu lieu dans notre mutant, sans que l'analyse n'ait pu les mettre en évidence. Il se peut aussi que le fond génétique de la souche soit un facteur important. Il est notamment possible que les souches ne possèdent pas la même perméabilité membranaire. Ainsi, l'entrée des antibiotiques, dont le céfidérol, pourrait être réduite et le peu de molécules pouvant pénétrer dans la bactérie serait efflué. Si la souche était plus perméable, une proportion plus importante d'antibiotique pourrait entrer dans la bactérie et l'efflux non suffisant pour compenser, n'entraînant alors pas de conséquence sur le phénotype. Il serait intéressant de comparer la sensibilité de ces souches à d'autres molécules, dont l'activité varie en fonction de la perméabilité membranaire.

Au vu des résultats, les mutations dans AdeR sont probablement des mutations permettant un gain de fonction, en accord avec ce qui est décrit par Marchand et collègues (Marchand et al., 2004). Il est donc possible que le niveau d'activation soit différent en fonction de la mutation, et plus ou moins efficace dans la surproduction des systèmes d'efflux. Il a déjà été rapporté dans la littérature que des mutations gain de fonction pouvaient en effet conférer des phénotypes différents en fonction de la mutation impliquée, comme pour les mutations retrouvées dans *pmrB*, le senseur du système à deux composantes PmrA-PmrB, impliqué dans la résistance à la colistine notamment chez *P. aeruginosa* (Moskowitz et al., 2012). Ainsi il pourrait être intéressant de comparer si une corrélation existe entre le niveau d'expression des systèmes d'efflux et la perte de sensibilité au céfidérol des souches, et si les différentes substitutions retrouvées dans AdeR jouent sur ce niveau d'expression.

Par ailleurs, dans ce travail, deux mutants étaient mutés dans le gène codant BaeS (conduisant à la substitution R475C) ou dans la région intergénique en amont. Cette protéine appartient au système à deux composantes BaeS-BaeR. Ce dernier interviendrait notamment dans la réponse au stress osmotique, comme le suggèrent les résultats d'une étude démontrant la surexpression des gènes codant BaeS et BaeR en milieu riche en sucrose (Lin et al., 2014). Ce système à deux composantes intervient dans la régulation des gènes d'efflux *adeA* et *adeB*, mais a aussi un rôle dans la régulation des systèmes d'efflux AdeIJK et MacAB-TolC (Lin et al., 2014, 2015). L'impact des mutations retrouvées dans *baeS* ou *baeR* sur la baisse de sensibilité du céfidérol chez *A. baumannii* a récemment été rapporté (Liu et al., 2023). Des mutants obtenus *in vitro* présentaient une substitution dans le senseur BaeS (A71T, D89V, G212D, D360N) ou dans le régulateur de réponse BaeR (S104N) aboutissant à une

activation du système à deux composantes BaeS-BaeR. Les auteurs suggèrent que ces modifications conduisent à une diminution de sensibilité du céfidérol via la surproduction des systèmes d'efflux AdeABC, AdeIJK et MacAB-TolC. Pour évaluer l'implication des mutations identifiées chez nos deux mutants, la détermination du niveau d'expression de ces mêmes systèmes d'efflux serait nécessaire.

Un autre de nos mutants était affecté dans le gène codant TonB3. Cette protéine apporte l'énergie nécessaire aux transporteurs intervenant dans la prise en charge du fer en formant un complexe avec deux autres protéines, ExbB et ExbD. Il n'est donc pas étonnant d'observer une perte de sensibilité au céfidérol, sans que celle-ci ne soit croisée à d'autres antibiotiques. Un lien entre des mutations dans le gène codant TonB3 et des souches résistantes au céfidérol a déjà été observé. Ainsi, Asrat et collègues ont décrit 14 souches cliniques résistantes mutées dans TonB3 (entraînant la substitution T226S) (Asrat et al., 2023). Une autre étude a aussi décrit l'insertion d'une IS au niveau du codon stop de *tonB3*, conduisant à une diminution d'expression des gènes codant ExbB et ExbD d'un facteur 20 (Gill et al., 2022). Dans ce travail de thèse, l'insertion d'une base dans le gène *tonB3* du mutant FDC8.119 a conduit à un *frameshift*. De manière intéressante, plusieurs tentatives infructueuses de réisolement de ce mutant après conservation standard (milieu cœur-cerveille glycérolé, -80°C) soulèvent l'hypothèse d'une perte de fitness de ce mutant, suggérant que l'altération de TonB3 ne soit pas avantageuse.

Toujours en lien avec la prise en charge du fer, des études visant l'obtention de mutants sur géloses contenant des combinaisons antibiotique-sidérophores ont déjà été menées. Chez *P. aeruginosa*, des mutants avaient été obtenus sur gélose contenant le composé SMC-3176, un monocarbame couplé à un sidérophore (A. Kim et al., 2015). Les génomes de dix d'entre eux ont été analysés, et tous montraient des altérations des systèmes de transport du fer. Les CMI de composés couplés à des sidérophores étaient toujours plus importantes pour ces mutants, mais en revanche aucun impact n'était observé sur les autres molécules, démontrant la spécificité de ce mécanisme de résistance. Aucun de ces mutants ne présentait d'altération dans TonB3 ou dans d'autres protéines fournissant l'énergie aux transporteurs du fer. Il a également été constaté que, dans des souches de *A. baumannii* résistantes aux carbapénèmes et productrices de PER-1, l'expression des gènes en lien avec les transporteurs du fer (*fiu*, *feoA*, *feoB*, *tonB3*, and *exbB*) était diminuée de manière significative dans les souches résistantes au céfidérol par rapport à celles qui étaient toujours sensibles (He et al., 2022). L'importance de certains de ces transporteurs du fer dans le développement de la résistance au céfidérol chez *A. baumannii* est maintenant bien décrite. Il s'agit des transporteurs PirA et PiuA, dont la délétion ou une diminution de leur expression entraîne une perte de sensibilité au céfidérol (Asrat et al., 2023; He et al., 2022).

Ainsi, même si certains mécanismes ont pu être mis en évidence, il est fort probable que d'autres ne soient pas encore connus. *A. baumannii* posséderait entre 21 et 27 récepteurs dépendant de TonB

([Moynié et al., 2017](#)) et tous ne sont pas encore bien décrits. La baisse d'expression de *piuA* et *pirA* étant décrite pour contribuer à la perte de sensibilité au céfidérocol, il pourrait être intéressant de savoir si une régulation compensatoire existe entre les transporteurs du fer.

Au cours de notre étude, nous avons obtenu un mutant avec deux mutations : une en amont de la PLP2 et l'autre dans le gène codant le transporteur PirA. Comme la construction PrIS - PLP2 montrait une valeur de CMI du céfidérocol moins importante que dans le cas du clonage de PrIS - PLP1b (CMI de 1 µg/ml contre 8 µg/ml respectivement), il est possible que l'accumulation des deux mécanismes, dans ce cas une possible surexpression de la PLP2 en association à une altération de PirA, soit nécessaire pour conférer un phénotype suffisamment résistant au céfidérocol permettant la sélection du mutant.

Enfin, il a été proposé dans diverses études que des mutations dans le gène codant la PLP3 pourraient contribuer à la perte de sensibilité au céfidérocol ([He et al., 2022](#)). Nos travaux ne nous ont pas permis de sélectionner de mutants impactés dans la PLP3, mais en revanche, il semble que les PLP1b et PLP2 puissent contribuer à la perte de sensibilité au céfidérocol, au travers de mécanismes qui restent toutefois à élucider.

Une hausse de CMI du céfidérocol a en effet été observée dans la souche dans laquelle le gène codant la PLP1b mutée a été cloné (R363S). La même construction avec le gène sauvage présentait des CMIs beaucoup plus basses (8 µg/ml contre 0,125 µg/ml), démontrant que ce n'est pas l'apport du plasmide avec le gène codant la PLP1b qui a contribué à la hausse de la CMI mais bien la substitution. Ainsi, ces résultats pourraient suggérer que la PLP1b est une cible du céfidérocol. Chez *A. baumannii*, l'affinité du céfidérocol pour les différentes PLPs a été déterminée et l'affinité était meilleure pour la PLP3, suivi de la PLP1, avec une affinité 1,6 fois moins importante, mais qui pourrait tout de même expliquer les résultats observés ([Ito et al., 2018](#)). Des expériences de compétition utilisant la bocillin-FL, une pénicilline marquée fluorescente, pourraient être réalisées afin de vérifier si l'affinité avec les PLPs mutées est effectivement impactée dans les cas des PLPs mutées.

La PLP2 présentait aussi une affinité pour le céfidérocol, mais presque 3,6 fois moindre que pour la PLP3. Il ne faut toutefois pas exclure la possibilité qu'une régulation croisée des PLP puisse aussi intervenir et ainsi contribuer également à la perte de sensibilité observée.

Les deux constructions permettant normalement la surproduction de la PLP1b et de la PLP2 (PrIs) ont aussi montré une hausse des CMIs du céfidérocol, avec un impact plus important dans le cas de la surproduction supposée de la PLP1b. Comme une affinité du céfidérocol existe pour ces deux PLPs, il est possible que la surproduction de celles-ci rende les concentrations d'antibiotique limitantes. Ainsi, ce dernier ne serait pas en mesure d'inhiber la totalité des PLPs, qui pourraient continuer à exercer leur rôle structurel et assurer la survie cellulaire.

Une autre possibilité est qu'une régulation compensatoire des PLPs se mette en place. Il est ainsi possible qu'en condition de surproduction des PLP1b et PLP2, la PLP3 soit quant à elle moins produite par la bactérie, et que sa fonction soit compensée en partie par les autres PLPs. Si la PLP3, étant la cible principale supposée du céfidérol, est moins produite que les autres PLPs, qui elles-mêmes ont moins d'affinité pour le céfidérol, il est possible que la bactérie arrive à survivre et présente une sensibilité réduite au céfidérol. Les expérimentations de RTqPCR n'ont pas permis de confirmer cette hypothèse, mais une analyse plus aboutie devrait être réalisée.

La surproduction supposée de la PLP3 n'a pas entraîné de hausse de CMI du céfidérol. Comme il l'a été évoqué précédemment, si la PLP3 se trouve en concentration trop importante pour la cellule, elle peut être toxique (K. Kang & Boll, 2022). Il est possible que, comme l'hypothèse proposée précédemment avec les PLP1b et PLP2, une production importante de PLP3 mette l'antibiotique en condition de concentration limitante. Or, une production trop importante de PLP3 étant néfaste pour la survie bactérienne, il faut parvenir à un équilibre entre une production suffisante pour conférer une perte de sensibilité, sans atteindre des niveaux toxiques pour la bactérie.

Des expériences de RTqPCR sont prévues pour mieux comprendre la régulation, peut-être croisée, des PLPs et essayer de mieux comprendre les résultats obtenus.

Le mutant FEP32.042 présentait quant à lui une mutation dans le gène codant AbrP, une protéine appartenant à la famille des peptidases C13. Un lien a déjà été établi entre la hausse de sensibilité à la tétracycline, la tigécycline, le chloramphénicol et la fosfomycine et la présence de la protéine en comparaison à des mutants de délétion (X. Li et al., 2016). De plus, une souche mutée à la fois dans le gène codant la PLP3 et présentant un *frameshift* dans le gène codant AbrP était résistante au sulbactam (Penwell et al., 2015). Bien que le sulbactam cible la PLP3 et que la mutation dans cette dernière pourrait expliquer la résistance observée, il serait intéressant de vérifier si AbrP peut également contribuer à la résistance aux β -lactamines, dont le céfidérol, chez *A. baumannii*.

Les mutants ont été sélectionnés à partir d'une seule souche CIP70.10, mais il est tout à fait probable que les mutations sélectionnées soient différentes dans un autre fond génétique. Il serait donc intéressant de réaliser ces mêmes expériences avec d'autres souches, notamment cliniques, afin de mettre en évidence les mécanismes de résistance au céfidérol communs entre différentes souches.

III. Rôle des enzymes de type NDM dans la résistance au céfidérocol

La dernière partie de ce travail était consacrée à l'étude de l'impact des enzymes de type NDM, et plus particulièrement NDM-1 et NDM-9, dans la diminution de la sensibilité au céfidérocol.

En plus de confirmer que ces enzymes peuvent contribuer à une perte de sensibilité du céfidérocol, la comparaison de ces deux variants est intéressante et met en évidence l'importance de la substitution E152K. Les gènes codant d'autres variants NDM, possédant la substitution M154L, ont été clonés au laboratoire. Cette substitution étant proche de celle identifiée dans NDM-9, il était intéressant de comparer leur impact sur la diminution de sensibilité au céfidérocol. Après le clonage des gènes codant les variants NDM-4 (M154L par rapport à NDM-1), NDM-5 (M154L et V88I) et NDM-7 (M154L et D130N), les CMI du céfidérocol ont été déterminées, et tous les variants présentaient des CMI > 64 µg/ml, alors qu'elle était de 4 µg/ml pour le transformant produisant NDM-1. Comme le variant NDM-4 ne se différencie du variant NDM-1 que par la substitution M154L, il est possible de dire que cette mutation, comme E152K, semble impacter fortement la sensibilité au céfidérocol. Les paramètres enzymatiques n'ont toutefois pas été obtenus pour ces trois variants, car leur étude a été réalisée après celle de NDM-1 et NDM-9.

Sur les 55 variants NDM décrits, 30 possèdent la substitution M154L en comparaison à NDM-1, et deux autres sont aussi mutés à cette position avec chacun la substitution M154A ou M154V. Il semblerait que la CMI du céfépime soit plus élevée pour les variants portant la substitution M154L que pour les autres variants ([Cheng et al., 2018](#)). La souche produisant NDM-11 (M154V) présentait une CMI du céfépime inférieure à celle de NDM-1. Ainsi ce résidu semble important dans le spectre de l'enzyme, pouvant augmenter ou réduire la sensibilité de la souche productrice au céfépime en fonction des résidus impliqués. Il est donc possible que la sensibilité au céfidérocol soit également impactée.

Chez les bacilles à Gram négatif, le variant NDM le plus courant est NDM-1, mais les variants NDM-5 et NDM-7 sont également de plus en plus prévalents chez les entérobactéries ([Jousset et al., 2023](#); [Rahman et al., 2014](#)). Par rapport aux résultats obtenus, il semblerait cohérent que les souches productrices de ces variants soient résistantes au céfidérocol. Toutefois, plusieurs études ont démontré que la production de NDM-5 ou NDM-7 ne semblait pas toujours conférer des très hauts niveaux de résistance au céfidérocol chez les entérobactéries ([Bonnin et al., 2022](#); [Jousset et al., 2023](#); [X. Wang et al., 2014](#)). Il semblerait que ce soit surtout la combinaison de mécanismes qui permette une augmentation significative des CMI. En effet, des souches résistantes au céfidérocol, productrices de NDM-5 et présentant au moins une mutation dans CirA, un transporteur du fer, ont été caractérisées ([Q. Wang et al., 2022](#)). Une autre étude a constaté le même phénomène dans des

souches d'entérobactéries productrices de NDM-5 et présentant des altérations dans les transporteurs du fer (FepA, PcnB, CirA, Fiu, FhuA, FfcA) ou dans BaeS (Jousset et al., 2023). L'imperméabilité des souches pourrait aussi être un facteur important, comme le montrent les résultats obtenus chez *A. baumannii*, pour lequel les CMI du céfidérocol augmentent de manière importante quand les souches produisent des variants NDM tel que NDM-9, NDM-4 ou NDM-5, alors que l'augmentation des CMI du céfidérocol est beaucoup plus modeste chez les entérobactéries et dont l'imperméabilité est plus faible (Jousset et al., 2023).

En plus de la production d'enzymes de type NDM, les enzymes de type PER seraient également impliquées dans la diminution de sensibilité au céfidérocol des souches de *A. baumannii*. Il semblerait également que des CMI du céfidérocol plus importantes soient observées pour les souches productrices de SHV (Asrat et al., 2023; He et al., 2022; Iregui et al., 2020; Mushtaq et al., 2020; Poirel et al., 2021). Chez *Enterobacter cloacae*, la production de VIM-1 réduit la sensibilité au céfidérocol, et cela est encore plus marqué si la souche produit le variant SHV-12 ou si le transporteur du fer FcuA est inactif (Lasarte et al., 2023). Chez les entérobactéries principalement, les enzymes de type KPC semble aussi contribuer à la diminution de sensibilité au céfidérocol (Hobson et al., 2021). Le rôle de certaines oxacillinases dans la diminution de sensibilité au céfidérocol a été mis en évidence chez *P. aeruginosa* par Vuillemin et collègues (Vuillemin et al., 2023). Ainsi, des enzymes appartenant au sous-groupe des oxacillinases OXA-2 (OXA-15 (D150G) et OXA-737 (A149P)), au sous-groupe des oxacillinases OXA-10 (OXA-14, OXA-19 et OXA-794) et enfin OXA-836, un variant de l'OXA-17, entraînaient une perte de sensibilité au céfidérocol. De manière intéressante, les substitutions des enzymes du sous groupe sous-groupe OXA-2 se trouvaient dans l' Ω -loop.

Le tableau 15 synthétise l'ensemble des mécanismes décrits dans ce travail ou dans la littérature pour contribuer à la diminution de sensibilité au céfidérocol chez *A. baumannii* (Tableau 15).

Tableau 15 : Mécanismes décrits dans la littérature et dans cette étude contribuant à la baisse de sensibilité du céfidérocol chez *A. baumannii*.

Mécanisme	Précision	Références
<i>Efflux</i>		
AdeR	Régulateur du système d'efflux AdeABC	Cette étude
BaeSR	Gain de fonction	Cette étude ; (Liu et al., 2023)
<i>Imperméabilité</i>		
PirA	Inactivation ou expression plus faible	(Asrat et al., 2023; He et al., 2022)
PiuA	Inactivation ou expression plus faible	(Asrat et al., 2023; He et al., 2022)
TonB3	Inactivation	Cette étude, (Asrat et al., 2023; Stracquadanio et al., 2022)
ExbB, ExbD	Insertion d'une IS en amont (dans <i>tonB3</i>) et expression diminuée	(Gill et al., 2022)
<i>Inactivation</i>		
NDM	Résistance accrue si E152K et M154L	(Gaillot et al., 2023; Poirel et al., 2021)
ADC	R148Q/I (ADC-56, -144, -177, -261, -267, -268, /ADC-276) ADC-33, ADC-25	Cette étude, (Asrat et al., 2023)
PER		(Poirel et al., 2021)
SHV	Résistance accrue pour SHV-15	(Asrat et al., 2023)
<i>Modification de cibles</i>		
PLP1b	Mécanisme précis à déterminer, modification d'expression et de cible	Cette étude
PLP2	Mécanisme précis à déterminer, modification d'expression	Cette étude
PLP3	Modification de cible	(He et al., 2022; Stracquadanio et al., 2022)

IV. Céfiderocol : bilan général de trois années d'utilisation au laboratoire

L'une des problématiques liée à l'étude de la sensibilité du céfiderocol est dans un premier temps la complexité de lecture des résultats de CMI notamment chez *A. baumannii* (Simner et al., 2023). En effet, contrairement à la lecture des CMI d'autres antibiotiques réalisées par la méthode de microdilution, celle du céfiderocol correspond à la concentration d'antibiotique où le culot bactérien fait moins de 1 mm par comparaison au témoin positif (au moins 2 mm) selon les recommandations de l'EUCAST (EUCAST, 2022). Les autres méthodes de détermination de la sensibilité du céfiderocol ne sont pas forcément fiables (Jeannot et al., 2023) (Annexe 4). L'utilisation de bandelettes imprégnées d'antibiotique doit être proscrite en raison de la sous-estimation des niveaux de résistance, amenant à catégoriser les souches résistantes comme sensibles au céfiderocol. Les disques d'antibiotiques peuvent être utilisés comme outil de screening des souches sensibles, en utilisant un diamètre ≥ 22 mm. Une autre technique doit être réalisée pour tout diamètre < 22 mm. Les méthodes de microdilution commercialisées (UMIC, Com-ASP) présentent un accord de catégorisation $> 90\%$ par rapport à la technique de référence, autorisant leur utilisation (Jeannot et al., 2023). Finalement, la détermination des CMI par méthode de microdilution selon les recommandations du CLSI reste le *gold-standard*, mais les microbiologistes doivent être vigilants quant aux résultats. Afin d'approcher au mieux la valeur de la CMI, une double voire triple détermination est souvent nécessaire (Jeannot et al., 2023; Simner et al., 2023).

D'un point de vue clinique, les études s'intéressant à l'efficacité du céfiderocol présentent des résultats contrastés. Certaines études montrent des résultats plutôt encourageants dans le traitement des infections provoquées par des CRAB chez des patients pour lesquels peu d'autres options thérapeutiques sont disponibles (Karruli et al., 2023; Kollef et al., 2023). D'autres mettent en évidence un taux de mortalité plus élevé chez les patients ayant été traités avec du céfiderocol que pour ceux ayant reçu un traitement différent, le plus souvent basé sur les polymyxines (Shields et al., 2023). Ces résultats sont toutefois à interpréter avec prudence. En effet, pour la plupart, les patients traités par céfiderocol étaient plus souvent hospitalisés en unités de soins intensifs et présentaient plus fréquemment un choc septique.

Bien qu'elle reste rarement décrite, la sélection de souches résistantes *in vivo* après traitement a déjà été observée (Gill et al., 2022). Face à ces données contrastées et pour limiter la sélection de souches résistantes, l'utilisation du céfiderocol n'est recommandée qu'en absence d'autre alternative et en association (Paul et al., 2022; Shields et al., 2023; Tamma et al., 2023). Quelques études se sont intéressées à l'efficacité de certaines associations *in vitro*. La combinaison avec le sulbactam paraît être efficace, mais dans certaines souches uniquement (Stracquadanio et al., 2022). Utilisé avec

l'avibactam, le céfidérocol semble également conférer une meilleure efficacité sur des souches productrices d'enzyme de type PER résistantes au céfidérocol ([Poirel et al., 2021](#)).

Lors de sa mise sur le marché en 2020, le céfidérocol était une molécule prometteuse, mais les données obtenues au cours de ces trois dernières années concernant son efficacité sont contrastées, et il est donc indispensable d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la résistance pour mieux comprendre ces observations.

Conclusion

Depuis maintenant plusieurs décennies, la résistance aux antibiotiques s'avère problématique avec des conséquences humaines et économiques. Si aucune mesure n'est entreprise, les infections bactériennes graves pourraient redevenir, en 2050, une des premières causes de mortalité dans le monde, en provoquant jusqu'à 10 millions de morts ([O'Neill, 2016](#)). Certaines bactéries sont considérées comme plus menaçantes que d'autres selon l'OMS. Ainsi les souches de *A. baumannii*, et en particulier celles qui sont résistantes aux carbapénèmes, sont considérées comme une menace pour la santé publique. Face à des souches résistantes à la quasi-totalité des molécules disponibles, de nouvelles options thérapeutiques semblent indispensables. Plusieurs nouvelles associations β -lactamines/inhibiteurs de β -lactamases ont récemment été mises sur le marché mais sans efficacité notable sur *A. baumannii*. Parmi les nouvelles molécules, le céfidérol possède une activité sur une grande proportion de souches déjà résistantes aux autres antibiotiques, mais des souches résistantes, notamment de *A. baumannii*, ont déjà été identifiées et il est probable que la proportion de ces souches augmente encore avec le temps. Ce travail a mis en évidence que la résistance au céfidérol pouvait être transférable mais également intrinsèque, par l'apparition de mutations dans des gènes codant des protéines variées. L'accumulation de différents mécanismes permet d'atteindre des niveaux de résistance significatifs.

Ainsi, même avec l'arrivée du céfidérol, les antibiotiques de derniers recours conservant une activité sur la plupart des souches, comme la colistine, restent des options thérapeutiques utiles et incontournables.

Matériel et Méthodes

I. Techniques de microbiologie

1. Souches et plasmides utilisés

Tableau 16 : Souches utilisées au cours de ce travail.

Espèce et nom	Description	Source
<i>E. coli</i>		
DH5α	Souche thermocompétente F- ϕ 80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-	Subcloning Efficiency™ DH5α™ (Invitrogen, St-Aubin, France)
DH5α - T1 ^R	Souche thermocompétente, résistante au phage T1	One Shot® MAX Efficiency® DH5α - T1 ^R (Invitrogen)
BL21	Cellules permettant l'expression inducible de gènes hétérologues non toxiques par induction à l'IPTG F- <i>ompT</i> <i>HSDS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ , <i>m_B</i> ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	(Novagen, Fontenay-sous-Bois, France)
BL21 Rosetta-gami	Cellules permettant l'expression inducible de gènes hétérologues non toxiques par induction à l'IPTG F- <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> ⁻ <i>m_B</i> ⁻) <i>gal dcm lacY1 ahpC</i> (DE3) <i>gor522::Tn10 trxB</i> pRARE (Cam ^R , Kan ^R , Tet ^R)	(Novagen, Fontenay-sous-Bois, France)
<i>A. baumannii</i>		
CIP7010	Souche sauvage	Institut Pasteur (ATCC 15151)
CIPΔADC	Souche CIP 70.10 délétée du gène <i>bla_{ADC}</i>	Ce travail
BM4587	Souche sauvage	(Coyne et al., 2010)
BM4666	Mutant d'efflux obtenu à partir de BM4587 surexprimant <i>adeIJK</i>	(Coyne et al., 2010)
BM4689	Mutant d'efflux obtenu à partir de BM4587 surexprimant <i>adeABC</i>	(Yoon et al., 2015)
Mutants		
CAZ16.001	Mutant de la CIP70.10 sélectionné sur ceftazidime (16 µg/ml)	Ce travail
CAZ64.009	Mutant de la CIP70.10 sélectionné sur ceftazidime (64 µg/ml)	Ce travail
CAZ16.022	Mutant de la CIP70.10 sélectionné sur ceftazidime (16 µg/ml)	Ce travail

CAZ32.027	Mutant de la CIP70.10 sélectionné sur ceftazidime (32 µg/ml)	Ce travail
CAZ32.028	Mutant de la CIP70.10 sélectionné sur ceftazidime (32 µg/ml)	Ce travail
FEP32.042	Mutant de la CIP70.10 sélectionné sur céfépime (32 µg/ml)	Ce travail
FEP16.051	Mutant de la CIP70.10 sélectionné sur céfépime (16 µg/ml)	Ce travail
FEP16.053	Mutant de la CIP70.10 sélectionné sur céfépime (16 µg/ml)	Ce travail
FEP64.078	Mutant de la CIP70.10 sélectionné sur céfépime (64 µg/ml)	Ce travail
FDC2.079	Mutant de la CIP70.10 sélectionné sur céfidérol (2 µg/ml)	Ce travail
FDC4.098	Mutant de la CIP70.10 sélectionné sur céfidérol (4 µg/ml)	Ce travail
FDC16.107	Mutant de la CIP70.10 sélectionné sur céfidérol (16 µg/ml)	Ce travail
FDC4.112	Mutant de la CIP70.10 sélectionné sur céfidérol (4 µg/ml)	Ce travail
FDC8.119	Mutant de la CIP70.10 sélectionné sur céfidérol (8 µg/ml)	Ce travail
Souches cliniques		
12A013	Clonage du gène <i>bla</i> _{ADC-30}	CNR-RA
12A229	Clonage du gène <i>bla</i> _{ADC-211}	CNR-RA
14A544	Clonage du gène <i>bla</i> _{ADC-33}	CNR-RA
18A2117	Clonage du gène <i>bla</i> _{ADC-199}	CNR-RA
19A2582	Clonage du gène <i>bla</i> _{ADC-82}	CNR-RA
19A2691	Clonage du gène <i>bla</i> _{ADC-200}	CNR-RA
19A2740	Clonage du gène <i>bla</i> _{ADC-56}	CNR-RA
20A3025	Clonage du gène <i>bla</i> _{ADC-256}	CNR-RA
21A3182	Clonage du gène <i>bla</i> _{ADC-73}	CNR-RA
21A3219	Clonage du gène <i>bla</i> _{ADC-261}	CNR-RA
21A3217	Clonage du gène <i>bla</i> _{ADC-268}	CNR-RA
18A2228	Clonage du gène <i>bla</i> _{ADC-74}	CNR-RA
22A3312	Clonage du gène <i>bla</i> _{ADC-276}	CNR-RA
13A297	Clonage du gène <i>bla</i> _{NDM-9}	CNR-RA
19A2597	Clonage du gène <i>bla</i> _{NDM-1}	CNR-RA
<i>P. aeruginosa</i>		
CIP 76 110	Souche de référence pour la détermination des CMI's du céfidérol	(Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, 2023)
21.8570	Souche utilisée comme standard pour la détermination des CMI's du céfidérol	CNR-RA

Tableau 17 : Plasmides utilisés au cours de ce travail.

Nom	Description	Antibiotique de sélection (µg/ml)	Source
pWH1266	Plasmide de clonage réplcatif chez <i>Acinetobacter</i> . Possède deux origines de réplcation (une pour <i>E. coli</i> et l'autre pour <i>A. baumannii</i>).	Ticarcilline 20 (<i>E. coli</i>) et 50 (<i>A. baumannii</i>) (gène <i>bla_{TEM}</i>)	(Hunger et al., 1990)
pABEC	pCR-Blunt II TOPO dans lequel l'origine de réplcation de <i>Acinetobacter</i> du pWH1266 a été clonée (gène <i>ori</i>)	Kanamycine 15 (<i>E. coli</i>) Kanamycine 25 (<i>A. baumannii</i>)	pCR™-Blunt II-TOPO™ Vector (Invitrogen) ; clonage de l'origine de réplcation de <i>A. baumannii</i> d'après Tietgen et al. 2019 (Tietgen et al., 2019; Vuillemenot et al., 2022)
pMHL-2	Vecteur suicide contenant le gène <i>sacB</i> codant la protéine du même nom. Capable de se répliquer chez <i>E. coli</i> mais pas chez <i>A. baumannii</i> .	Apramycine 8 ou ticarcilline 20 (<i>E. coli</i>) Apramycine 20 ou ticarcilline 50 (<i>A. baumannii</i>) (gènes <i>acc(3)IV</i> et <i>bla_{TEM}</i>)	(Godeux et al., 2018a)
pET41b	Vecteur d'expression inductible par IPTG. Code pour un HIS-tag, permettant la purification de protéines.	Kanamycine 15 (<i>E. coli</i>)	Invitrogen, Life Technologies, Cergy-Pontoise, France

2. Milieux de culture

Différents milieux ont été utilisés pour ces travaux. Le milieu Mueller-Hinton (MH), dont les concentrations en cations divalents Ca^{2+} et Mg^{2+} ont été calibrées (respectivement 20-25 µg/mL et 10-12,5 µg/mL) (Becton Dickinson, le Pont de Claix, France), a été utilisé pour les cultures bactériennes et les déterminations de sensibilité aux antibiotiques. Pour déterminer la sensibilité des souches au céfidérol, un milieu déplété en fer a été préparé selon les recommandations du CLSI. Du milieu MH a été déplété en fer grâce à la résine Chelex® 100 resin (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Dix grammes de cette résine ont été ajoutés pour 100 ml de milieu MH et l'ensemble a été maintenu sous agitation pendant une nuit. Après filtration (0,2 µm), les concentrations en ions calcium, magnésium et zinc ont été ajustées avec du chlorure de calcium (CaCl_2), du chlorure de magnésium (MgCl_2) et du sulfate de zinc (ZnSO_4) à des concentrations finales de $22,5 \pm 2,5$ µg/mL ; $11,25 \pm 1,25$ µg/mL et 10 µM (0,56 µg/mL ; de 0,5 à 1,0 µg/mL), respectivement. La concentration finale en fer du milieu obtenu était $\leq 0,03$ µg/mL, toujours d'après les recommandations du CLSI (<https://clsi.org>).

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) a été utilisé pour la réalisation de mutants de délétion. Du sucrose a été dilué dans de la solution mère de M9 puis filtré et ajouté à de l'eau gélosée de manière à obtenir un milieu final avec 1X de M9, 10 % de sucrose et 1,7 % d'agar.

Pour les transformations naturelles chez *A. baumannii*, un milieu tryptone a été obtenu par ajout de 5 g/L de tryptone (Bacto™ Tryptone, Becton Dickinson, le Pont de Claix, France) dans de l'eau distillée. Des milieux gélosés de tryptone ont été obtenus par ajout d'agarose (*molecular biology certified agarose, ultra pure*, BioRad) à 2 % dans la solution de tryptone précédemment décrite. L'agarose a été fondu par passage au micro-ondes, puis les milieux coulés par ajout de 1 ml de milieu dans des tubes de 1,5 ml. Après 2 à 5 minutes d'aération, les tubes ont été refermés et utilisés directement ou conservés jusqu'à 2 mois maximum après préparation pour la réalisation de transformations naturelles chez *Acinetobacter baumannii*.

Du milieu cœur-cerveau a été utilisé pour la croissance bactérienne lors de la production de protéines.

Du milieu cœur-cerveau glycérolé 50 % a été utilisé pour la conservation des souches à -80°C.

3. Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

3.1. Antibiogrammes

Les antibiogrammes ont été réalisés par technique de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations du CA-SFM ([Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, 2023](#)). Les solutions bactériennes ont été calibrées à 0,5 McFarland, puis ensemencées dans 3 directions à l'aide d'un écouvillon de manière à recouvrir la totalité d'une boîte Mueller-Hinton agar (MHA). Un distributeur a ensuite été utilisé pour déposer des disques pré-imprégnés d'antibiotiques (BioRad, Marnes-la-Coquette). La lecture des diamètres d'inhibition a été effectuée après 18 h d'incubation à 35 ± 2 °C.

3.2. Détermination des Concentration Minimales Inhibitrices (CMI)

La CMI de différents antibiotiques a été déterminée par une méthode de dilution en milieu liquide. Cinquante microlitres de solution bactérienne, calibrée à 0,5 McF et diluée au 1/100ème, ont été déposés dans une plaques 96 puits contenant 50 µl de bouillon Mueller-Hinton (MHB) contenant des solutions d'antibiotiques dont les concentrations augmentaient selon une progression géométrique de raison 2. Dans le cas du céfidérol, le MHB a été remplacé par du milieu MHB déplété en fer. Les plaques scellées par un film ont été mises à incuber dans une étuve pendant 18 h à 35 ± 2 °C. La concentration en antibiotique du premier puits pour lequel une absence de développement bactérien a été constatée à l'œil nu correspondait à la CMI.

Les CMIs ont également parfois été déterminées à l'aide de plaques Sensititre™ (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette) toujours par la méthode de micro-dilution en milieu liquide. Dans ce cas, l'inoculum a été réalisé à partir de colonies ajustées à 0,5 McF. Cinquante microlitres de l'inoculum, dilué au 1/1000^{ème} dans du MH, ont été distribués dans tous les puits.

4. Courbes de croissance

Les courbes de croissance ont été obtenues après calibration d'une culture de la nuit à une absorbance de $A_{600\text{ nm}} = 0,1$ dans 700 µl de MHB frais. Deux cents microlitres de chaque suspension ont ensuite été déposés en triplicat dans une microplaque, incubée à 37 °C et la mesure de l'absorbance à 600 nm a été effectuée toutes les 20 min grâce au multi-lecteur de plaque Spark® (Tecan, Männedorf, Suisse), avec agitation entre chaque mesure, sur une durée totale de 15 h.

5. Obtention de mutants sur milieux gélosés avec antibiotiques

À partir d'une culture de la nuit de *A. baumannii* CIP 70.10, 100 µl de solution bactérienne calibrée à $DO_{600\text{ nm}} = 1$ ont étéensemencés sur des boîtes de MHA contenant des concentrations croissantes de ceftazidime (de 16, 32 et 64 µg/ml), céfépime (de 16, 32 et 64 µg/ml), imipénème (de 2, 4, et 8 µg/ml) ou céfidérol (de 4, 8 et 16 µg/ml). L'utilisation du *Spiral plater* (easySpiral Pro®, Interscience) a permis un ensemencement en spirale, calibré et facilement dénombrable. Le dénombrement des mutants a été réalisé au bout de 24 h d'incubation à 35 ± 2 °C. Afin de s'assurer de la stabilité des mutants, ces derniers ont été réisolés sur géloses MH puis MH contenant l'antibiotique à la concentration de sélection de chaque mutant. Le taux de mutants a été calculé en rapportant le

nombre de colonies obtenues sur MHA + antibiotique par rapport au dénombrement sur MH seul. Les expérimentations ont été réalisées en triplicat. Un schéma récapitulatif est proposé en **Figure 24**.

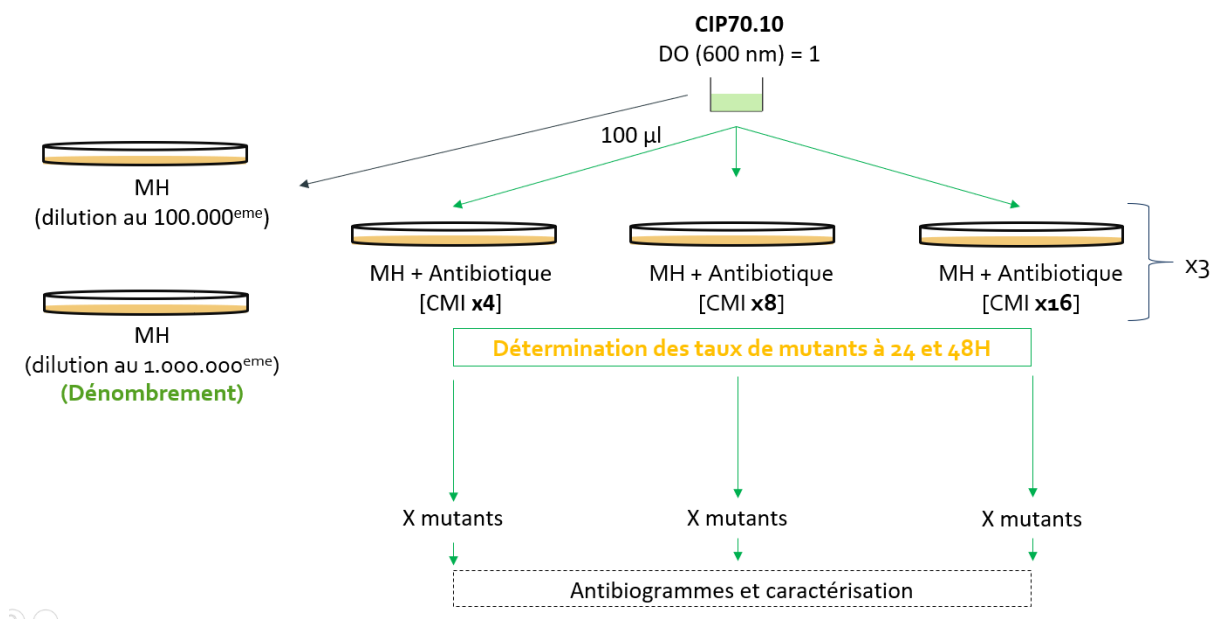


Figure 24 : Méthode illustrée pour la sélection des mutants sur antibiotique.

II. Techniques de biologie moléculaire

1. Extraction d'ADN

Les PCR ont été réalisées à l'aide d'une matrice d'ADN obtenue par la méthode de *boiling*. Des bactéries ont été prélevées à l'aide d'une oëse de 1 µl et ont été re-suspendues dans 400 µl d'eau stérile. Les solutions bactériennes ont été homogénéisées par mélange au vortex puis chauffées 10 min à 95°C dans un bain sec, et enfin laissées 5 min à 4°C. Une centrifugation de 10 min à 10 000 g a ensuite été réalisée, et 350 µl de surnageant ont été récupérés et conservés à -20°C.

Lorsque nécessaire, l'extraction d'ADN génomique bactérien a été effectuée avec le kit *QIAmp® DNA Kit* (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fournisseur. Les bactéries sont dans ce cas lysées par méthode mécanique avec des billes sous agitation au vortex, et l'ADN est ensuite purifié grâce à une chromatographie échangeuse d'anions.

2. PCR

Les PCR de vérification ont été réalisées avec la *MyTaq Red DNA polymerase* (Bioline, Londres, Grande-Bretagne). Les PCR de clonage ont été réalisées avec le kit *2x IProof HF Master Mix* (BioRad) ou la *Q5 High Fidelity DNA polymerase* (New England BioLabs, Evry, France). Les mix réactionnels ont été réalisés selon les recommandations des fabricants.

Les réactions de PCR ont été réalisées dans un thermocycleur ProFlex PCR System (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 18**) et d'une étape d'élongation à 72°C et dont la durée dépendait de la taille du fragment à amplifier (à raison d'une minute par kb). Une étape finale d'élongation à 72°C a été effectuée pendant 5 min.

3. Electrophorèse

3.1. 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'électrophorèse a été effectuée sous une tension de 105 V. 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).

3.2. En gel de polyacrylamide

L'analyse de production de protéines a été réalisée grâce aux gels Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels (BioRad) selon les recommandations du fournisseur. Les échantillons ont été préparés pour obtenir un volume final de 10 µl, composé de 5 µl d'échantillon, 4,75 µl de tampon Laemmli 2X et 0,25 µl de β-mercaptoéthanol. Le mix a ensuite été chauffé 5 min à 95°C en bain sec et la migration a été réalisée pendant 15 à 20 min à 300 V. Le gel a ensuite été rincé 3 fois 5 min à l'eau puis coloré grâce au bleu de Coomassie *BioSafe™ Coomassie G-250 stain* (BioRad). Le gel a été déposé dans une cuve contenant

50 ml de colorant puis incubé sous agitation pendant une nuit. Le gel a ensuite été rincé à l'eau pendant 30 min puis a été révélé grâce au scanner *GD-800 calibrated densitometer* (BioRad).

4. Purification de fragment d'ADN

La purification des fragments d'ADN obtenus par PCR a été réalisée avec le kit *NucleoSpin™ Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel, Hoerd) selon les recommandations du fournisseur à partir des produits PCR ou du gel d'électrophorèse. Les amplicons purifiés ont été dosés au *NanoDrop® One* (Thermo Scientific).

5. Extraction de plasmides

L'extraction d'ADN plasmidique a été réalisée avec le kit *NucleoSpin™ Plasmid* (Macherey-Nagel) d'après les recommandations du fabricant lors d'extraction à partir de cellules de *E. coli*, et en laissant un temps d'incubation plus long de 10 min lors de l'ajout du tampon A2, permettant la lyse bactérienne, quand des cellules de *A. baumannii* ont été utilisées comme source de plasmides. Les produits obtenus après purification ont été dosés au *NanoDrop® One* (Thermo scientific).

6. Clonage

6.1. Restriction enzymatique

La restriction enzymatique des plasmides a été effectuée avec les enzymes *BamHI*, *EcoRI*, *HindIII*, *NdeI*, *PstI-HF*, *XhoI* et/ou *XbaI* et en utilisant le tampon Cutsmart (New England Biolabs, Evry, France) selon les recommandations du fabricant. Les digestions ont été réalisées à la température recommandée pendant 1 h, suivi d'une étape de dénaturation si nécessaire. La digestion complète du plasmide a été vérifiée sur gel d'agarose.

6.2. Ligature des plasmides et fragments d'ADN

L'utilisation du kit *NEBuilder Hifi DNA Assembly®* permet de réaliser des clonages en une étape, en se basant sur des amorces dont une des parties est complémentaire du fragment à cloner et l'autre du

plasmide utilisé (**Tableau 18**). Ce kit permet également l'assemblage de plusieurs fragments dans un plasmide.

Les ligatures ont été réalisées avec le *NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix*, pendant 1 h, à 50 °C. La quantité optimale d'insert, comprise entre 0,005 pmol et 0,5 pmol, a été déterminée grâce à la formule suivante :

$$\text{Quantité d'insert (en pmol)} = \frac{\text{quantité d'insert (en ng)}}{\text{taille de l'insert (en pb)} * 0,65}$$

7. Mutagénèse dirigée

Le variant ADC-50 S318T a été obtenu par mutagénèse dirigée grâce au kit *GeneArt® Site Directed Mutagenesis System* (Invotrogen, Carlsbad, USA) selon les recommandations du fournisseur. La mutagénèse a été réalisée sur le plasmide pABEC::PrISAb1-ADC-50, avec les amorces indiquées dans le **Tableau 18**.

8. Transformation bactérienne

8.1. Par choc thermique

8.1.1 Préparation des cellules thermo-compétentes par traitement au CaCl_2

Les cellules BL21 Rosetta-gami ont été rendues compétentes par traitement au CaCl_2 . Pour cela, 5 ml d'une culture de la nuit ont été incubés dans 95 ml de MH frais, jusqu'à atteindre une $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,4$. Les cellules ont ensuite été divisées en 2 tubes de 50 ml, puis placées sur glace pendant 20 min. Une centrifugation de 10 min à 4°C à 4 000 rpm a ensuite été réalisée. Le culot de chaque tube a été repris dans 20 ml de CaCl_2 0,1M froid. Les tubes ont été laissés sur glace pendant 1 h, puis une seconde centrifugation de 10 min, à 4°C et à 4 000 rpm a été effectuée. Les culots ont été repris dans 5 ml de CaCl_2 0,1 M + glycérol 25% froid. Des aliquots de 100 µl ont été réalisés dans des tubes de 1,5 ml froids, et ont été ensuite conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

8.1.2. Transformation

La transformation chez *E. coli* a été réalisée dans la souche DH5α compétente issue du kit *Subcloning Efficiency™ DH5α™* (Chemically Competent Cells – Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) pour les clonages, dans des *One Shot® MAX Efficiency® DH5α - T1^R* (Invitrogen) dans le cas de la mutagénèse dirigée et chez des BL21 Rosetta-gami pour la production de protéines par induction à l'IPTG. Un choc thermique a été réalisé pour effectuer la transformation : les bactéries ont été mises au contact des plasmides 30 min sur glace. Les solutions ont ensuite été plongées dans un bain-marie à 42 °C pendant 20 sec, suivi de 2 min dans la glace. Un millilitre de MHB a été ajouté au milieu avant de placer les tubes sous agitation à 37 °C durant 1 h. Les solutions bactériennes ont ensuite été centrifugées 10 min à 4000 *g* et les culots ont été repris délicatement dans 200 µl de MHB frais. La totalité des solutions bactériennes a été étalée sur un milieu Mueller-Hinton contenant une concentration adaptée en antibiotique et les boîtes ont été incubées à 37 °C pendant 18 h jusqu'à croissance des colonies transformées.

8.2. Par transformation naturelle

La transformation naturelle est possible chez certaines souches de *A. baumannii* et le protocole utilisé a été inspiré des travaux de Godeux *et al.*, 2018 ([Godeux et al., 2018a](#)). Un bouillon de *A. baumannii* a été calibré à $DO_{600nm} = 0,1$ dans du MHB à partir d'une culture de la nuit, jusqu'à atteindre $DO_{600nm} = 0,8$. Cette solution a ensuite été diluée au tiers dans une solution de tryptone (5 g/L de tryptone) et un volume de 2,5 µl de cette solution a été déposé sur un milieu solide tryptone (5 g/L de tryptone, 2 % d'agar) coulé dans un tube de 1,5 ml. Un volume de 2,5 µl de plasmides (concentration allant de 60 ng/µl à 250 ng/µl) a été ajouté et le milieu et le tout a été incubé 4 h minimum (et 18 h maximum) à 35 ± 2 °C. Dans le cas où une transformation a été réalisée directement avec le mix obtenu après ligature avec le kit *NEBuilder Hifi DNA Assembly®*, ce sont 5 µl de produit de ligature qui ont été ajoutés. Les solutions ont ensuite été reprises dans 180 µl de MHB et la totalité de la solution a été déposée sur des milieux contenant l'antibiotique de sélection à une concentration adaptée.

8.3. Par électroporation

8.3.1. Préparation des cellules electro-compétentes

Pour la préparation de cellules électro-compétentes, une culture bactérienne dans 50 ml de MH a été réalisée sur la nuit. Cette culture a ensuite été placée 30 min sur glace pour stopper la croissance, puis centrifugée 20 min à 4000 rpm et à 4°C. Le surnageant a été jeté et le culot repris dans 50 ml d'eau glycérolée 10 % froide (4°C). Une seconde centrifugation de 15 min a été réalisée (4000 rpm, à 4°C). Le culot a été repris dans 25 ml d'eau glycérolée 10 %. Une autre centrifugation a été réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Le culot a été repris dans 4 ml d'eau glycérolée 10 %. Une dernière centrifugation a été réalisée dans des conditions similaires. Enfin, le culot a été repris dans 400 µl d'eau glycérolée 10 % puis transféré dans des tubes de 1,5 ml froids à raison de 100 µl par tubes. Les cellules ont été utilisées directement ou placées à -80°C pour conservation.

8.3.2. Electroporation

Les électroporations ont été réalisées en utilisant 50 µl de cellules électro-compétentes placées dans une cuvette d'électroporation de 2 mm (Thermo scientific) auxquelles ont été ajoutés 1 à 5 µl de plasmides (à une concentration de 100 ng/µl). Les cuves ont ensuite été placées dans l'électroporateur Micropulser™ (Biorad) avec un voltage de 2.5 kV (programme Ec2) pour induire le choc électrique. La solution bactérienne a ensuite été reprise dans 1 ml de MHB à température ambiante puis incubée une heure à 35 ± 2 °C sous agitation. Deux cent microlitres de cette solution ont ensuite été étalés sur gélose contenant l'antibiotique de sélection à la concentration requise. L'observation de transformants a été faite après une nuit d'incubation à 35 ± 2 °C. La vérification de l'expérience a été faite par électroporation d'une souche sans ajout de plasmide, ensuite ensemencée sur boîte MH sans antibiotique (témoin positif pour la vérification de la viabilité après choc électrique) et avec antibiotique (témoin négatif).

9. Obtention de mutants par délétion de gène

Les mutants de délétion ont été obtenus par amplification de fragments de 500 à 800 pb en amont et en aval de chaque région d'intérêt à déléter en utilisant les amorces de la **Tableau 18** avec une taq polymérase haute-fidélité (c.f. § II.2. PCR). Ces fragments ont ensuite été clonés dans le plasmide pMHL-2 avec le kit NEBuilder Hifi DNA Assembly® (c.f. § II.6. Clonage). Le plasmide recombinant a été transformé chez les cellules DH5α par choc thermique pour permettre la réplication. Après extraction

à partir de ces cellules, les plasmides ont ensuite été transférés chez la souche *A. baumannii* CIP70.10 par transformation naturelle. Le plasmide pMHL-2 est capable de s'intégrer dans le chromosome de *A. baumannii* par recombinaison homologue. Les cellules ont ensuite été réisolées sur des milieux minimum M9 contenant 10 % de sucrose, permettant l'excision du plasmide en raison de la présence sur le plasmide du gène codant pour SacB, une enzyme transformant le sucrose en levane sucrase, toxique pour la bactérie. Un premier passage sur sucrose a été réalisé pendant 72 h à température ambiante, puis un second passage de 48 h dans les mêmes conditions. La vérification de la perte du plasmide a été réalisée en repiquant des colonies sur MHA + apramycine 20 µg/ml ou MHA + ticarcilline 50 µg/ml et en parallèle sur géloses MHA. Les colonies qui ne poussaient pas sur antibiotiques ont été sélectionnées car ayant excisé le plasmide et des vérifications par PCR et séquençage ont permis de vérifier l'absence de la région génétique d'intérêt.

10. Séquençage de Sanger

La vérification de la séquence des gènes clonés a été réalisée par séquençage selon la méthode de di-désoxyribonucléotides de Sanger ([Sanger et al., 1977](#)). Le kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (ThermoFisher Scientific, Vilnius Lithuania) a été utilisé pour la réaction de PCR avec utilisation des amorces adaptées et selon les recommandations du fournisseur. La purification des produits PCR a ensuite été réalisée sur colonnes NucleoSeq (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) et les produits purifiés ont été lus sur un séquenceur RUO Applied Biosystems 3500 (Fisher Scientific, Illkirch, France) pour obtention des séquences. Les séquences ont été analysées grâce aux logiciels CLC (Qiagen, Hilden, Germany), Seaview (Gouy et al., 2010) et/ou Bioedit (Biosciences, 2011).

11. RTqPCR

11.1. Extraction d'ARNm

Une culture de la nuit calibrée à $DO_{600nm} = 0,1$ a été incubée sous agitation à 35 ± 2 °C jusqu'à atteindre une $DO_{600nm} = 0,8 \pm 0,025$. Cinq cents microlitres de cette solution ont été ajoutés à 1 mL d'une solution de *RNA protect* (Qiagen, Courtaboeuf), et ont ensuite été vortexés pendant 10 sec, suivi d'une incubation de 5 min à température ambiante, puis centrifugés à 10 000 rpm pendant 10 min. Les culots ont ensuite été séchés et conservés à -20 °C. Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du *RNeasy® Plus Mini Kit* (Qiagen) avec les modifications suivantes. Les culots ont été remis en suspension à l'aide d'un tampon de lyse TE pH 8, contenant de la protéinase K 1 µg/mL et du lysozyme 15 g/L ([Potron et al.,](#)

2019). Le dosage des ARN a été effectué avec un *NanoDrop® One* (Thermo Scientific) avant leur stockage à -80 °C. La synthèse des ADNc a été effectuée à partir de ces échantillons en utilisant 1,8 µg d'ARN, 150 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 utilisés comme amorces, selon les recommandations du fournisseur (Promega, Charbonnières-les-Bains). Après 1h à 42 °C, la rétrotranscription a été arrêtée 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.

11.2. Amplification d'ADNc

Le niveau d'expression de *bla_{ADC}* a été quantifié à l'aide de l'appareil Rotor-Gene RG6000 (Qiagen) grâce à des amorces spécifiques décrites dans la **Table 18**. Pour chaque série, une gamme de dilution (1/10ème, 1/50ème, 1/100ème, 1/500ème et 1/1000ème) a été préparée à partir de l'ADNc de la souche de référence CIP70.10. Les tubes contrôles (sans étape de reverse transcription) ont été testés afin de vérifier l'absence de contamination par ADNg. Le mélange réactionnel (15 µL) comprenait : 3 µL d'ADNc dilué au 1/10ème, 7,5 µL de QuantiTect® SYBR green PCR (Qiagen) et 1,5 mM de chaque amorce. L'amplification a commencé par une dénaturation et activation du SYBR à 95°C pendant 15 min, suivie de 40 cycles constitués chacun de 15 sec de dénaturation à 94 °C, 30 sec d'hybridation à 60 °C et 30 sec d'élongation à 72°C.

11.3. Quantification relative des transcrits de gènes

Le niveau d'expression du 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 (*rpoB*) codant une sous-unité de l'ARN polymérase dont l'expression est constante. Afin de tenir compte de l'efficacité d'amplification des gènes cible et de référence, la formule suivante a été utilisée :

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

III. Synthèse de protéines, purification et détermination des constantes enzymologiques

1. Induction par l'IPTG

Les plasmides recombinants pET41b::ADC-50, pET41b::ADC-50 S318T, pET41b::ADC-30, pET41b::ADC-200 et pET41b::ADC-256, ainsi que pET41b::NDM-1 et pET41b::NDM-9 ont été obtenus avec le *NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix* (c.f. § II.6. *Clonage*) et en utilisant les amorces appropriées (**Tableau 18**). Les plasmides recombinants ont ensuite été transformés dans des *E. coli* BL21 Rosetta-gami (ADC) ou des *E. coli* BL21 (DE3) (NDM). Deux litres de bouillon cœur-cerveille contenant 30 mg/L de kanamycine ont été inoculés avec 20 ml de culture de la nuit de *E. coli* BL21 DE3 (étude NDM) ou BL21 Rosetta-Gami (étude des ADC). La production des protéines recombinantes taguées (His-tag) a été réalisée par une induction sur la nuit à 22°C avec 0,2 mM d'IPTG.

2. Purification de protéines taguées (ADC)

Après centrifugation à 5 000 rpm à 4°C pendant 10 min, le surnageant a été jeté et le culot repris dans 10 ml de *binding buffer* (40 mM imidazole, 100 mM tampon phosphate pH 7,4 et 150 mM NaCl). Les bactéries ont ensuite été lysées par ajout de 200 µl de lysosyme à 50 mg/ml pendant une heure, puis par sonication. Deux cents microlitres de DNase (10 mg/ml) ont été ajoutés puis le mélange a été placé en incubation sur la nuit à 4°C. Le culot a ensuite été retiré à la suite d'une centrifugation à 20 000 g pendant 1 h à 4°C, suivi d'une seconde centrifugation sur le surnageant à 13 000 g pendant 1 h à 4°C. La fraction soluble a été filtrée avec un filtre de 0,45 µm puis passée sur colonne *HisTrap™ HP column* (GE Healthcare, Freiburg, Germany). Les protéines ont été éluées avec du tampon d'éluion (500 mM imidazole, 100 mM tampon phosphate, pH 7,4). Une dialyse a été réalisée sur les fractions purifiées dans du tampon phosphate 0,05 mM, NaCl 150 mM, pH 7,40 sur la nuit à 4°C. Enfin, une étape de gel filtration a été réalisée avec du tampon phosphate 100 mM pH 7.4 et 150 mM NaCl sur une *Superdex 75 column* (GE Healthcare). Les fractions qui ont été obtenues ont été poolées en fonction de leur pureté déterminée sur gel SDS-PAGE puis concentrées avec l'utilisation de colonnes Vivaspin™ (GE Healthcare). La concentration protéique a été déterminée par la mesure de la DO à 280 nm avec le Nanodrop et les coefficients d'extinction ont été obtenus grâce à l'outil ProtParamtool (Swiss Institute of Bioinformatics online resource portal).

3. Déterminations des constantes catalytiques

Les paramètres enzymatiques (K_m et k_{cat}) ont été déterminés en utilisant les protéines purifiées ADC-50, ADC-50 S318T, ADC-30, ADC-200 et ADC-256 dans du tampon phosphate, 100 mM, pH 7,4 à température ambiante (25°C). Les valeurs de K_m et k_{cat} ont été déterminées en analysant l'hydrolyse des β -lactamines en utilisant la linéarisation Eadie-Hofstee de l'équation de Michaelis-Menten avec le logiciel SFWIFT II. Les concentrations inhibitrices à 50 % (IC50) ont été déterminées pour l'ADC-30 comme étant les concentrations de benzylpénicilline qui réduisent de 50 % le taux d'hydrolyse de 100 μ M de ceftazidime dans des conditions où l'enzyme ADC-30 a été préincubée avec des concentrations de 50, 100 et 200 μ M du substrat rapporteur pendant 3 min avant l'ajout du substrat.

IV. Analyses bioinformatiques

1. Séquençage complet des génomes

Quatorze mutants sélectionnés sur antibiotiques (c.f. § 1.5. *Obtention de mutants sur milieux gélosés avec antibiotiques*) ont été retenus pour séquençage de génome complet par rapport à leur phénotype de résistance. L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée à l'aide du Kit *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) selon les recommandations du fabricant. Les extraits d'ADN ont ensuite été envoyés à la plateforme PIBNet (Institut Pasteur, France), pour réaliser le séquençage à partir de bibliothèques construites à l'aide du kit *Illumina Nextera XT* (Illumina, Illumina Solutions Center Paris) ; le séquençage haut-débit a été réalisé en utilisant un kit *2x150 pair-end read*, *Illumina NextSeq v2* (Illumina).

2. Appel de variants

Les reads obtenus par séquençage complet de génome ont été alignés en utilisant BWA (v0.7.17) (<https://bio.tools/bwa>) sur le génome précédemment séquencé de la souche *A. baumannii* CIP70.10. L'appel de variant a été réalisé avec FreeBayes (v1.3.1) (<https://bio.tools/freebayes>) en utilisant une qualité minimum de base et de mapping de 20 et une ploïdie de 1. Les variants ont été considérés comme présents si une fraction de 80 % des *reads* alignés présentaient une mutation, avec un minimum de 10 *reads* alignés.

Tableau 18 : Liste des amorces utilisées au cours de ce travail.

Primer	Séquence (5' → 3')	Tm (°C)	Note
Clonages			
Clonage des gènes codant les enzymes de type NDM			
clonage_NDM_fwd	CAAGCTTGGTACCGAGCTCGTGGCTTTTGAAACTGTCCG	64	
clonage_NDM_rev	ACTGGCGGCCGTTACTAGTGTCTGAGGTCAGGATAGGGG	65	
Clonage des gènes codant les enzymes de type ADC			
pABEC::PrNat_ADC-50	ACGATCCCCTGAATTCTGCAACATAACAATTAATTAGGTGATTTTTG	65	ADC-50 (promoteur naturel)
PrISAba1_pABEC_fwd	ACGATCCCCTGAATTCTGCAAGATGTGTCATAGTATTCGTC	61	ADC-50 (promoteur ISAba1)
PrIS_rev	TAAATCGCATGATTAGCTCCTCTGTACAC	59	
ADC-50_fwd	GGAGCTAATCATGCGATTTAAAAAAATTTCTTG	55	
pABEC::PrISAba1-ADC-aval_rev	CAGTGTGATGGATATCTGCAGATGATGACTATTTCTCTCTTTTATTTTAG	60	
PrISAba1_pABEC_fwd	ACGATCCCCTGAATTCTGCAAGATGTGTCATAGTATTCGTC	67	Tout clonage sous expression du promoteur ISAba1)
pABEC::PrISAba1-ADC-aval_rev	CAGTGTGATGGATATCTGCAGATGATGACTATTTCTCTCTTTTATTTTAG	65	
NEB_IS-ADC_rev	CAGTGTGATGGATATCTGCACCATTCTCTTTTTGTTTTGG	65	ADC-74 et ADC-276
Clonage des gènes codant les PLP avec leur promoteur naturel			
PBP1b_NEB_fwd	ACGATCCCCTGAATTCTGCAATGACAAAGCTATCGCATC	60	PLP1b
PBP1b_NEB_rev	CAGTGTGATGGATATCTGCATCCTGTTTCCTGTTAAC	56	
PBP2_NEB_fwd	ACGATCCCCTGAATTCTGCAATCCCAATAATGCGTAATTG	58	PLP2
PBP2_NEB_rev	CAGTGTGATGGATATCTGCATTGCGTTAGAATAAGCAG	58	
PBP3_NEB_fwd	ACGATCCCCTGAATTCTGCACCGATGACCTCAGAGCAAAATAAG	65	PLP3
PBP3_NEB_rev	CAGTGTGATGGATATCTGCAGGATGAATTTCTTGAAAAGAAAC	62	
Clonage des gènes codant les PLP en aval du promoteur fort d'ISAba1			
PrISAba1_pABEC_fwd	ACGATCCCCTGAATTCTGCAAGATGTGTCATAGTATTCGTC	58	PLP1b
IS_PBP1b_rev	CAAACCTTCATGATTAGCTCCTCTGTACAC	59	
PBP1b_aval_IS_fwd	GGAGCTAATCATGAAGTTTGAACGTGGTATC	60	
PBP1b_NEB_rev	CAGTGTGATGGATATCTGCATCCTGTTTCCTGTTAAC	56	
PrISAba1_pABEC_fwd	ACGATCCCCTGAATTCTGCAAGATGTGTCATAGTATTCGTC	58	PLP2
IS_PBP2_rev	GCTGTTTCATGATTAGCTCCTCTGTACAC	59	
PBP2_aval_IS_fwd	GGAGCTAATCATGAAACAGCACTTTCTTTAAAAAG	61	
PBP2_aval_IS_rev	CAGTGTGATGGATATCTGCACCCCAATAATGCGTAATTG	59	
PrISAba1_pABEC_fwd	ACGATCCCCTGAATTCTGCAAGATGTGTCATAGTATTCGTC	58	PLP3
IS_PBP3_rev	TATCTACCATGATTAGCTCCTCTGTACAC	59	
PBP3_aval_IS_fwd	GGAGCTAATCATGGTAGATAAGCGAACAAAG	59	
PBP3_NEB_rev	CAGTGTGATGGATATCTGCAGGATGAATTTCTTGAAAAGAAAC	62	
Clonage des gènes codant les PLP en aval du promoteur identifié dans les mutants			
PBP1b_Pr079_NEB_fwd	ACGATCCCCTGAATTCTGCAATGACAAAGCTATCGTATC	67	PLP1b
PBP1b_NEB_rev	CAGTGTGATGGATATCTGCATCCTGTTTCCTGTTAAC	65	
PBP2_NEB_fwd	ACGATCCCCTGAATTCTGCAATCCCAATAATGCGTAATTG	67	PLP2
PBP2_Pr098_NEB_rev	CAGTGTGATGGATATCTGCATTGCGTTAGGATAAGCAG	67	
Expression protéique			
ADC			
Exp_ADC_pET41b_fwd	AAGGAGATATACATATGGCAATACACCAAAAGACC	62	

Exp_ADC-256 pET41b_fwd	AAGGAGATATACATATG GGCAATAC CCAAAAAGACC	63	(ADC-256)
Exp_ADC_pET41b_rev V.II	GGTGGTGGTGTCTCGAG TTTCTTTATTGCATT CAGC	66	
NDM			
NdeI-NDM29-270	AAAAACATATGGGTGAAATCCGCCCGACG		(Boutal et al., 2017)
NDM-XhoIdelta STOP	AAAAACTCGAGGCGCAGCTTGTCTGGCCAT		
Mutagénèse dirigée			
ADC50-S316T_fwd	GTACCATAAAACTGGC A CAACTAACGGTTTCGG	63	
ADC50-S316T_rev	CCGAAACCGTTAGTTG T GCCAGTTTATGGTAC	63	
Séquençages de Sanger			
Vérification des gène bla _{ADC} clonés			
PréAmpCPISAbal	GACCTGCAAAGAAGCGCTGC	64	
PréAmpCab1	GAGCTAATCATGCGATTTAAA	41	
PréAmpCab2	GCTTAGGATATGTTTGGTTCTT	41	
Vérification des clonages dans le plasmide pABEC			
M14 Fw	CTTCCGGCTCGTATGTTGTG	54	
ori3' Fw	CATCCTGCCCTTATGTTCCC	54	
Ori5' pABEC	GCTGCTATAGGGTTGCGTTC	54	
Vérification des clonages dans le plasmide pMHL-2			
pMHL2 Fw	GTTGCCCCGTCTCACTGGT	53	
pMHL2 Rv	CACCCAGGCTTTACACTTT	52	
Vérification des clonages dans le plasmide pET41b			
Seq_pET41b_fwd	CCTTTCGGGCTTTGTTTAGC	52	
Seq_pET41b_rev	GGGAATTGTGAGCGGATAAC	52	
RTqPCR			
PBP1B RTqPCR fwd	CGTCAATTACGTACCGAATATC	51	
PBP1B seq amont rev	CAGGATGGGCAATCAGTACAGC	57	
RT_PBP2_fwd	GATTCGACCAGCCAACCATC	54	
RT_PBP2_rev	TAGCAGGACGAGTTGGTGTT	52	
RT_PBP3_fwd	CGGGTGGTACTGCAAAACAA	52	
RT_PBP3_rev	GGCAACCAAACCACCGTAAT	52	
Mutants de délétions			
bla _{ADC}			
upstream ADC_fwd	TGAATTCGCGGCCGCTGCA AAAACCAAAATAAATATAGTGCG	56	
upstream ADC_rev	TAGGGAAAA GATTAGCTCATAAATTATTTAAAAAGAAAG	56	
downstream ADC fwd	TGAGCTAATC TTTTCCCTAAAAATAAAAAGAGAGAAATAGTCATCATC	64	
downstream ADC rev	TCCCATATGGTCTGACCTGCAT TGCTCAGCCGCAGCTTAG	68	
bla _{OXA}			
upstream OXA_fwd	TGAATTCGCGGCCGCTGCA GAAACTAATGAAAGCTCTAGAG	57	
upstream OXA_rev	TATAAGTCTT GAGTTAGTTTATAGCCCG	56	
downstream OXA fwd	AAACTAACTCAAGACTTAT AAGATTGAATTTGAAG	56	
downstream OXA rev	TCCCATATGGTCTGACCTGC AACCACCTTGTTGATTCTG	59	

Les séquences complémentaires nécessaire au clonage en utilisant le NEBuilder Hifi DNA Assembly® sont indiquées en bleues.

Bibliographie

- Abraham, E. P., & Chain, E. (1940). An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature*, 146(3713), 3713. <https://doi.org/10.1038/146837a0>
- Adams, M. D., Goglin, K., Molyneaux, N., Hujer, K. M., Lavender, H., Jamison, J. J., MacDonald, I. J., Martin, K. M., Russo, T., Campagnari, A. A., Hujer, A. M., Bonomo, R. A., & Gill, S. R. (2008). Comparative Genome Sequence Analysis of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology*, 190(24), 8053-8064. <https://doi.org/10.1128/JB.00834-08>
- Al Atrouni, A., Joly-Guillou, M.-L., Hamze, M., & Kempf, M. (2016). Reservoirs of Non-baumannii *Acinetobacter* Species. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00049>
- Ambler, R. P., Baddiley, J., & Abraham, E. P. (1997). The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 289(1036), 321-331. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>
- Anstey, N. M., Currie, B. J., Hassell, M., Palmer, D., Dwyer, B., & Seifert, H. (2002). Community-Acquired Bacteremic *Acinetobacter* Pneumonia in Tropical Australia Is Caused by Diverse Strains of *Acinetobacter baumannii*, with Carriage in the Throat in At-Risk Groups. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2), 685-686. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.2.685-686.2002>
- Antunes, L. C. S., Visca, P., & Towner, K. J. (2014). *Acinetobacter baumannii* : Evolution of a global pathogen. *Pathogens and Disease*, 71(3), 292-301. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12125>
- Armstrong, G. L., Conn, L. A., & Pinner, R. W. (1999). Trends in Infectious Disease Mortality in the United States During the 20th Century. *JAMA*, 281(1), 61-66. <https://doi.org/10.1001/jama.281.1.61>
- Aronson, N. E., Sanders, J. W., & Moran, K. A. (2006). In Harm's Way : Infections in Deployed American Military Forces. *Clinical Infectious Diseases*, 43(8), 1045-1051. <https://doi.org/10.1086/507539>
- Artuso, I., Poddar, H., Evans, B. A., & Visca, P. (2023). Genomics of *Acinetobacter baumannii* iron uptake. *Microbial Genomics*, 9(8), 001080. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001080>
- Asplund, M. B., Coelho, C., Cordero, R. J., & Martinez, L. R. (2013). Alcohol impairs J774.16 macrophage-like cell antimicrobial functions in *Acinetobacter baumannii* infection. *Virulence*, 4(6), 467-472. <https://doi.org/10.4161/viru.25641>
- Asrat, H., Samaroo-Campbell, J., Ata, S., & Quale, J. (2023). Contribution of Iron-Transport Systems and β -Lactamases to Cefiderocol Resistance in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* Endemic to New York City. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 0(0), e00234-23. <https://doi.org/10.1128/aac.00234-23>
- Aygün, G., Demirkiran, O., Utku, T., Mete, B., Ürkmez, S., Yılmaz, M., Yaşar, H., Dikmen, Y., & Öztürk, R. (2002). Environmental contamination during a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* outbreak in an intensive care unit. *Journal of Hospital Infection*, 52(4), 259-262. <https://doi.org/10.1053/jhin.2002.1300>
- Ayoub Moubareck, C., & Hammoudi Halat, D. (2020). Insights into *Acinetobacter baumannii* : A Review of Microbiological, Virulence, and Resistance Traits in a Threatening Nosocomial Pathogen. *Antibiotics*, 9(3), 3. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9030119>

- Baran, G., Erbay, A., Bodur, H., Öngürü, P., Akıncı, E., Balaban, N., & Çevik, M. A. (2008). Risk factors for nosocomial imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections. *International Journal of Infectious Diseases*, 12(1), 16-21. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2007.03.005>
- Bartual, S. G., Seifert, H., Hippler, C., Luzon, M. A. D., Wisplinghoff, H., & Rodríguez-Valera, F. (2005). Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(9), 4382-4390. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4382-4390.2005>
- Bassett, E. J., Keith, M. S., Armelagos, G. J., Martin, D. L., & Villanueva, A. R. (1980). Tetracycline-Labeled Human Bone from Ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). *Science*, 209(4464), 1532-1534. <https://doi.org/10.1126/science.7001623>
- Beceiro, A., Pérez, A., Fernández-Cuenca, F., Martínez-Martínez, L., Pascual, A., Vila, J., Rodríguez-Baño, J., Cisneros, J. M., Pachón, J., Bou, G., & Infection (GEIH), and the S. G. for N. (2009). Genetic Variability among ampC Genes from *Acinetobacter* Genomic Species 3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(3), 1177-1184. <https://doi.org/10.1128/AAC.00485-08>
- Beijerinck, M. W. (1910). Pigments as products of oxidation by bacterial action. *Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Proceedings Series B Physical Sciences*, 13, 1066-1077.
- Bellamy, W. D., & Klimek, J. W. (1948). Some Properties of Penicillin-resistant Staphylococci. *Journal of Bacteriology*, 55(2), 153-160. <https://doi.org/10.1128/jb.55.2.153-160.1948>
- Bergogne-Bérézin, E., & Towner, K. J. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens : Microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews*, 9(2), 148-165. <https://doi.org/10.1128/cmr.9.2.148>
- Berlau, J., Aucken, H. M., Houang, E., & Pitt, T. L. (1999). Isolation of *Acinetobacter* spp including *A. baumannii* from vegetables : Implications for hospital-acquired infections. *Journal of Hospital Infection*, 42(3), 201-204. <https://doi.org/10.1053/jhin.1999.0602>
- Bhagwat, S. S., Periasamy, H., Takalkar, S. S., Palwe, S. R., Khande, H. N., & Patel, M. V. (2019). The Novel β -Lactam Enhancer Zidebactam Augments the In Vivo Pharmacodynamic Activity of Cefepime in a Neutropenic Mouse Lung *Acinetobacter baumannii* Infection Model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(4), 10.1128/aac.02146-18. <https://doi.org/10.1128/aac.02146-18>
- Biosciences, G. B. of. (2011). BioEdit : An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*. https://www.academia.edu/2350041/BioEdit_An_important_software_for_molecular_biology
- Biswas, S., Brunel, J.-M., Dubus, J.-C., Reynaud-Gaubert, M., & Rolain, J.-M. (2012). Colistin : An update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 10(8), 917-934. <https://doi.org/10.1586/eri.12.78>
- Boisson, M., & Mimos, O. (2018). Les nouveaux antibiotiques : Qu'apportent-ils aux cliniciens ? *Le Praticien en Anesthésie Réanimation*, 22(5), 289-295. <https://doi.org/10.1016/j.pratan.2018.07.003>
- Boll, J. M., Tucker, A. T., Klein, D. R., Beltran, A. M., Brodbelt, J. S., Davies, B. W., & Trent, M. S. (2015). Reinforcing Lipid A Acylation on the Cell Surface of *Acinetobacter baumannii* Promotes Cationic Antimicrobial Peptide Resistance and Desiccation Survival. *mBio*, 6(3), 10.1128/mbio.00478-15. <https://doi.org/10.1128/mbio.00478-15>

- Bondeelle, L., Bergeron, A., & Wolff, M. (2019). Place des nouveaux antibiotiques dans le traitement de la pneumonie aiguë communautaire de l'adulte. *Revue des Maladies Respiratoires*, 36(1), 104-117. <https://doi.org/10.1016/j.rmr.2018.04.010>
- Bonnin, R. A., Emeraud, C., Jousset, A. B., Naas, T., & Dortet, L. (2022). Comparison of disk diffusion, MIC test strip and broth microdilution methods for cefiderocol susceptibility testing on carbapenem-resistant enterobacterales. *Clinical Microbiology and Infection*, 28(8), 1156.e1-1156.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.04.013>
- Bonnin, R. A., Poirel, L., Naas, T., Pirs, M., Seme, K., Schrenzel, J., & Nordmann, P. (2012). Dissemination of New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(9), E362-E365. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03928.x>
- Bonnin, R. A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2014). New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* : A novel paradigm for spreading antibiotic resistance genes. *Future Microbiology*, 9(1), 33-41. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.69>
- Bou, G., Cerveró, G., Domínguez, M. A., Quereda, C., & Martínez-Beltrán, J. (2000). Characterization of a Nosocomial Outbreak Caused by a Multiresistant *Acinetobacter baumannii* Strain with a Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme : High-Level Carbapenem Resistance in *A. baumannii* Is Not Due Solely to the Presence of β -Lactamases. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), 3299-3305. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.9.3299-3305.2000>
- Bou, G., & Martínez-Beltrán, J. (2000). Cloning, Nucleotide Sequencing, and Analysis of the Gene Encoding an AmpC β -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(2), 428-432. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.2.428-432.2000>
- Boutal, H., Naas, T., Devilliers, K., Oueslati, S., Dortet, L., Bernabeu, S., Simon, S., & Volland, H. (2017). Development and Validation of a Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of NDM-Producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(7), 2018-2029. <https://doi.org/10.1128/JCM.00248-17>
- Bouvet, P., & Grimont, P. (1986). Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. Nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. Nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. Nov., and *Acinetobacter junii* sp. Nov. And Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36(2), 228-240. <https://doi.org/10.1099/00207713-36-2-228>
- Bouvet, P., & Grimont, P. (1987). Identification and biotyping of clinical isolates of *Acinetobacter*. *Annales de l'Institut Pasteur / Microbiologie*, 138(5), 569-578. [https://doi.org/10.1016/0769-2609\(87\)90042-1](https://doi.org/10.1016/0769-2609(87)90042-1)
- Boyd, N. K., Teng, C., & Frei, C. R. (2021). Brief Overview of Approaches and Challenges in New Antibiotic Development : A Focus On Drug Repurposing. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.684515>
- Bratu, S., Landman, D., Martin, D. A., Georgescu, C., & Quale, J. (2008). Correlation of Antimicrobial Resistance with β -Lactamases, the OmpA-Like Porin, and Efflux Pumps in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* Endemic to New York City. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(9), 2999-3005. <https://doi.org/10.1128/AAC.01684-07>
- Brisou, J., & Prevot, A. R. (1954). [Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group]. *Annales de l'Institut Pasteur*, 86(6), 722-728.

- Brown, A. G., Butterworth, D., Cole, M., Hanscomb, G., Hood, J. D., Reading, C., & Rolinson, G. N. (1976). NATURALLY-OCCURRING β -LACTAMASE INHIBITORS WITH ANTIBACTERIAL ACTIVITY. *The Journal of Antibiotics*, 29(6), 668-669. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.29.668>
- Bulychev, A., & Mobashery, S. (1999). Class C β -Lactamases Operate at the Diffusion Limit for Turnover of Their Preferred Cephalosporin Substrates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(7), 1743-1746. <https://doi.org/10.1128/aac.43.7.1743>
- Bush, K. (2013). The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 19(4), 549-559. <https://doi.org/10.1007/s10156-013-0640-7>
- Carbonne, A., Naas, T., Blanckaert, K., Couzigou, C., Cattoen, C., Chagnon, J.-L., Nordmann, P., & Astagneau, P. (2005). Investigation of a nosocomial outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a hospital setting. *Journal of Hospital Infection*, 60(1), 14-18. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.07.027>
- Castanheira, M., Mendes, R. E., & Gales, A. C. (2023). Global Epidemiology and Mechanisms of Resistance of *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex. *Clinical Infectious Diseases*, 76(Supplement_2), S166-S178. <https://doi.org/10.1093/cid/ciad109>
- Cayô, R., Rodríguez, M.-C., Espinal, P., Fernández-Cuenca, F., Ocampo-Sosa, A. A., Pascual, Á., Ayala, J. A., Vila, J., & Martínez-Martínez, L. (2011). Analysis of Genes Encoding Penicillin-Binding Proteins in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(12), 5907-5913. <https://doi.org/10.1128/AAC.00459-11>
- Chang, W. N., Lu, C. H., Huang, C. R., & Chuang, Y. C. (2000). Community-Acquired *Acinetobacter* Meningitis in Adults. *Infection*, 28(6), 395-397. <https://doi.org/10.1007/s150100070013>
- Charles, P.-E., Dargent, A., & Andreu, P. (2017). Nouvelles molécules anti-infectieuses. Quelle place en médecine intensive réanimation pour le tédizolide, la ceftaroline et le ceftobiprole ? *Médecine Intensive Réanimation*, 26(3), 207-217. <https://doi.org/10.1007/s13546-017-1271-2>
- Chen, T., Fu, Y., Hua, X., Xu, Q., Lan, P., Jiang, Y., Yu, Y., & Zhou, Z. (2021). *Acinetobacter baumannii* strains isolated from cerebrospinal fluid (CSF) and bloodstream analysed by cgMLST: The dominance of clonal complex CC92 in CSF infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 58(4), 106404. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2021.106404>
- Chen, T., Lee, Y.-T., Kuo, S.-C., Yang, S.-P., Fung, C.-P., & Lee, S.-D. (2014). Rapid identification of *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter nosocomialis* and *Acinetobacter pittii* with a multiplex PCR assay. *Journal of Medical Microbiology*, 63(9), 1154-1159. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.071712-0>
- Chen, Y., Zhou, Z., Jiang, Y., & Yu, Y. (2011). Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(6), 1255-1259. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr082>
- Cheng, Z., Thomas, P. W., Ju, L., Bergstrom, A., Mason, K., Clayton, D., Miller, C., Bethel, C. R., VanPelt, J., Tierney, D. L., Page, R. C., Bonomo, R. A., Fast, W., & Crowder, M. W. (2018). Evolution of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM) in the clinic: Effects of NDM mutations on stability, zinc affinity, and mono-zinc activity. *Journal of Biological Chemistry*, 293(32), 12606-12618. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003835>
- Choi, C. H., Lee, J. S., Lee, Y. C., Park, T. I., & Lee, J. C. (2008). *Acinetobacter baumannii* invades epithelial cells and outer membrane protein A mediates interactions with epithelial cells. *BMC Microbiology*, 8(1), 216. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-216>

- Chu, Y. W., Leung, C. M., Houang, E. T. S., Ng, K. C., Leung, C. B., Leung, H. Y., & Cheng, A. F. B. (1999). Skin Carriage of *Acinetobacters* in Hong Kong. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(9), 2962-2967.
- Chusri, S., Chongsuvivatwong, V., Rivera, J. I., Silpapojakul, K., Singkhamanan, K., McNeil, E., & Doi, Y. (2017). Molecular epidemiology and spatiotemporal analysis of hospital-acquired *Acinetobacter baumannii* infection in a tertiary care hospital in southern Thailand. *Journal of Hospital Infection*, 95(1), 53-58. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.10.003>
- Clarke, T. B., Kawai, F., Park, S.-Y., Tame, J. R. H., Dowson, C. G., & Roper, D. I. (2009). Mutational Analysis of the Substrate Specificity of *Escherichia coli* Penicillin Binding Protein 4. *Biochemistry*, 48(12), 2675-2683. <https://doi.org/10.1021/bi801993x>
- CNR-RA. (2023). *Rapport annuel d'activité 2023 du Centre National de Référence de la Résistance aux antibiotiques*.
- Coates, A., Hu, Y., Bax, R., & Page, C. (2002). The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1(11), 11. <https://doi.org/10.1038/nrd940>
- Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. (2023). *Recommandations 2023, V.1.0 Juin*. https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2023/06/CASFM2023_V1.0.pdf
- Coyne, S., Courvalin, P., & Périchon, B. (2011). Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(3), 947-953. <https://doi.org/10.1128/AAC.01388-10>
- Coyne, S., Guigon, G., Courvalin, P., & Périchon, B. (2010). Screening and quantification of the expression of antibiotic resistance genes in *Acinetobacter baumannii* with a microarray. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(1), 333-340. <https://doi.org/10.1128/aac.01037-09>
- Dahyot, S., & Mammeri, H. (2012). Hydrolysis Spectrum Extension of CMY-2-Like β -Lactamases Resulting from Structural Alteration in the Y-X-N Loop. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(3), 1151-1156. <https://doi.org/10.1128/aac.05630-11>
- Damier-Piolle, L., Magnet, S., Brémont, S., Lambert, T., & Courvalin, P. (2008). AdeIJK, a resistance-nodulation-cell division pump effluxing multiple antibiotics in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(2), 557-562. <https://doi.org/10.1128/aac.00732-07>
- Davis, K. A., Moran, K. A., McAllister, C. K., & Gray, P. J. (2005). Multidrug-Resistant *Acinetobacter* Extremity Infections in Soldiers. *Emerging Infectious Diseases*, 11(8), 1218-1224. <https://doi.org/10.3201/1108.050103>
- Decousser, J. W., Jansen, C., Nordmann, P., Emirian, A., Bonnin, R. A., Anais, L., Merle, J. C., & Poirel, L. (2013). Outbreak of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* in France, January to May 2013. *Eurosurveillance*, 18(31), 20547. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.31.20547>
- Diancourt, L., Passet, V., Nemec, A., Dijkshoorn, L., & Brisse, S. (2010). The population structure of *Acinetobacter baumannii*: Expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PloS One*, 5(4), e10034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010034>
- Dijkshoorn, L., Aucken, H., Gerner-Smidt, P., Janssen, P., Kaufmann, M. E., Garaizar, J., Ursing, J., & Pitt, T. L. (1996). Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by

- genotypic and phenotypic methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(6), 1519-1525. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.6.1519-1525.1996>
- Dijkshoorn, L., Nemec, A., & Seifert, H. (2007). An increasing threat in hospitals : Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews Microbiology*, 5(12), 12. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1789>
- Dijkshoorn, L., van Aken, E., Shunburne, L., van der Reijden, T. J. K., Bernards, A. T., Nemec, A., & Towner, K. J. (2005). Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. In faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(4), 329-332. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01093.x>
- DiMasi, J. A., Grabowski, H. G., & Hansen, R. W. (2016). Innovation in the pharmaceutical industry : New estimates of R&D costs. *Journal of Health Economics*, 47, 20-33. <https://doi.org/10.1016/j.jhealeco.2016.01.012>
- Dowling, H. F., & Leíper, M. H. (1951). The Effect of Antibiotics (Penicillin, Aureomycin, and Terramycin) on the Fatality Rate and Incidence of Complications in Pneumococcic Pneumonia. A Comparison with other Methods of Therapy. *American Journal of Medical Sciences*, 222(4), 396-403.
- D'Souza, R., Pinto, N. A., Phuong, N. L., Higgins, P. G., Vu, T. N., Byun, J.-H., Cho, Y. L., Choi, J. R., & Yong, D. (2019). Phenotypic and Genotypic Characterization of *Acinetobacter* spp. Panel Strains : A Cornerstone to Facilitate Antimicrobial Development. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00559>
- Ehrenstein, B., Bernards, A. T., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Towner, K. J., Bouvet, P. J., Daschner, F. D., & Grundmann, H. (1996). *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(10), 2414-2420. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.10.2414-2420.1996>
- Ehrlich, P., 1854-1915, Hata, S., & 1873-1938. (1910). *Experimentelle Chemotherapie der Spirillosen (Syphilis, Rückfallfieber, Hühnerspirillose, Frambösie)*. Verlag von Julius Springer. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=experimentelle+Chemotherapie+der+Spirillosen+%28Syphilis%2C+Ru%CC%88ckfallfieber%2C+Hu%CC%88hnerspirillose%2C+Frambo%CC%88sie%29&author=Ehrlich%2C+Paul&publication_year=1910
- Eijkelkamp, B. A., Stroehrer, U. H., Hassan, K. A., Papadimitriou, M. S., Paulsen, I. T., Brown, M. H., & Lo, R. (2011). Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiology Letters*, 323(1), 44-51. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02362.x>
- El- Hakeem, R., Saleh, S., Aboulwafa, M., & Hassouna, N. (2023). *Acinetobacter baumannii* Virulence Factors, Resistance Mechanisms, and New Insights on Infection Treatment. *Archives of Pharmaceutical Sciences Ain Shams University*, 7(1), 208-230. <https://doi.org/10.21608/aps.2023.212124.1125>
- Engel, S., Puglisi, M. P., Jensen, P. R., & Fenical, W. (2006). Antimicrobial activities of extracts from tropical Atlantic marine plants against marine pathogens and saprophytes. *Marine Biology*, 149(5), 991-1002. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0264-x>
- Errington, J. (2017). Cell wall-deficient, L-form bacteria in the 21st century : A personal perspective. *Biochemical Society Transactions*, 45(2), 287-295. <https://doi.org/10.1042/BST20160435>
- EUCAST. (2022). *Broth microdilution—EUCAST reading guide v 4.0*.

- European Centre for Disease Prevention and Control. (2023). *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023—2021 data*. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2023-2021-data>
- Evans, B. A., & Amyes, S. G. B. (2014). OXA β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 241-263. <https://doi.org/10.1128/cmr.00117-13>
- Falagas, M. E., Karveli, E. A., Kelesidis, I., & Kelesidis, T. (2007). Community-acquired *Acinetobacter* infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 26(12), 857-868. <https://doi.org/10.1007/s10096-007-0365-6>
- Falagas, M. E., & Rafailidis, P. I. (2007). Attributable mortality of *Acinetobacter baumannii*: No longer a controversial issue. *Critical Care*, 11(3), 134. <https://doi.org/10.1186/cc5911>
- Falkinham, J. O., Wall, T. E., Tanner, J. R., Tawaha, K., Alali, F. Q., Li, C., & Oberlies, N. H. (2009). Proliferation of Antibiotic-Producing Bacteria and Concomitant Antibiotic Production as the Basis for the Antibiotic Activity of Jordan's Red Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(9), 2735-2741. <https://doi.org/10.1128/AEM.00104-09>
- Feng, G.-D., Yang, S.-Z., Wang, Y.-H., Deng, M.-R., & Zhu, H.-H. (2014). *Acinetobacter guangdongensis* sp. Nov., isolated from abandoned lead–zinc ore. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt_10), 3417-3421. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.066167-0>
- Figueiredo, S., Poirel, L., Papa, A., Koulourida, V., & Nordmann, P. (2009). Overexpression of the Naturally Occurring blaOXA-51 Gene in *Acinetobacter baumannii* Mediated by Novel Insertion Sequence ISAb9. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(9), 4045-4047. <https://doi.org/10.1128/aac.00292-09>
- Findlay, J., Poirel, L., Bouvier, M., & Nordmann, P. (2022). In vitro activity of sulbactam-durlobactam against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and mechanisms of resistance. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 30, 445-450. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2022.05.011>
- Fleming, A. (1929). On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzae. *British journal of experimental pathology*, 10(3), 226-236.
- Fraile-Ribot, P. A., Cabot, G., Mulet, X., Periañez, L., Martín-Pena, M. L., Juan, C., Pérez, J. L., & Oliver, A. (2018). Mechanisms leading to in vivo ceftolozane/tazobactam resistance development during the treatment of infections caused by MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(3), 658-663. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx424>
- Fukuta, Y., Muder, R. R., Agha, M. E., Clarke, L. G., Wagener, M. M., Hensler, A. M., & Doi, Y. (2013). Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among cancer patients. *American Journal of Infection Control*, 41(12), 1249-1252. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2013.04.003>
- Fung-Tomc, J., Bush, K., Minassian, B., Kolek, B., Flamm, R., Gradelski, E., & Bonner, D. (1997). Antibacterial activity of BMS-180680, a new catechol-containing monobactam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(5), 1010-1016. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.5.1010>
- Gaillot, S., Oueslati, S., Vuilleminot, J.-B., Bour, M., Iorga, B. I., Triponney, P., Plésiat, P., Bonnin, R. A., Naas, T., Jeannot, K., & Potron, A. (2023). Genomic characterization of an NDM-9-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate and role of Glu152Lys substitution in the enhanced cefiderocol hydrolysis of NDM-9. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1253160>

- Garnacho-Montero, J., Amaya-Villar, R., Ferrándiz-Millón, C., Díaz-Martín, A., López-Sánchez, J. M., & Gutiérrez-Pizarra, A. (2015). Optimum treatment strategies for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 13(6), 769-777. <https://doi.org/10.1586/14787210.2015.1032254>
- Gehrlein, M., Lying, H., Cullmann, W., Wendt, S., & Opferkuch, W. (1991). Imipenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* Is Due to Altered Penicillin-Binding Proteins. *Chemotherapy*, 37(6), 405-412. <https://doi.org/10.1159/000238887>
- Gerner-Smidt, P. (1992). Ribotyping of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(10), 2680-2685. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.10.2680-2685.1992>
- Gerner-Smidt, P., & Tjernberg, I. (1993). *Acinetobacter* in Denmark : II. Molecular studies of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *APMIS*, 101(7-12), 826-832. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1993.tb00187.x>
- Giannouli, M., Antunes, L. C., Marchetti, V., Triassi, M., Visca, P., & Zarrilli, R. (2013). Virulence-related traits of epidemic *Acinetobacter baumannii* strains belonging to the international clonal lineages I-III and to the emerging genotypes ST25 and ST78. *BMC Infectious Diseases*, 13(1), 282. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-282>
- Gill, C. M., Abdelraouf, K., Oota, M., Nakamura, R., Kuroiwa, M., Ishioka, Y., Takemura, M., Yamano, Y., & Nicolau, D. P. (2022). Assessment of sustained efficacy and resistance emergence under human-simulated exposure of cefiderocol against *Acinetobacter baumannii* using in vitro chemostat and in vivo murine infection models. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 4(3), dlac047. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlac047>
- Godeux, A.-S., Lupo, A., Haenni, M., Guette-Marquet, S., Wilharm, G., Laaberki, M.-H., & Charpentier, X. (2018a). Fluorescence-Based Detection of Natural Transformation in Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology*, 200(19), 14.
- Godeux, A.-S., Lupo, A., Haenni, M., Guette-Marquet, S., Wilharm, G., Laaberki, M.-H., & Charpentier, X. (2018b). Fluorescence-Based Detection of Natural Transformation in Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology*, 200(19), e00181-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00181-18>
- Gouby, A., Carles-Nurit, M. J., Bouziges, N., Bourg, G., Mesnard, R., & Bouvet, P. J. (1992). Use of pulsed-field gel electrophoresis for investigation of hospital outbreaks of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(6), 1588-1591. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.6.1588-1591.1992>
- Gouy, M., Guindon, S., & Gascuel, O. (2010). SeaView Version 4 : A Multiplatform Graphical User Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic Tree Building. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2), 221-224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
- Graña-Miraglia, L., Lozano, L. F., Velázquez, C., Volkow-Fernández, P., Pérez-Oseguera, Á., Cevallos, M. A., & Castillo-Ramírez, S. (2017). Rapid Gene Turnover as a Significant Source of Genetic Variation in a Recently Seeded Population of a Healthcare-Associated Pathogen. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.01817>
- Grosjean, M., Tazrout, S., Bour, M., Triponey, P., Muller, C., Jeannot, K., & Plésiat, P. (2021). Reassessment of the cooperativity between efflux system MexAB-OprM and cephalosporinase AmpC in the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to β -lactams. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(2), 536-539. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa462>

- Gross, M. (2019). The race against antibiotics resistance. *Current Biology*, 29(18), R859-R861. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.09.003>
- Hajikhani, B., Sameni, F., Ghazanfari, K., Abdolali, B., Yazdanparast, A., Asarehzadegan Dezfuli, A., Nasiri, M. J., Goudarzi, M., & Dadashi, M. (2023). Prevalence of *bla*_{NDM}-producing *Acinetobacter baumannii* strains isolated from clinical samples around the world; a systematic review. *Gene Reports*, 30, 101728. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2022.101728>
- Hamidian, M., & Hall, R. M. (2013). IS*Aba1* targets a specific position upstream of the intrinsic *ampC* gene of *Acinetobacter baumannii* leading to cephalosporin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(11), 2682-2683. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt233>
- Hamidian, M., & Hall, R. M. (2014). Resistance to third-generation cephalosporins in *Acinetobacter baumannii* due to horizontal transfer of a chromosomal segment containing IS*Aba1-ampC*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(10), 2865-2866. <https://doi.org/10.1093/jac/dku202>
- Hamidian, M., Hancock, D. P., & Hall, R. M. (2013). Horizontal transfer of an IS*Aba125*-activated *ampC* gene between *Acinetobacter baumannii* strains leading to cephalosporin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(1), 244-245. <https://doi.org/10.1093/jac/dks345>
- Hamidian, M., Maharjan, R. P., Farrugia, D. N., Delgado, N. N., Dinh, H., Short, F. L., Kostoulas, X., Peleg, A. Y., Paulsen, I. T., & Cain, A. K. (2022). Genomic and phenotypic analyses of diverse non-clinical *Acinetobacter baumannii* strains reveals strain-specific virulence and resistance capacity. *Microbial Genomics*, 8(2), 000765. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000765>
- Hamidian, M., & Nigro, S. J. (2019). Emergence, molecular mechanisms and global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Genomics*, 5(10), e000306. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000306>
- He, Y., Wang, Y., Ma, X., Zhao, L., Guan, J., Zhao, J., Yu, W., Li, Y., Ni, W., & Gao, Z. (2022). Resistance to Cefiderocol Involved Expression of PER-1 β -Lactamase and Downregulation of Iron Transporter System in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Infection and Drug Resistance*, 15, 7177-7187. <https://doi.org/10.2147/IDR.S392241>
- Henrichsen, J. (1972). Bacterial surface translocation : A survey and a classification. *Bacteriological Reviews*, 36(4), 478-503.
- Héritier, C., Poirel, L., Fournier, P.-E., Claverie, J.-M., Raoult, D., & Nordmann, P. (2005). Characterization of the Naturally Occurring Oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(10), 4174-4179. <https://doi.org/10.1128/aac.49.10.4174-4179.2005>
- Héritier, C., Poirel, L., & Nordmann, P. (2006). Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of IS*Aba1* in *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology and Infection*, 12(2), 123-130. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01320.x>
- Hobson, C. A., Cointe, A., Jacquier, H., Choudhury, A., Magnan, M., Courroux, C., Tenaillon, O., Bonacorsi, S., & Birgy, A. (2021). Cross resistance to cefiderocol and ceftazidime-avibactam in KPC beta-lactamase mutants and inoculum effect. *Clinical Microbiology and Infection*. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.04.016>
- Hsieh, Y.-C., Wang, S.-H., Chen, Y.-Y., Lin, T.-L., Shie, S.-S., Huang, C.-T., Lee, C.-H., Chen, Y.-C., Quyen, T. L. T., & Pan, Y.-J. (2020). Association of capsular types with carbapenem resistance, disease severity, and mortality in *Acinetobacter baumannii*. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 2094-2104. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1822757>

- Hu, F., Guo, Y., Yang, Y., Zheng, Y., Wu, S., Jiang, X., Zhu, D., Wang, F., & on behalf of the China Antimicrobial Surveillance Network (CHINET) Study Group. (2019). Resistance reported from China antimicrobial surveillance network (CHINET) in 2018. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38(12), 2275-2281. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03673-1>
- Hu, F., Guo, Y., Zhu, D.-M., Wang, F., Jiang, X.-F., Xu, Y.-C., Zhang, X.-J., Zhang, C.-X., Ji, P., Xie, Y., Kang, M., Wang, C.-Q., Wang, A.-M., Xu, Y.-H., Shen, J.-L., Sun, Z.-Y., Chen, Z.-J., Ni, Y.-X., Sun, J.-Y., ... Huang, W. (2016). Resistance trends among clinical isolates in China reported from CHINET surveillance of bacterial resistance, 2005–2014. *Clinical Microbiology and Infection*, 22, S9-S14. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.01.001>
- Hu, W., Yao, S.-M., Fung, C.-P., Hsieh, Y.-P., Liu, C.-P., & Lin, J.-F. (2007). An OXA-66/OXA-51-Like Carbapenemase and Possibly an Efflux Pump Are Associated with Resistance to Imipenem in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(11), 3844-3852. <https://doi.org/10.1128/aac.01512-06>
- Hujer, A., Hujer, K. M., Leonard, D. A., Powers, R. A., Wallar, B. J., Mack, A. R., Taracila, M. A., Rather, P. N., Higgins, P. G., Prati, F., Caselli, E., Marshall, S. H., Clarke, T., Greco, C., Venepally, P., Brinkac, L., Kreiswirth, B. N., Fouts, D. E., & Bonomo, R. A. (2021). A comprehensive and contemporary “snapshot” of β -lactamases in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 99(2), 115242. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115242>
- Hujer, K., Hamza, N. S., Hujer, A. M., Perez, F., Helfand, M. S., Bethel, C. R., Thomson, J. M., Anderson, V. E., Barlow, M., Rice, L. B., Tenover, F. C., & Bonomo, R. A. (2005). Identification of a New Allelic Variant of the *Acinetobacter baumannii* Cephalosporinase, ADC-7 β -Lactamase : Defining a Unique Family of Class C Enzymes. *ANTIMICROB. AGENTS CHEMOTHER.*, 49, 8.
- Hunger, M., Schmucker, R., Kishan, V., & Hillen, W. (1990). Analysis and nucleotide sequence of an origin of an origin of DNA replication in *Acinetobacter calcoaceticus* and its use for *Escherichia coli* shuttle plasmids. *Gene*, 87(1), 45-51. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90494-C](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90494-C)
- Huys, G., Cnockaert, M., Nemec, A., & Swings, J. (2005). Sequence-Based Typing of *adeB* as a Potential Tool To Identify Intraspecific Groups among Clinical Strains of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), 5327-5331. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.10.5327-5331.2005>
- Ingti, B., Upadhyay, S., Hazarika, M., Khyriem, A. B., Paul, D., Bhattacharya, P., Joshi, S. R., Bora, D., Dhar, D., & Bhattacharjee, A. (2020). Distribution of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* with *bla*_{ADC-30} and induction of ADC-30 in response to beta-lactam antibiotics. *Research in Microbiology*, 171(3), 128-133. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2020.01.002>
- Iovleva. (2019). Genome Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* (CRAB) in the United States. *Open Forum Infectious Diseases*, 6(Supplement_2), S295. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz360.706>
- Iregui, A., Khan, Z., Landman, D., & Quale, J. (2020). Activity of Cefiderocol Against Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* Endemic to Medical Centers in New York City. *Microbial Drug Resistance*, 26(7), 722-726. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0298>
- Ito, A., Nishikawa, T., Matsumoto, S., Yoshizawa, H., Sato, T., Nakamura, R., Tsuji, M., & Yamano, Y. (2016). Siderophore Cephalosporin Cefiderocol Utilizes Ferric Iron Transporter Systems for

- Antibacterial Activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(12), 7396-7401. <https://doi.org/10.1128/AAC.01405-16>
- Ito, A., Sato, T., Ota, M., Takemura, M., Nishikawa, T., Toba, S., Kohira, N., Miyagawa, S., Ishibashi, N., Matsumoto, S., Nakamura, R., Tsuji, M., & Yamano, Y. (2018). In Vitro Antibacterial Properties of Cefiderocol, a Novel Siderophore Cephalosporin, against Gram-Negative Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(1). <https://doi.org/10.1128/AAC.01454-17>
- Ito-Horiyama, T., Ishii, Y., Ito, A., Sato, T., Nakamura, R., Fukuhara, N., Tsuji, M., Yamano, Y., Yamaguchi, K., & Tateda, K. (2016). Stability of Novel Siderophore Cephalosporin S-649266 against Clinically Relevant Carbapenemases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(7), 4384-4386. <https://doi.org/10.1128/AAC.03098-15>
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC β -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 161-182. <https://doi.org/10.1128/cmr.00036-08>
- Jeannot, K., Gaillot, S., Triponney, P., Portets, S., Pourchet, V., Fournier, D., & Potron, A. (2023). Performance of the Disc Diffusion Method, MTS Gradient Tests and Two Commercially Available Microdilution Tests for the Determination of Cefiderocol Susceptibility in *Acinetobacter* spp. *Microorganisms*, 11(8), 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11081971>
- Jeon, J. H., Hong, M.-K., Lee, J. H., Lee, J. J., Park, K. S., Karim, A. M., Jo, J. Y., Kim, J. H., Ko, K. S., Kang, L.-W., & Lee, S. H. (2014). Structure of ADC-68, a novel carbapenem-hydrolyzing class C extended-spectrum β -lactamase isolated from *Acinetobacter baumannii*. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 70(11), 2924-2936. <https://doi.org/10.1107/S1399004714019543>
- Jeong, H. W., Cheong, H. J., Kim, W. J., Kim, M. J., Song, K.-J., Song, J.-W., Kim, H. S., & Roh, K. H. (2009). Loss of the 29-Kilodalton Outer Membrane Protein in the Presence of OXA-51-Like Enzymes in *Acinetobacter baumannii* Is Associated with Decreased Imipenem Susceptibility. *Microbial Drug Resistance*, 15(3), 151-158. <https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0828>
- Jia, H., Chen, Y., Wang, J., & Ruan, Z. (2019). Genomic characterisation of a clinical *Acinetobacter baumannii* ST1928 isolate carrying a new *ampC* allelic variant *bla*_{ADC-196} gene from China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 19, 43-45. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.08.015>
- Johnson, T. L., Waack, U., Smith, S., Mobley, H., & Sandkvist, M. (2016). *Acinetobacter baumannii* Is Dependent on the Type II Secretion System and Its Substrate LipA for Lipid Utilization and In Vivo Fitness. *Journal of Bacteriology*, 198(4), 711-719. <https://doi.org/10.1128/jb.00622-15>
- Jousset, A. B., Bouabdallah, L., Birer, A., Rosinski-Chupin, I., Mariet, J.-F., Oueslati, S., Emeraud, C., Girlich, D., Glaser, P., Naas, T., Bonnin, R. A., & Dortet, L. (2023). Population Analysis of *Escherichia coli* Sequence Type 361 and Reduced Cefiderocol Susceptibility, France. *Emerging Infectious Diseases*, 29(9), 1877-1881. <https://doi.org/10.3201/eid2909.230390>
- Juan, C., Torrens, G., González-Nicolau, M., & Oliver, A. (2017). Diversity and regulation of intrinsic β -lactamases from non-fermenting and other Gram-negative opportunistic pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(6), 781-815. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux043>
- Jun, S. H., Lee, D. E., Hwang, H. R., Kim, N., Kim, H. J., Lee, Y. C., Kim, Y. K., & Lee, J. C. (2021). Clonal change of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in a Korean hospital. *Infection, Genetics and Evolution*, 93, 104935. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104935>

- Kang, K., & Boll, J. M. (2022). PBP1A Directly Interacts with the Divisome Complex to Promote Septal Peptidoglycan Synthesis in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology*, 204(12), e00239-22. <https://doi.org/10.1128/jb.00239-22>
- Kang, K., Kazi, M. I., Biboy, J., Gray, J., Bovermann, H., Ausman, J., Boutte, C. C., Vollmer, W., & Boll, J. M. (2021). Septal Class A Penicillin-Binding Protein Activity and Id-Transpeptidases Mediate Selection of Colistin-Resistant Lipooligosaccharide-Deficient *Acinetobacter baumannii*. *mBio*, 12(1), e02185-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.02185-20>
- Kang, W., Zheng, J., Bao, J., Wang, Z., Zheng, Y., He, J.-Z., & Hu, H.-W. (2020). Characterization of the copper resistance mechanism and bioremediation potential of an *Acinetobacter calcoaceticus* strain isolated from copper mine sludge. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(8), 7922-7933. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-07303-3>
- Karah, N., Sundsfjord, A., Towner, K., & Samuelsen, Ø. (2012). Insights into the global molecular epidemiology of carbapenem non-susceptible clones of *Acinetobacter baumannii*. *Drug Resistance Updates*, 15(4), 237-247. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2012.06.001>
- Karruli, A., Massa, A., Andini, R., Marrazzo, T., Ruocco, G., Zampino, R., & Durante-Mangoni, E. (2023). Clinical efficacy and safety of cefiderocol for resistant Gram-negative infections : A real-life, single-centre experience. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 61(2), 106723. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2023.106723>
- Kawai, A., McElheny, C. L., Iovleva, A., Kline, E. G., Sluis-Cremer, N., Shields, R. K., & Doi, Y. (2020). Structural Basis of Reduced Susceptibility to Ceftazidime-Avibactam and Cefiderocol in *Enterobacter cloacae* Due to AmpC R2 Loop Deletion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(7), e00198-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00198-20>
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 9. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>
- Khan, A. U., Maryam, L., & Zarrilli, R. (2017). Structure, Genetics and Worldwide Spread of New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM) : A threat to public health. *BMC Microbiology*, 17(1), 101. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1012-8>
- Kim, A., Kutschke, A., Ehmann, D. E., Patey, S. A., Crandon, J. L., Gorseth, E., Miller, A. A., McLaughlin, R. E., Blinn, C. M., Chen, A., Nayar, A. S., Dangel, B., Tsai, A. S., Rooney, M. T., Murphy-Benenato, K. E., Eakin, A. E., & Nicolau, D. P. (2015). Pharmacodynamic Profiling of a Siderophore-Conjugated Monocarbam in *Pseudomonas aeruginosa*: Assessing the Risk for Resistance and Attenuated Efficacy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(12), 7743-7752. <https://doi.org/10.1128/AAC.00831-15>
- Kim, B., Peleg, A. Y., Lodise, T. P., Lipman, J., Li, J., Nation, R., & Paterson, D. L. (2009). Management of meningitis due to antibiotic-resistant *Acinetobacter* species. *The Lancet infectious diseases*, 9(4), 245-255. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70055-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70055-6)
- Kim, J., Jung, H. I., An, Y. J., Lee, J. H., Kim, S. J., Jeong, S. H., Lee, K. J., Suh, P.-G., Lee, H.-S., Lee, S. H., & Cha, S.-S. (2006). Structural basis for the extended substrate spectrum of CMY-10, a plasmid-encoded class C β -lactamase. *Molecular Microbiology*, 60(4), 907-916. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05146.x>
- Kohira, N., West, J., Ito, A., Ito-Horiyama, T., Nakamura, R., Sato, T., Rittenhouse, S., Tsuji, M., & Yamano, Y. (2016). In Vitro Antimicrobial Activity of a Siderophore Cephalosporin, S-649266, against *Enterobacteriaceae* Clinical Isolates, Including Carbapenem-Resistant Strains.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(2), 729-734. <https://doi.org/10.1128/AAC.01695-15>
- Kollef, M., Dupont, H., Greenberg, D. E., Viale, P., Echols, R., Yamano, Y., & Nicolau, D. P. (2023). Prospective role of cefiderocol in the management of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: Review of the evidence. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 62(2), 106882. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2023.106882>
- Kraniotaki, E., Manganeli, R., Platsouka, E., Grossato, A., Paniara, O., & Palù, G. (2006). Molecular investigation of an outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, with characterisation of class 1 integrons. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28(3), 193-199. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.04.016>
- Krizova, L., & Nemec, A. (2010). A 63 kb genomic resistance island found in a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate of European clone I from 1977. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(9), 1915-1918. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq223>
- Kuo, H.-Y., Yang, C.-M., Lin, M.-F., Cheng, W.-L., Tien, N., & Liou, M.-L. (2010). Distribution of *bla*_{OXA}-carrying imipenem-resistant *Acinetobacter* spp. In 3 hospitals in Taiwan. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 66(2), 195-199. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.09.013>
- Kyriakidis, I., Vasileiou, E., Pana, Z. D., & Tragiannidis, A. (2021). *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens*, 10(3), 3. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030373>
- Lasarte, C., Guijarro-Sánchez, P., Vázquez Ucha, J., Alonso-Garcia, I., Alvarez Fraga, L., Outeda, M., Martínez-Gutián, M., Peña-Escolano, A., Maceiras, R., Lence, E., González-Bello, C., Arca-Suárez, J., Bou, G., & Beceiro, A. (2023). Antimicrobial Activity of Cefiderocol against the Carbapenemase-Producing *Enterobacter cloacae* Complex and Characterization of Reduced Susceptibility Associated with Metallo- β -Lactamase VIM-1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 67. <https://doi.org/10.1128/aac.01505-22>
- Lautrop, H. (1961). *Bacterium anitratum* transferred to the Genus Cytophaga. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy*, 11(3), 107-108.
- Lee, C., Lee, J. H., Park, K. S., Kim, Y. B., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2016). Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00895>
- Lee, C., Lee, J. H., Park, M., Park, K. S., Bae, I. K., Kim, Y. B., Cha, C.-J., Jeong, B. C., & Lee, S. H. (2017). Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00055>
- Lee, H.-Y., Hsu, S.-Y., Hsu, J.-F., Chen, C.-L., Wang, Y.-H., & Chiu, C.-H. (2018). Risk factors and molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* bacteremia in neonates. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 51(3), 367-376. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2017.07.013>
- Lee, Y. R., & Burton, C. E. (2019). Eravacycline, a newly approved fluorocycline. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 38(10), 1787-1794. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03590-3>
- Lee, Y., Yum, J. H., Kim, C.-K., Yong, D., Jeon, E. H., Jeong, S. H., Ahn, J. Y., & Lee, K. (2010). Role of OXA-23 and AdeABC Efflux Pump for Acquiring Carbapenem Resistance in an *Acinetobacter*

- baumannii* Strain Carrying the blaOXA-66 Gene. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 40(1), 43-48.
- Lemos, E. V., de la Hoz, F. P., Einarson, T. R., McGhan, W. F., Quevedo, E., Castañeda, C., & Kawai, K. (2014). Carbapenem resistance and mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* infection: Systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(5), 416-423. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12363>
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: An online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W293-W296. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(5), 5. <https://doi.org/10.1038/nrd3975>
- Li, H., Liu, F., Zhang, Y., Wang, X., Zhao, C., Chen, H., Zhang, F., Zhu, B., Hu, Y., & Wang, H. (2015). Evolution of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Revealed through Whole-Genome Sequencing and Comparative Genomic Analysis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(2), 1168-1176. <https://doi.org/10.1128/AAC.04609-14>
- Li, P., Ying, J., Yang, G., Li, A., Wang, J., Lu, J., Wang, J., Xu, T., Yi, H., Li, K., Jin, S., Bao, Q., & Zhang, K. (2016). Structure-Function Analysis of the Transmembrane Protein AmpG from *Pseudomonas aeruginosa*. *PLOS ONE*, 11(12), e0168060. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168060>
- Li, X., Quan, J., Yang, Y., Ji, J., Liu, L., Fu, Y., Hua, X., Chen, Y., Pi, B., Jiang, Y., & Yu, Y. (2016). Abrp, a new gene, confers reduced susceptibility to tetracycline, glycylcine, chloramphenicol and fosfomycin classes in *Acinetobacter baumannii*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(8), 1371-1375. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2674-0>
- Lin, M.-F., Lin, Y.-Y., & Lan, C.-Y. (2015). The Role of the Two-Component System BaeSR in Disposing Chemicals through Regulating Transporter Systems in *Acinetobacter baumannii*. *PLOS ONE*, 10(7), e0132843. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132843>
- Lin, M.-F., Lin, Y.-Y., Yeh, H.-W., & Lan, C.-Y. (2014). Role of the BaeSR two-component system in the regulation of *Acinetobacter baumannii* *adeAB* genes and its correlation with tigecycline susceptibility. *BMC Microbiology*, 14(1), 119. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-119>
- 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(4), 582-610. <https://doi.org/10.1128/cmr.00040-09>
- Liu, X., Chang, Y., Xu, Q., Zhang, W., Huang, Z., Zhang, L., Weng, S., Leptihn, S., Jiang, Y., Yu, Y., & Hua, X. (2023). Mutation in the two-component regulator BaeSR mediates cefiderocol resistance and enhances virulence in *Acinetobacter baumannii*. *mSystems*, 0(0), e01291-22. <https://doi.org/10.1128/msystems.01291-22>
- Livermore, D. M. (1992). Interplay of impermeability and chromosomal beta-lactamase activity in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(9), 2046-2048. <https://doi.org/10.1128/aac.36.9.2046>
- Livermore, D. M. (2005). Tigecycline : What is it, and where should it be used? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(4), 611-614. <https://doi.org/10.1093/jac/dki291>
- Livermore, D. M., & Tulkens, P. M. (2009). Temocillin revived. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(2), 243-245. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn511>
- Longo, B., Pantosti, A., Luzzi, I., Placanica, P., Gallo, S., Tarasi, A., Sora, F. D., Monaco, M., Dionisi, A. M., Volpe, I., Montella, F., Cassone, A., & Rezza, G. (2006). An outbreak of *Acinetobacter*

- baumannii* in an intensive care unit: Epidemiological and molecular findings. *Journal of Hospital Infection*, 64(3), 303-305. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2006.07.010>
- Łopińska, A., Indykiewicz, P., Skieba, E., Pfeifer, Y., Trček, J., Jerzak, L., Minias, P., Nowakowski, J., Ledwoń, M., Betleja, J., & Wilharm, G. (2020). Low Occurrence of in Gulls and Songbirds. *Polish Journal of Microbiology*, 69(1), 85-90. <https://doi.org/10.33073/pjm-2020-011>
- Lötsch, F., Albiger, B., Monnet, D. L., Struelens, M. J., Seifert, H., Kohlenberg, A., & Group, E. A. R. G. S. N. (EURGen-N. carbapenem-resistant *A. baumannii* capacity survey. (2020). Epidemiological situation, laboratory capacity and preparedness for carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Europe, 2019. *Eurosurveillance*, 25(45), 2001735. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.45.2001735>
- Luscher, A., Moynié, L., Auguste, P. S., Bumann, D., Mazza, L., Pletzer, D., Naismith, J. H., & Köhler, T. (2018). TonB-Dependent Receptor Repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* for Uptake of Siderophore-Drug Conjugates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(6), 10.1128/aac.00097-18. <https://doi.org/10.1128/aac.00097-18>
- Mack, A. R., Barnes, M. D., Taracila, M. A., Hujer, A. M., Hujer, K. M., Cabot, G., Feldgarden, M., Haft, D. H., Klimke, W., van den Akker, F., Vila, A. J., Smania, A., Haider, S., Papp-Wallace, K. M., Bradford, P. A., Rossolini, G. M., Docquier, J.-D., Frère, J.-M., Galleni, M., ... Bonomo, R. A. (2020). A Standard Numbering Scheme for Class C β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(3), 10.1128/aac.01841-19. <https://doi.org/10.1128/aac.01841-19>
- Magnet, S., Courvalin, P., & Lambert, T. (2001). Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(12), 3375-3380. <https://doi.org/10.1128/aac.45.12.3375-3380.2001>
- Malik, S., Kaminski, M., Landman, D., & Quale, J. (2020). Cefiderocol Resistance in *Acinetobacter baumannii*: Roles of β -Lactamases, Siderophore Receptors, and Penicillin Binding Protein 3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(11). <https://doi.org/10.1128/AAC.01221-20>
- Mammeri, H., Guillon, H., Eb, F., & Nordmann, P. (2010). Phenotypic and Biochemical Comparison of the Carbapenem-Hydrolyzing Activities of Five Plasmid-Borne AmpC β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), 4556-4560. <https://doi.org/10.1128/aac.01762-09>
- Mammeri, H., Nordmann, P., Berkani, A., & Eb, F. (2008). Contribution of extended-spectrum AmpC (ESAC) β -lactamases to carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 282(2), 238-240. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01126.x>
- Manring, M. M., Hawk, A., Calhoun, J. H., & Andersen, R. C. (2009). Treatment of War Wounds: A Historical Review. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 467(8), 2168-2191. <https://doi.org/10.1007/s11999-009-0738-5>
- 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(9), 3298-3304. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.9.3298-3304.2004>
- Mateo-Estrada, V., Graña-Miraglia, L., López-Leal, G., & Castillo-Ramírez, S. (2019). Phylogenomics Reveals Clear Cases of Misclassification and Genus-Wide Phylogenetic Markers for *Acinetobacter*. *Genome Biology and Evolution*, 11(9), 2531-2541. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz178>

- Mateo-Estrada, V., Tyrrell, C., Evans, B. A., Aguilar-Vera, A., Drissner, D., Castillo-Ramirez, S., & Walsh, F. (2023). *Acinetobacter baumannii* from grass: Novel but non-resistant clones. *Microbial Genomics*, 9(7), 001054. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001054>
- Mateo-Estrada, V., Vali, L., Hamouda, A., Evans, B. A., & Castillo-Ramírez, S. (2022). *Acinetobacter baumannii* Sampled from Cattle and Pigs Represent Novel Clones. *Microbiology Spectrum*, 10(4), e01289-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.01289-22>
- McPherson, C. J., Aschenbrenner, L. M., Lacey, B. M., Fahnoe, K. C., Lemmon, M. M., Finegan, S. M., Tadakamalla, B., O'Donnell, J. P., Mueller, J. P., & Tomaras, A. P. (2012). Clinically Relevant Gram-Negative Resistance Mechanisms Have No Effect on the Efficacy of MC-1, a Novel Siderophore-Conjugated Monocarbam. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(12), 6334-6342. <https://doi.org/10.1128/AAC.01345-12>
- McQueary, C. N., Kirkup, B. C., Si, Y., Barlow, M., Actis, L. A., Craft, D. W., & Zurawski, D. V. (2012). Extracellular stress and lipopolysaccharide modulate *Acinetobacter baumannii* surface-associated motility. *Journal of Microbiology*, 50(3), 434-443. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1555-1>
- Micelli, C., Dai, Y., Raustad, N., Isberg, R. R., Dowson, C. G., Lloyd, A. J., Geisinger, E., Crow, A., & Roper, D. I. (2023). A conserved zinc-binding site in *Acinetobacter baumannii* PBP2 required for elongasome-directed bacterial cell shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(8). <https://doi.org/10.1073/pnas.2215237120>
- Möllmann, U., Heinisch, L., Bauernfeind, A., Köhler, T., & Ankel-Fuchs, D. (2009). Siderophores as drug delivery agents : Application of the “Trojan Horse” strategy. *BioMetals*, 22(4), 615-624. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9219-2>
- Morris, F. C., Dexter, C., Kostoulas, X., Uddin, M. I., & Peleg, A. Y. (2019). The Mechanisms of Disease Caused by *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01601>
- Moskowitz, S. M., Brannon, M. K., Dasgupta, N., Pier, M., Sgambati, N., Miller, A. K., Selgrade, S. E., Miller, S. I., Denton, M., Conway, S. P., Johansen, H. K., & Høiby, N. (2012). PmrB Mutations Promote Polymyxin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Colistin-Treated Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(2), 1019-1030. <https://doi.org/10.1128/AAC.05829-11>
- Moynié, L., Luscher, A., Rolo, D., Pletzer, D., Tortajada, A., Weingart, H., Braun, Y., Page, M. G. P., Naismith, J. H., & Köhler, T. (2017). Structure and Function of the PiuA and PirA Siderophore-Drug Receptors from *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4), e02531-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02531-16>
- Murray, C., Hinkle, M. K., & Yun, H. C. (2008). History of Infections Associated With Combat-Related Injuries. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 64(3), S221. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e318163c40b>
- Murray, C., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Mushtaq, S., Sadouki, Z., Vickers, A., Livermore, D. M., & Woodford, N. (2020). In vitro activity of cefiderocol, a siderophore cephalosporin, against multidrug-resistant Gram-negative bacteria.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(12), 10.1128/aac.01582-20. <https://doi.org/10.1128/aac.01582-20>
- Mussi, M. A., Limansky, A. S., & Viale, A. M. (2005). Acquisition of Resistance to Carbapenems in Multidrug-Resistant Clinical Strains of *Acinetobacter baumannii*: Natural Insertional Inactivation of a Gene Encoding a Member of a Novel Family of β -Barrel Outer Membrane Proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(4), 1432-1440. <https://doi.org/10.1128/aac.49.4.1432-1440.2005>
- Naas, T., Oueslati, S., Bonnin, R. A., Dabos, M. L., Zavala, A., Dortet, L., Retailleau, P., & Iorga, B. I. (2017). Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 917-919. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1344235>
- Naha, A., Vijayakumar, S., Lal, B., Shankar, B. A., Chandran, S., Ramaiah, S., Veeraraghavan, B., & Anbarasu, A. (2021). Genome sequencing and molecular characterisation of XDR *Acinetobacter baumannii* reveal complexities in resistance: Novel combination of sulbactam–durlobactam holds promise for therapeutic intervention. *Journal of Cellular Biochemistry*, 122(12), 1946-1957. <https://doi.org/10.1002/jcb.30156>
- Nelson, K., Rubio-Aparicio, D., Tsivkovski, R., Sun, D., Totrov, M., Dudley, M., & Lomovskaya, O. (2020). In Vitro Activity of the Ultra-Broad-Spectrum Beta-Lactamase Inhibitor QPX7728 in Combination with Meropenem against Clinical Isolates of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(11), e01406-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01406-20>
- Nemec, A., Maixnerová, M., van der Reijden, T. J. K., van den Broek, P. J., & Dijkshoorn, L. (2007). Relationship between the AdeABC efflux system gene content, netilmicin susceptibility and multidrug resistance in a genotypically diverse collection of *Acinetobacter baumannii* strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(3), 483-489. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm231>
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J., & Buchanan, S. K. (2010). TonB-dependent transporters: Regulation, structure, and function. *Annual Review of Microbiology*, 64, 43-60. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134247>
- Nordmann, P., & Mammeri, H. (2007). Extended-spectrum cephalosporinases: Structure, detection and epidemiology. *Future Microbiology*, 2(3), 297-307. <https://doi.org/10.2217/17460913.2.3.297>
- Nukaga, M., Haruta, S., Tanimoto, K., Kogure, K., Taniguchi, K., Tamaki, M., & Sawai, T. (1995). Molecular Evolution of a Class C β -Lactamase Extending Its Substrate Specificity (*). *Journal of Biological Chemistry*, 270(11), 5729-5735. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.11.5729>
- Öncül, O., Keskin, Ö., Acar, H. V., Küçükardalı, Y., Evrenkaya, R., Atasoy, E. M., Top, C., Nalbant, S., Özkan, S., Emekdaş, G., Çavuşlu, Ş., Us, M. H., Pahsa, A., & Gökben, M. (2002). Hospital-acquired infections following the 1999 Marmara earthquake. *Journal of Hospital Infection*, 51(1), 47-51. <https://doi.org/10.1053/jhin.2002.1205>
- O'Neill, J. (2016). *Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations* (United Kingdom) [Report]. Government of the United Kingdom. <https://apo.org.au/node/63983>
- O'Shea, M. K. (2012). *Acinetobacter* in modern warfare. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(5), 363-375. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2012.01.018>
- Ovidiu Vrancianu, C., Florentina Pelcaru, C., Alistar, A., Gheorghe, I., Marutescu, L., Popa, M., Czobor, I., Gradisteanu, G., Georgiana Dobre, E., & Carmen Chifiriuc, M. (2020). Escaping from ESKAPE.

- Clinical Significance and Antibiotic Resistance Mechanisms in *Acinetobacter baumannii*: A Review. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11(1), 8190-8203. <https://doi.org/10.33263/BRIAC111.81908203>
- Page, M. G. P., Dantier, C., & Desarbres, E. (2010). In Vitro Properties of BAL30072, a Novel Siderophore Sulfactam with Activity against Multiresistant Gram-Negative Bacilli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(6), 2291-2302. <https://doi.org/10.1128/AAC.01525-09>
- Papp-Wallace, K. M. (2019). The latest advances in β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations for the treatment of Gram-negative bacterial infections. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 20(17), 2169-2184. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1660772>
- Papp-Wallace, K. M., Senkfor, B., Gatta, J., Chai, W., Taracila, M. A., Shanmugasundaram, V., Han, S., Zaniewski, R. P., Lacey, B. M., Tomaras, A. P., Skalweit, M. J., Harris, M. E., Rice, L. B., Buynak, J. D., & Bonomo, R. A. (2012). Early Insights into the Interactions of Different β -Lactam Antibiotics and β -Lactamase Inhibitors against Soluble Forms of *Acinetobacter baumannii* PBP1a and *Acinetobacter* sp. PBP3. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(11), 5687-5692. <https://doi.org/10.1128/AAC.01027-12>
- Park, Y. K., Peck, K. R., Cheong, H. S., Chung, D.-R., Song, J.-H., & Ko, K. S. (2009). Extreme Drug Resistance in *Acinetobacter baumannii* Infections in Intensive Care Units, South Korea. *Emerging Infectious Diseases*, 15(8), 1325-1327. <https://doi.org/10.3201/eid1508.080772>
- Paul, M., Carrara, E., Retamar, P., Tängdén, T., Bitterman, R., Bonomo, R. A., de Waele, J., Daikos, G. L., Akova, M., Harbarth, S., Pulcini, C., Garnacho-Montero, J., Seme, K., Tumbarello, M., Lindemann, P. C., Gandra, S., Yu, Y., Bassetti, M., Mouton, J. W., ... Rodríguez-Baño, J. (2022). European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European society of intensive care medicine). *Clinical Microbiology and Infection*, 28(4), 521-547. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.11.025>
- Peleg, A. Y., Adams, J., & Paterson, D. L. (2007). Tigecycline Efflux as a Mechanism for Nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(6), 2065-2069. <https://doi.org/10.1128/aac.01198-06>
- Peleg, A. Y., Seifert, H., & Paterson, D. L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3), 538-582. <https://doi.org/10.1128/cmr.00058-07>
- Penwell, W. F., Shapiro, A. B., Giacobbe, R. A., Gu, R.-F., Gao, N., Thresher, J., McLaughlin, R. E., Huband, M. D., DeJonge, B. L. M., Ehmann, D. E., & Miller, A. A. (2015). Molecular Mechanisms of Sulbactam Antibacterial Activity and Resistance Determinants in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(3), 1680-1689. <https://doi.org/10.1128/AAC.04808-14>
- Pérez, A., Pérez-Llarena, F. J., García, P., Kerff, F., Beceiro, A., Galleni, M., & Bou, G. (2014). New mutations in ADC-type β -lactamases from *Acinetobacter* spp. Affect cefoxitin and ceftazidime hydrolysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(9), 2407-2411. <https://doi.org/10.1093/jac/dku163>
- Périchon, B., Goussard, S., Walewski, V., Krizova, L., Cerqueira, G., Murphy, C., Feldgarden, M., Wortman, J., Clermont, D., Nemec, A., & Courvalin, P. (2014). Identification of 50 Class D β -Lactamases and 65 *Acinetobacter*-Derived Cephalosporinases in *Acinetobacter* spp.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2), 936-949. <https://doi.org/10.1128/aac.01261-13>
- Philippon, A., Arlet, G., Labia, R., & Iorga, B. I. (2022). Class C β -Lactamases: Molecular Characteristics. *Clinical Microbiology Reviews*, 35(3), e00150-21. <https://doi.org/10.1128/cmr.00150-21>
- Pimentel, J. D., Low, J., Styles, K., Harris, O. C., Hughes, A., & Athan, E. (2005). Control of an outbreak of multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit and a surgical ward. *Journal of Hospital Infection*, 59(3), 249-253. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.09.021>
- Poirel, L., Sadek, M., & Nordmann, P. (2021). Contribution of PER-Type and NDM-Type β -Lactamases to Cefiderocol Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(10), e0087721. <https://doi.org/10.1128/AAC.00877-21>
- Potron, A., Vuilleminot, J.-B., Puja, H., Triponney, P., Bour, M., Valot, B., Amara, M., Cavalié, L., Bernard, C., Parmeland, L., Reibel, F., Larrouy-Maumus, G., Dortet, L., Bonnin, R. A., & Plésiat, P. (2019). ISAbal-dependent overexpression of *eptA* in clinical strains of *Acinetobacter baumannii* resistant to colistin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(9), 2544-2550. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz241>
- Pournaras, S., Markogiannakis, A., Ikonomidis, A., Kondyli, L., Bethimouti, K., Maniatis, A. N., Legakis, N. J., & Tsakris, A. (2006). Outbreak of multiple clones of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates expressing OXA-58 carbapenemase in an intensive care unit. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(3), 557-561. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl004>
- Prajapati, J. D., Kleinekathöfer, U., & Winterhalter, M. (2021). How to Enter a Bacterium: Bacterial Porins and the Permeation of Antibiotics. *Chemical Reviews*, 121(9), 5158-5192. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c01213>
- Puglisi, M. P., Engel, S., Jensen, P. R., & Fenical, W. (2007). Antimicrobial activities of extracts from Indo-Pacific marine plants against marine pathogens and saprophytes. *Marine Biology*, 150(4), 531-540. <https://doi.org/10.1007/s00227-006-0376-3>
- 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(5), 1633-1641. <https://doi.org/10.1128/aac.50.5.1633-1641.2006>
- Quale, J., Bratu, S., Landman, D., & Heddurshetti, R. (2003). Molecular Epidemiology and Mechanisms of Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii* Endemic in New York City. *Clinical Infectious Diseases*, 37(2), 214-220. <https://doi.org/10.1086/375821>
- Rafei, R., Hamze, M., Pailhoriès, H., Eveillard, M., Marsollier, L., Joly-Guillou, M.-L., Dabboussi, F., & Kempf, M. (2015). Extrahuman Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(7), 2359-2367. <https://doi.org/10.1128/AEM.03824-14>
- Rafei, R., Kempf, M., Eveillard, M., Dabboussi, F., Hamze, M., & Joly-Guillou, M.-L. (2014). Current molecular methods in epidemiological typing of *Acinetobacter baumannii*. *Future Microbiology*, 9(10), 1179-1194. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.63>
- Rafei, R., Osman, M., Dabboussi, F., & Hamze, M. (2019). Update on the epidemiological typing methods for *Acinetobacter baumannii*. *Future Microbiology*, 14(12), 1065-1080. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0134>
- Rahman, M., Shukla, S. K., Prasad, K. N., Ovejero, C. M., Pati, B. K., Tripathi, A., Singh, A., Srivastava, A. K., & Gonzalez-Zorn, B. (2014). Prevalence and molecular characterisation of New Delhi metallo- β -lactamases NDM-1, NDM-5, NDM-6 and NDM-7 in multidrug-resistant

- Enterobacteriaceae* from India. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(1), 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.03.003>
- Ramirez, M. S., Bonomo, R. A., & Tolmasky, M. E. (2020). Carbapenemases: Transforming *Acinetobacter baumannii* into a yet more dangerous menace. *Biomolecules*, 10(5), 5. <https://doi.org/10.3390/biom10050720>
- Rangel, K., Chagas, T. P. G., & De-Simone, S. G. (2021). *Acinetobacter baumannii* Infections in Times of COVID-19 Pandemic. *Pathogens*, 10(8), 8. <https://doi.org/10.3390/pathogens10081006>
- Rangel, K., & De-Simone, S. G. (2023). *Acinetobacter baumannii* during COVID-19 : What Is the Real Pandemic? *Pathogens*, 12(1), 1. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010041>
- Rayner, B., D. Verderosa, A., Ferro, V., & T. Blaskovich, M. A. (2023). Siderophore conjugates to combat antibiotic-resistant bacteria. *RSC Medicinal Chemistry*, 14(5), 800-822. <https://doi.org/10.1039/D2MD00465H>
- Reed, P., Veiga, H., Jorge, A. M., Terrak, M., & Pinho, M. G. (2011). Monofunctional Transglycosylases Are Not Essential for *Staphylococcus aureus* Cell Wall Synthesis. *Journal of Bacteriology*, 193(10), 2549-2556. <https://doi.org/10.1128/jb.01474-10>
- Rodríguez-Martínez, J.-M., Nordmann, P., Ronco, E., & Poirel, L. (2010). Extended-Spectrum Cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(8), 3484-3488. <https://doi.org/10.1128/AAC.00050-10>
- Rodríguez-Martínez, J.-M., Poirel, L., & Nordmann, P. (2010). Genetic and Functional Variability of AmpC-Type β -Lactamases from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11), 4930-4933. <https://doi.org/10.1128/AAC.00427-10>
- Rubio, T., Gagné, S., Debruyne, C., Dias, C., Cluzel, C., Mongellaz, D., Rousselle, P., Göttig, S., Seifert, H., Higgins, P. G., & Salcedo, S. P. (2022). Incidence of an Intracellular Multiplication Niche among *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *mSystems*, 7(1), e00488-21. <https://doi.org/10.1128/msystems.00488-21>
- Rumbo, C., Tomás, M., Fernández Moreira, E., Soares, N. C., Carvajal, M., Santillana, E., Beceiro, A., Romero, A., & Bou, G. (2014). The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 Porin Is a Virulence Factor That Induces Apoptosis and Modulates Autophagy in Human Cells. *Infection and Immunity*, 82(11), 4666-4680. <https://doi.org/10.1128/iai.02034-14>
- Russo, T. A., MacDonald, U., Beanan, J. M., Olson, R., MacDonald, I. J., Saubaran, S. L., Luke, L. W., & Umland, T. C. (2009). Penicillin-binding protein 7/8 contributes to the survival of *Acinetobacter baumannii* in vitro and in vivo. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(4), 513-521. <https://doi.org/10.1086/596317>
- Sahl, J. W., Johnson, J. K., Harris, A. D., Phillippy, A. M., Hsiao, W. W., Thom, K. A., & Rasko, D. A. (2011). Genomic comparison of multi-drug resistant invasive and colonizing *Acinetobacter baumannii* isolated from diverse human body sites reveals genomic plasticity. *BMC Genomics*, 12(1), 291. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-291>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sarshar, M., Behzadi, P., Scribano, D., Palamara, A. T., & Ambrosi, C. (2021). *Acinetobacter baumannii*: An Ancient Commensal with Weapons of a Pathogen. *Pathogens*, 10(4), 4. <https://doi.org/10.3390/pathogens10040387>

- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., & Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 234-258. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x>
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2004). Status of the Microbial Census. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(4), 686-691. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.686-691.2004>
- Scott, P., Deye, G., Srinivasan, A., Murray, C., Moran, K., Hulten, E., Fishbain, J., Craft, D., Riddell, S., Lindler, L., Mancuso, J., Milstrey, E., Bautista, C. T., Patel, J., Ewell, A., Hamilton, T., Gaddy, C., Tenney, M., Christopher, G., ... Petrucci, B. (2007). An Outbreak of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex Infection in the US Military Health Care System Associated with Military Operations in Iraq. *Clinical Infectious Diseases*, 44(12), 1577-1584. <https://doi.org/10.1086/518170>
- Šedo, O., Nemec, A., Křížová, L., Kačalová, M., & Zdráhal, Z. (2013). Improvement of MALDI-TOF MS profiling for the differentiation of species within the *Acinetobacter calcoaceticus*—*Acinetobacter baumannii* complex. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(8), 572-578. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.08.001>
- Seifert, H., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Pelzer, N., Tjernberg, I., & Vaneechoutte, M. (1997). Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: Comparison of phenotypic and genotypic identification methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(11), 2819-2825. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.11.2819-2825.1997>
- Seshatri, S., Charan, J., Tak, V., Nag, V. L., Varthya, S. B., & Ambwani, S. (2023). Frequency of OXA-Type Carbapenemases among Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Clinical Isolates from Adult Intensive Care Unit in India. *Journal of Laboratory Physicians*, s-0043-1771243. <https://doi.org/10.1055/s-0043-1771243>
- Shi, X., Wang, H., Wang, X., Jing, H., Duan, R., Qin, S., Lv, D., Fan, Y., Huang, Z., Stirling, K., Zhang, L., & Wang, J. (2021). Molecular characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter baumannii* in cerebrospinal fluid and blood. *PLOS ONE*, 16(2), e0247418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247418>
- Shields, R. K., Paterson, D. L., & Tamma, P. D. (2023). Navigating Available Treatment Options for Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Complex Infections. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 76(Suppl 2), S179-S193. <https://doi.org/10.1093/cid/ciad094>
- Silley, P., Griffiths, J. W., Monsey, D., & Harris, A. M. (1990). Mode of action of GR69153, a novel catechol-substituted cephalosporin, and its interaction with the *tonB*-dependent iron transport system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(9), 1806-1808. <https://doi.org/10.1128/aac.34.9.1806>
- Simner, P. J., Beisken, S., Bergman, Y., Posch, A. E., Cosgrove, S. E., & Tamma, P. D. (2021). Cefiderocol Activity Against Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Exhibiting Ceftolozane-Tazobactam Resistance. *Open Forum Infectious Diseases*, 8(7), ofab311. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofab311>
- Simner, P. J., Palavecino, E. L., Satlin, M. J., Mathers, A. J., Weinstein, M. P., Lewis, J. S., & Humphries, R. (2023). Potential of Inaccurate Cefiderocol Susceptibility Results : A CLSI AST Subcommittee Advisory. *Journal of Clinical Microbiology*, 61(4), e0160022. <https://doi.org/10.1128/jcm.01600-22>

- Simner, P. J., & Patel, R. (2020). Cefiderocol Antimicrobial Susceptibility Testing Considerations: The Achilles' Heel of the Trojan Horse? *Journal of Clinical Microbiology*, 59(1), e00951-20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00951-20>
- Singh, J. K., Adams, F. G., & Brown, M. H. (2019). Diversity and Function of Capsular Polysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.03301>
- Smani, Y., McConnell, M. J., & Pachón, J. (2012). Role of Fibronectin in the Adhesion of *Acinetobacter baumannii* to Host Cells. *PLOS ONE*, 7(4), e33073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033073>
- Smith, M. G., Gianoulis, T. A., Pukatzki, S., Mekalanos, J. J., Ornston, L. N., Gerstein, M., & Snyder, M. (2007). New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes & Development*, 21(5), 601-614. <https://doi.org/10.1101/gad.1510307>
- Soriano, A., & Mensa, J. (2022). Mechanism of action of cefiderocol. *Revista Española de Quimioterapia*, 35(Suppl 2), 16-19. <https://doi.org/10.37201/req/s02.02.2022>
- Spellberg, B., & Bonomo, R. A. (2014). The Deadly Impact of Extreme Drug Resistance in *Acinetobacter baumannii**. *Critical care medicine*, 42(5), 1289-1291. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000181>
- Spencer, R. C. (1996). Predominant pathogens found in the European prevalence of infection in intensive care study. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 15(4), 281-285. <https://doi.org/10.1007/BF01695658>
- Šrámová, H., Daniel, M., Absolonová, V., Dědičová, D., Jedličková, Z., Lhotová, H., Petráš, P., & Subertová, V. (1992). Epidemiological role of arthropods detectable in health facilities. *Journal of Hospital Infection*, 20(4), 281-292. [https://doi.org/10.1016/0195-6701\(92\)90006-8](https://doi.org/10.1016/0195-6701(92)90006-8)
- Stracquadano, S., Bonomo, C., Marino, A., Bongiorno, D., Privitera, G. F., Bivona, D. A., Mirabile, A., Bonacci, P. G., & Stefani, S. (2022). *Acinetobacter baumannii* and Cefiderocol, between Cidality and Adaptability. *Microbiology Spectrum*, 10(5), e02347-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02347-22>
- Streling, A. P., Al Obaidi, M. M., Lainhart, W. D., Zangeneh, T., Khan, A., Dinh, A. Q., Hanson, B., Arias, C. A., & Miller, W. R. (2021). Evolution of Cefiderocol Non-Susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* in a Patient Without Previous Exposure to the Antibiotic. *Clinical Infectious Diseases*, 73(11), e4472-e4474. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1909>
- Swann, J. P. (1983). The Search for Synthetic Penicillin during World War II. *The British Journal for the History of Science*, 16(2), 154-190. <https://doi.org/10.1017/S0007087400026789>
- 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., ... Zorzet, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(3), 318-327. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)
- Tamma, P. D., Aitken, S. L., Bonomo, R. A., Mathers, A. J., van Duin, D., & Clancy, C. J. (2023). Infectious Diseases Society of America 2023 Guidance on the Treatment of Antimicrobial Resistant Gram-Negative Infections. *Clinical Infectious Diseases*, ciad428. <https://doi.org/10.1093/cid/ciad428>

- Tankovic, J., Legrand, P., De Gatines, G., Chemineau, V., Brun-Buisson, C., & Duval, J. (1994). Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic typing methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(11), 2677-2681. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.11.2677-2681.1994>
- Tatsumi, Y., Maejima, T., & Mitsunashi, S. (1995). Mechanism of *tonB*-dependent transport of KP-736, a 1,5-dihydroxy-4-pyridone-substituted cephalosporin, into *Escherichia coli* K-12 cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(3), 613-619. <https://doi.org/10.1128/AAC.39.3.613>
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., & Archer, M. T. W. G. of the S. for H. E. of. (1997). How to Select and Interpret Molecular Strain Typing Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections A Review for Healthcare Epidemiologists. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 18(6), 426-439. <https://doi.org/10.2307/30141252>
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(9), 2233-2239.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2023). *Breakpoints tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.1, 2023*. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.1_Breakpoint_Tables.pdf
- Tian, G.-B., Adams-Haduch, J. M., Taracila, M., Bonomo, R. A., Wang, H.-N., & Doi, Y. (2011). Extended-Spectrum AmpC Cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*: ADC-56 Confers Resistance to Cefepime. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(10), 4922-4925. <https://doi.org/10.1128/AAC.00704-11>
- Tietgen, M., Kramer, J. S., Brunst, S., Djahanschiri, B., Wohra, S., Higgins, P. G., Weidensdorfer, M., Riedel-Christ, S., Pos, K. M., Gonzaga, A., Steglich, M., Nübel, U., Ebersberger, I., Proschak, E., & Göttig, S. (2019). Identification of the novel class D β -lactamase OXA-679 involved in carbapenem resistance in *Acinetobacter calcoaceticus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(6), 1494-1502. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz080>
- Tomás, M. del M., Beceiro, A., Pérez, A., Velasco, D., Moure, R., Villanueva, R., Martínez-Beltrán, J., & Bou, G. (2005). Cloning and Functional Analysis of the Gene Encoding the 33- to 36-Kilodalton Outer Membrane Protein Associated with Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(12), 5172-5175. <https://doi.org/10.1128/aac.49.12.5172-5175.2005>
- Toth, M., Lee, M., Stewart, N. K., & Vakulenko, S. B. (2022). Effects of Inactivation of d,d-Transpeptidases of *Acinetobacter baumannii* on Bacterial Growth and Susceptibility to β -Lactam Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(1), e01729-21. <https://doi.org/10.1128/AAC.01729-21>
- Towner, K. J. (2009). *Acinetobacter*: An old friend, but a new enemy. *Journal of Hospital Infection*, 73(4), 355-363. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.03.032>
- Turton, J. F., Gabriel, S. N., Valderrey, C., Kaufmann, M. E., & Pitt, T. L. (2007). Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(8), 807-815. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01759.x>

- Turton, J. F., Shah, J., Ozongwu, C., & Pike, R. (2010). Incidence of *Acinetobacter* Species Other than *A. baumannii* among Clinical Isolates of *Acinetobacter*: Evidence for Emerging Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1445-1449. <https://doi.org/10.1128/jcm.02467-09>
- Turton, J. F., Ward, M. E., Woodford, N., Kaufmann, M. E., Pike, R., Livermore, D. M., & Pitt, T. L. (2006). The role of ISAb_a1 in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiology Letters*, 258(1), 72-77. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00195.x>
- Turton, J. F., Woodford, N., Glover, J., Yarde, S., Kaufmann, M. E., & Pitt, T. L. (2006). Identification of *Acinetobacter baumannii* by Detection of the bla_{OXA-51-like} Carbapenemase Gene Intrinsic to This Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(8), 2974-2976. <https://doi.org/10.1128/jcm.01021-06>
- Uppalapati, S. R., Sett, A., & Pathania, R. (2020). The Outer Membrane Proteins OmpA, CarO, and OprD of *Acinetobacter baumannii* Confer a Two-Pronged Defense in Facilitating Its Success as a Potent Human Pathogen. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.589234>
- Urban, C., Go, E., Mariano, N., & Rahal, J. J. (1995). Interaction of sulbactam, clavulanic acid and tazobactam with penicillin-binding proteins of imipenem-resistant and -susceptible *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiology Letters*, 125(2-3), 193-197. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1995.tb07357.x>
- U.S. Department of Health and Human Services, CDC. (2019). *CDC Antibiotic Resistance Threats in the United States*.
- Van Dessel, H., Dijkshoorn, L., van der Reijden, T., Bakker, N., Paauw, A., van den Broek, P., Verhoef, J., & Brisse, S. (2004). Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Research in Microbiology*, 155(2), 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2003.10.003>
- Vasil, M. L., & Ochsner, U. A. (1999). The response of *Pseudomonas aeruginosa* to iron: Genetics, biochemistry and virulence. *Molecular Microbiology*, 34(3), 399-413. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01586.x>
- Vijayakumar, S., Biswas, I., & Veeraraghavan, B. (2019). Accurate identification of clinically important *Acinetobacter* spp.: An update. *Future Science OA*, 5(6), FSO395. <https://doi.org/10.2144/fsoa-2018-0127>
- Villalón, P., Valdezate, S., Medina-Pascual, M. J., Carrasco, G., Vindel, A., & Saez-Nieto, J. A. (2013). Epidemiology of the *Acinetobacter*-derived cephalosporinase, carbapenem-hydrolysing oxacillinase and metallo- β -lactamase genes, and of common insertion sequences, in epidemic clones of *Acinetobacter baumannii* from Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(3), 550-553. <https://doi.org/10.1093/jac/dks448>
- Vincent, J.-L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C. D., Moreno, R., Lipman, J., Gomersall, C., Sakr, Y., Reinhart, K., & EPIC II Group of Investigators, for the. (2009). International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *JAMA*, 302(21), 2323-2329. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1754>
- Vincent, J.-L., Sakr, Y., Sprung, C. L., Ranieri, V. M., Reinhart, K., Gerlach, H., Moreno, R., Carlet, J., Le Gall, J.-R., Payen, D., & Investigators, on behalf of the S. O. in A. I. P. (2006). Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study*. *Critical Care Medicine*, 34(2), 344. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000194725.48928.3A>

- Vuilleminot, J.-B., Bour, M., Beyrouthy, R., Bonnet, R., Laaberki, M.-H., Charpentier, X., Ruimy, R., Plésiat, P., & Potron, A. (2022). Genomic analysis of CTX-M-115 and OXA-23/-72 co-producing *Acinetobacter baumannii*, and their potential to spread resistance genes by natural transformation. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(6), 1542-1552. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac099>
- Vuillemin, X., Da Silva, M., Bour, M., Landon, C., Plésiat, P., & Jeannot, K. (2023). Cefiderocol activity is compromised by acquired Extended Spectrum-Oxacillinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 106917. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2023.106917>
- Walsh, C. T., & Wencewicz, T. A. (2014). Prospects for new antibiotics: A molecule-centered perspective. *The Journal of Antibiotics*, 67(1), 1. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.49>
- Wang, Q., Jin, L., Sun, S., Yin, Y., Wang, R., Chen, F., Wang, X., Zhang, Y., Hou, J., Zhang, Y., Zhang, Z., Luo, L., Guo, Z., Li, Z., Lin, X., Bi, L., & Wang, H. (2022). Occurrence of High Levels of Cefiderocol Resistance in Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* before Its Approval in China: A Report from China CRE-Network. *Microbiology Spectrum*, 10(3), e02670-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02670-21>
- Wang, X., Li, H., Zhao, C., Chen, H., Liu, J., Wang, Z., Wang, Q., Zhang, Y., He, W., Zhang, F., & Wang, H. (2014). Novel NDM-9 metallo- β -lactamase identified from a ST107 *Klebsiella pneumoniae* strain isolated in China. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(1), 90-91. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.04.010>
- Wen, Y., Ouyang, Z., Yu, Y., Zhou, X., Pei, Y., Devreese, B., Higgins, P. G., & Zheng, F. (2017). Mechanistic insight into how multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* response regulator AdeR recognizes an intercistronic region. *Nucleic Acids Research*, 45(16), 9773-9787. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx624>
- Westphal, O. (1960). Récentes recherches sur la chimie et la biologie des endotoxines des bactéries à Gram négatif. *Annales de l'Institut Pasteur*, 98(6), 789-813.
- Wilharm, G., Skiebe, E., Higgins, P. G., Poppel, M. T., Blaschke, U., Leser, S., Heider, C., Heindorf, M., Brauner, P., Jäckel, U., Böhländ, K., Cuny, C., Łopińska, A., Kaminski, P., Kasprzak, M., Bochenski, M., Ciebiera, O., Tobółka, M., Żołnierowicz, K. M., ... Jerzak, L. (2017). Relatedness of wildlife and livestock avian isolates of the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* to lineages spread in hospitals worldwide. *Environmental Microbiology*, 19(10), 4349-4364. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13931>
- Wilks, M., Wilson, A., Warwick, S., Price, E., Kennedy, D., Ely, A., & Millar, M. R. (2006). Control of an Outbreak of Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Colonization and Infection in an Intensive Care Unit (ICU) Without Closing the ICU or Placing Patients in Isolation. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 27(7), 654-658. <https://doi.org/10.1086/507011>
- Wong, E. W., Yusof, M. Y. M., Mansor, M. B., Anbazhagan, D., Ong, S. Y., & Sekaran, S. D. (2009). Disruption of *adeB* gene has a greater effect on resistance to meropenems than *adeA* gene in *Acinetobacter* spp. Isolated from University Malaya Medical Centre. *Singapore Medical Journal*, 50(8), 822-826.
- Wright, G. D. (2014). Something old, something new: Revisiting natural products in antibiotic drug discovery. *Canadian Journal of Microbiology*, 60(3), 147-154. <https://doi.org/10.1139/cjm-2014-0063>

- Yamano, Y. (2019). In Vitro Activity of Cefiderocol Against a Broad Range of Clinically Important Gram-negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 69(Supplement_7), S544-S551. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz827>
- Yang, Y., Fu, Y., Lan, P., Xu, Q., Jiang, Y., Chen, Y., Ruan, Z., Ji, S., Hua, X., & Yu, Y. (2018). Molecular Epidemiology and Mechanism of Sulbactam Resistance in *Acinetobacter baumannii* Isolates with Diverse Genetic Backgrounds in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(3), 10.1128/aac.01947-17. <https://doi.org/10.1128/aac.01947-17>
- Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla_{NDM-1}*, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(12), 5046-5054. <https://doi.org/10.1128/AAC.00774-09>
- Yoon, E.-J., Nait Chabane, Y., Goussard, S., Snesrud, E., Courvalin, P., Dé, E., & Grillot-Courvalin, C. (2015). Contribution of Resistance-Nodulation-Cell Division Efflux Systems to Antibiotic Resistance and Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii*. *mBio*, 6(2), e00309-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.00309-15>
- Yusuf, E., Tompa, M., Strepis, N., Klaassen, C. H. W., & Goessens, W. H. F. (2022). High Prevalence of ST502 Carrying an OXA-24 Carbapenemase gene in Carbapenem-Nonsusceptible *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* Isolates in Romania. *Microbial Drug Resistance*, 28(6), 636-644. <https://doi.org/10.1089/mdr.2021.0274>
- Zakharkina, T., Heinzel, E., Koczulla, R. A., Greulich, T., Rentz, K., Pauling, J. K., Baumbach, J., Herrmann, M., Grünewald, C., Dienemann, H., Müller, L. von, & Bals, R. (2013). Analysis of the Airway Microbiota of Healthy Individuals and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease by T-RFLP and Clone Sequencing. *PLOS ONE*, 8(7), e68302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068302>
- Zeng, X., Wang, N., Xiang, C., Liu, Q., Li, D., Zhou, Y., Zhang, X., Xie, Y., Zhang, W., Yang, H., Jiang, M., Zong, X., Zou, Q., & Shi, Y. (2023). Peptidoglycan-associated lipoprotein contributes to the virulence of *Acinetobacter baumannii* and serves as a vaccine candidate. *Genomics*, 115(2), 110590. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2023.110590>
- Zhanel, G. G., Lawrence, C. K., Adam, H., Schweizer, F., Zelenitsky, S., Zhanel, M., Lagacé-Wiens, P. R. S., Walkty, A., Denisuk, A., Golden, A., Gin, A. S., Hoban, D. J., Lynch, J. P., & Karlowsky, J. A. (2018). Imipenem–Relebactam and Meropenem–Vaborbactam: Two Novel Carbapenem– β -Lactamase Inhibitor Combinations. *Drugs*, 78(1), 65-98. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0851-9>
- Zhou, J.-X., Feng, D.-Y., Li, X., Zhu, J.-X., Wu, W.-B., & Zhang, T. (2023). Advances in research on virulence factors of *Acinetobacter baumannii* and their potential as novel therapeutic targets. *Journal of Applied Microbiology*, 134(2), lxac089. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxac089>

Annexes

Annexe 1

Tableau 19 : Valeurs détaillées des paramètres enzymatiques des variants ADC décrits dans la littérature.

		Pénicilline G			Ampicilline			Céphalosporine			Cefoxitine					
Référence	Variant	Km	Kcat	Kcat/Km	Km	Kcat	Kcat/Km	Km	Kcat	Kcat/Km	Km	Kcat	Kcat/Km			
Bhattacharya <i>et al.</i> , 2013	ADC-1	10,26 ± 0,27	5,1 ± 0,3	2 ± 0,35	4,8 ± 0,18	32 ± 7	1,5 ± 0,3	147 ± 9	74 ± 8,6	2 ± 0,2	ND					
Pérez <i>et al.</i> , 2014	ADC-1	ND			4,27 ± 0,8	3,04	0,71	204 ± 19	1744,14	8,54	0,19 ± 0,01	0,0343	0,18			
Pérez <i>et al.</i> , 2014	ADC-5				ND			3,34 ± 0,8	6,89	2,06	247 ± 7,7	1088,4	4,4	0,175 ± 0,007	0,72	4,11
Hujer <i>et al.</i> , 2005	ADC-7							ND			40 ± 11			1 154 ± 80	29 ± 6	0,34 ± 0,09
Skalweit <i>et al.</i> , 2015	ADC-7				ND						1 500 ± 300			90 ± 10	17 ± 1	80 ± 20
Rodríguez-Martínez <i>et al.</i> , 2010	ADC-11	12	45	4				7	5	1	210	550	2,5	0,5	1,5	3
Beceiro <i>et al.</i> , 2009	ADC-14	ND			0,12 ± 0,04	0,3 ± 0,08	2,45	6,73 ± 2,3	56,52 ± 22,38	8,40	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,004	0,94			
Beceiro <i>et al.</i> , 2009	ADC-16				ND			1,03 ± 0,4	2,6 ± 0,66	2,52	139,24 ± 16,72	1 380,80 ± 490,13	9,92	0,18 ± 0,04	0,33 ± 0,02	1,88
Beceiro <i>et al.</i> , 2009	ADC-18							ND			1,5 ± 0,47	4,05 ± 1,06	2,70	148,27 ± 13,23	1 418,36 ± 318,52	9,57
Tian <i>et al.</i> , 2011	ADC-30				ND						0,91 ± 0,14	1,38 ± 0,03	1,54 ± 0,03	23,8 ± 2,08	480,5 ± 32,6	20,25 ± 0,79
Rodríguez-Martínez <i>et al.</i> , 2010	ADC-33	3	15	5				9	4	0,5	120	140	1	0,1	0,3	3
Tian <i>et al.</i> , 2011	ADC-56	ND			1,12 ± 0,34	3,46 ± 0,06	3,30 ± 1,07	38,9 ± 3,57	393,9 ± 23,1	10,16 ± 0,48	NM					
Jeon <i>et al.</i> , 2015	ADC-68	85,4 ± 0,4	23,5 ± 0,2	3,63 ± 0,03	7,1 ± 0,5	20,3 ± 0,21	0,35 ± 0,02	65,8 ± 1,5	21,5 ± 0,2	3,06 ± 0,03	ND					

Tableau 19 : (Suite).

		Cefotaxime			Ceftazidime			Céfépime			Imipénème			Méropénème								
Référence	Variant	Km	Kcat	Kcat/Km	Km	Kcat	Kcat/Km	Km	Kcat	Kcat/Km	Km	Kcat	Kcat/Km	Km	Kcat	Kcat/Km						
Bhattacharya <i>et al.</i> , 2013	ADC-1	0,16 ± 0,01	0,5 ± 0,04	3,2 ± 0,32	0,7 ± 0,02	16 ± 1,7	4,4 ± 0,5		ND			ND			ND							
Pérez <i>et al.</i> , 2014	ADC-1	ND			265 ± 25,8	1,255	0,0047										ND		ND		ND	
Pérez <i>et al.</i> , 2014	ADC-5	ND			231,87 ± 13	0,011	0,00005															
Hujer <i>et al.</i> , 2005	ADC-7	0,10 ± 0,02	NM		11,6 ± 1,6	NM		594 ± 6	NM		2 ± 0,3	NM		38 ± 4	NM							
Skalweit <i>et al.</i> , 2015	ADC-7	ND			ND				ND			ND				ND						
Rodríguez-Martínez <i>et al.</i> , 2010	ADC-11	2,5	0,2	0,1	10	0,01	0,001	1 800	1	0,0005	6	0,015	0,0025			ND						
Beceiro <i>et al.</i> , 2009	ADC-14	0,08 ± 0,02	0,004 ± 0,002	0,048	26,09 ± 4,49	0,01 ± 0,001	0,00038		ND		2,29 ± 0,60	0,003 ± 0,001	0,013			ND						
Beceiro <i>et al.</i> , 2009	ADC-16	0,32 ± 0,12	0,07 ± 0,01	0,21	10,34 ± 6,44	0,02 ± 0,003	0,00022				ND		2,56 ± 0,73	0,004 ± 0,0005	0,016			ND				
Beceiro <i>et al.</i> , 2009	ADC-18	0,2 ± 0,01	0,06 ± 0,004	0,31	84,02 ± 21,12	0,02 ± 0,006	0,00025				ND		2,51 ± 0,86	0,02 ± 0,003	0,096			ND				
Tian <i>et al.</i> , 2011	ADC-30	0,51 ± 0,06	0,18 ± 0,01	0,32 ± 0,01	1,39 ± 0,0001	0,05 ± 0,02	0,04 ± 0,01		NM		ND					ND						
Rodríguez-Martínez <i>et al.</i> , 2010	ADC-33	0,5	1	2	30	4	0,15				1300	10	0,01	5	0,01	0,002			ND			
Tian <i>et al.</i> , 2011	ADC-56	1,0 ± 0,12	0,27 ± 0,02	0,27 ± 0,01	1,42 ± 0,04	0,1 ± 0,02	0,07 ± 0,02				17,17 ± 2,5	0,2 ± 0,02	0,01 ± 0,001	ND					ND			
Jeon <i>et al.</i> , 2015	ADC-68	18,5 ± 0,5	117,5 ± 1,3	0,16 ± 0,02	1,66 ± 0,06	147,7 ± 1,2	0,01 ± 0,003		ND		0,14 ± 0,002	0,83 ± 0,004	0,17 ± 0,001	0,15 ± 0,001	2,03 ± 0,002	0,07 ± 0,001						

ND : Non déterminé ; NM : Non mesurable. Unités : K_m : en s-1, k_{cat} : μM ; k_{cat}/K_m : μM⁻¹.s⁻¹.

Annexe 2

	1						70
ADC-50	NTPKDQEIKK	LVDQNFKPLL	EKYDVPGMAV	GVIQNNKKYE	MYYGLQSVQD	KKAVNSSTIF	ELGSVSKLFT
ADC-30							
ADC-33							
ADC-56							
ADC-73							
ADC-74						R	
ADC-82							
ADC-199							
ADC-200							
ADC-211							N
ADC-256							
ADC-268							
ADC-276						R	
	71						140
ADC-50	ATAGGYAKNK	GKISFDDTPG	KYWKELKNTP	IDQVNLLQLA	TYTSGNLALQ	FPDEVQTDQQ	VLTFKDWKP
ADC-30						K	
ADC-33						K	
ADC-56						K	
ADC-73						K	
ADC-74							Q
ADC-82						K	
ADC-199							
ADC-200						K	
ADC-211							
ADC-256			V				
ADC-268						K	
ADC-276							Q
	141						204a 209
ADC-50	KNPIGEYRQY	SNPSIGLFGK	VVALSMNKP	DQVLEKTIFF	ALGLKHSYVN	VAKTQMQNYA	FGYNQENQPI
ADC-30	S					P	
ADC-33	S					P	
ADC-56	S Q					P	
ADC-73	S					P	
ADC-74						P	
ADC-82	S					P	
ADC-199						P	
ADC-200	S					P	
ADC-211						P	V
ADC-256						P	
ADC-268	S Q					P	
ADC-276	 I					P	
	210	219	222				274
ADC-50	RVNPGPLDA	PAY----	GV	KSTLPDMLSF	IHANLNPQKY	PADIQRINE	THQGFYQVNT
ADC-30							R
ADC-33	R	A					R
ADC-56							R
ADC-73			S				R
ADC-74	A						
ADC-82		L					R
ADC-199		GVPAY					
ADC-200							R
ADC-211					T		R
ADC-256							
ADC-268			S				R
ADC-276	A						
	275						347
ADC-50	SYPTPLQTL	DSNSEQIVMK	PNKVTAISKE	PSVKMYHKTG	STNGFGTYVV	FIPKENIGLV	MLTNKRIPNE
ADC-30	AT				T		
ADC-33	AT						
ADC-56	AT				T		
ADC-73	AT				T		
ADC-74	AT				T		
ADC-82	AT				T		
ADC-199	AT				T		
ADC-200	AT				T		
ADC-211	AT				T		
ADC-256	AT				T	S	K
ADC-268	AT				T		
ADC-276	AT				T		
	348	361					
ADC-50	ERIKAAYAV	LNAIKK					
ADC-30							
ADC-33							
ADC-56							
ADC-73							
ADC-74		D					
ADC-82							
ADC-199							
ADC-200							
ADC-211							
ADC-256							
ADC-268							
ADC-276		D					

Figure 25 : Alignement des séquences protéiques des différents variants ADC clonés au cours de ce travail. La numérotation des résidus respecte la nomenclature SANC, proposée par (Mack et al., 2020). La région de l'Ω-loop est indiquée par un fond bleu, celle du R2-loop en vert.

Annexe 3

Tableau 20 : Niveaux d'expression relatifs des gènes codants la PLP1b, la PLP2 et la PLP3 des différentes constructions de PLPs et des mutants par rapport à la souche de référence CIP70.10.

		PLP1b			PLP2			PLP3		
		S1	S2	S3	S1	S2	S3	S1	S2	S3
A. <i>baumannii</i> Mutants (CIP70.10)	CIP 70.10	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	FDC2.079	1,4	3,2	4,1	0,4	0,1	0,3	0,4	0,2	0,5
	FDC4.098	1,2	1,0	0,5	0,2	0,4	0,1	0,4	0,4	0,5
	-	0,9	0,1	0,2	0,9	0,1	0,1	0,0	0,0	0,2
	PLP1b	3,9	3,0	0,6	0,7	0,6	0,1	0,8	0,4	0,4
	PLP2	0,6	1,2	1,3	7,4	14,9	1,0	0,4	0,4	0,1
	PLP3	1,5	1,0	0,3	0,6	ND	0,3	3,1	0,0	1,0
	PrIS PLP1b	5,8	4,0	12,8	0,6	0,2	0,0	0,6	0,6	0,1
	PrIS PLP2	2,8	0,2	1,7	77,8	10,4	17,2	1,4	0,1	0,9
	PrIS PLP3	4,0	0,9	0,6	0,7	0,7	0,1	7,5	1,4	1,8
A. <i>baumannii</i> CIP70.10 pABEC -	Pr muté - PLP1b	5,0	1,1	11,0	0,8	0,3	0,0	0,9	0,3	0,1
	Pr muté - PLP2	8,1	1,7	0,6	14,4	23,7	38,0	0,8	0,7	0,4
	PLP1b (R363S)	5,3	0,3	0,6	1,2	0,0	0,2	1,1	0,1	0,3
	PLP3 (A515V)	2,3	1,0	0,5	0,9	0,2	0,4	1,8	1,4	1,7

ND : Non déterminé. Les S1, S2 et S3 indiquent les valeurs obtenues pour chacun des réplicats biologiques.

Annexe 4



Article

Performance of the Disc Diffusion Method, MTS Gradient Tests and Two Commercially Available Microdilution Tests for the Determination of Cefiderocol Susceptibility in *Acinetobacter* spp.

Katy Jeannot ^{1,2,3} , Susie Gaillot ³, Pauline Triponney ², Sylvain Portets ¹, Valentin Pourchet ¹, Damien Fournier ^{1,2} and Anaïs Potron ^{1,2,3,*}

¹ Laboratoire de Bactériologie, CHU de Besançon, F-25000 Besançon, France

² Centre National de Référence de la Résistance aux Antibiotiques, Laboratoire Associé, Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, F-25000 Besançon, France

³ CNRS, UMR 6249, Chrono-Environnement, Université de Franche-Comté, F-25000 Besançon, France

* Correspondence: anaïs.potron@univ-fcomte.fr

Abstract: Cefiderocol is a siderophore-conjugated cephalosporin with potent activity against multidrug-resistant Gram-negative pathogens including *Acinetobacter baumannii*. The aim of this study was to evaluate cefiderocol testing methods on a relevant collection of 97 *Acinetobacter* spp. isolates. Commercialized broth microdilution methods (ComASP[®], Liofilchem and UMIC[®], Bruker), MIC test strips (Liofilchem) and disc diffusion using discs of three different brands (Mast Diagnostic, Liofilchem and Oxoid—Thermo Fisher Scientific) were compared with the broth microdilution reference method. None of the methods tested fulfilled acceptable criteria (essential agreement [EA] $\geq 90\%$; bias = $\pm 30\%$) but both BMD methods achieved acceptable categorical agreement rates (CA = 95.9% [93/97, 95% CI 89.9–98.4] and CA = 93.8% [91/97, 95% CI 87.2–97.1] for ComASP[®] and UMIC[®], respectively) and bias < 30% (−7.2% and −25.2% for ComASP[®] and UMIC[®], respectively). The use of MIC gradient testing is strongly discouraged due to misclassification of 55% ($n = 23/42$) of resistant strains. Finally, the disc diffusion method could be used to rapidly screen for susceptible strains by setting a critical diameter of 22 mm.

Keywords: cefiderocol; *Acinetobacter* spp.; susceptibility testing



Citation: Jeannot, K.; Gaillot, S.; Triponney, P.; Portets, S.; Pourchet, V.; Fournier, D.; Potron, A. Performance of the Disc Diffusion Method, MTS Gradient Tests and Two Commercially Available Microdilution Tests for the Determination of Cefiderocol Susceptibility in *Acinetobacter* spp. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1971. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11081971>

Academic Editor: Elisabeth Grohmann

Received: 3 July 2023

Revised: 25 July 2023

Accepted: 29 July 2023

Published: 31 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (CRAB) complex is one of the leading causes of healthcare-associated infections worldwide [1,2]. Given the limited therapeutic options available, CRAB have been included by the World Health Organisation (WHO) in the global priority list of antibiotic-resistant bacteria, for which antibiotics are urgently needed [3]. Recently, cefiderocol, a siderophore-conjugate cephalosporin, was shown to have an excellent in vitro activity against Gram-negative bacilli, including carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates [4–6]. However, due to limited clinical data, IDSA and ESCMID experts recommend caution in the use of cefiderocol for the treatment of moderate to severe CRAB infections. This molecule should indeed be administered as part of a combination regimen and after other therapeutic alternatives have been exhausted [7,8]. While the reference method for determining cefiderocol susceptibility is the broth microdilution (BMD) method using an iron-depleted cation-adjusted Mueller–Hinton broth (ID CA-MHB) [9], this method is not convenient for routine clinical microbiology laboratories. In addition, the reading of BMD requires expertise as the value of MIC corresponds to the first well in which the reduction in growth corresponds to a button of <1 mm or is replaced by the presence of light haze/faint turbidity [9]. Other susceptibility testing methods have been successively commercialized, including MIC test strips (MTS) and discs, which can be used with regular Mueller–Hinton agar (MHA), and

UMIC[®] and ComASP[®] microplates using ID CA-MHB. The performance of some of those methods has been evaluated for *Enterobacterales* and *Pseudomonas aeruginosa*, showing that microplates should be an alternative to the reference BMD method and that MIC strips may not be used [10,11]. In addition, several sources reported large variations in inhibitory zone diameters, depending on the disc and MHA brands, for QC and clinical strains [10,12]. Cefiderocol susceptibility testing appears particularly tricky in *A. baumannii* regarding the reproducibility and accuracy of both cefiderocol BMD and disc diffusion methods [13,14]. However, providing accurate information to clinicians about cefiderocol susceptibility of multidrug-resistant *A. baumannii* isolates is crucial in view of the few therapeutic alternatives available. Here, we evaluated the performances of two microdilution methods, disc diffusion and MIC test strips, compared to the BMD reference method on a relevant collection of *Acinetobacter* spp. clinical isolates.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Isolates

Ninety-seven *Acinetobacter* spp. strains isolated from several clinical samples between 2012 and 2022 were selected from 59 French medical laboratories (Table S1). Those strains were referred to the French National Reference Centre for Antibiotic Resistance (NRC-AR) for analysis of their resistance mechanisms to antibiotics. The strains selected for this study were genetically diverse, belonging to 27 different STs according to the Pasteur Schema, with ST2 and ST1 being the most represented STs (37% and 12% of *A. baumannii* strains, respectively). All strains showed decreased susceptibility to at least one carbapenem (meropenem (MIC > 2 mg/L) and/or imipenem (MIC > 2 mg/L)) according to the current EUCAST recommendations [15]. Among the 97 selected strains, 70 produced only one carbapenemase, being an OXA-type carbapenem-hydrolysing beta-lactamase in 58 strains, an NDM-type enzyme in 11 strains and an IMP-type enzyme in one strain. Twenty-two isolates possessed two carbapenemase-encoding genes (frequently NDM-1 and OXA-23, $n = 16$). An ESBL was identified in 17 strains, of which 16 co-produced a carbapenemase (Table S1). Finally, one strain produced only a GES-11 ESBL, and 5 overproduced their intrinsic cephalosporinase (Table S1). Quality controls using wild-type *P. aeruginosa* strain ATCC 27853 were included in each series of experiments ($n = 6$).

2.2. Cefiderocol Susceptibility Testing

2.2.1. Broth Microdilution Reference Method (BMD)

Reference MIC values were determined using an iron-depleted and cation-adjusted Mueller–Hinton broth (ID-CAMHB) and a titrated powder of cefiderocol (MedChemExpress, Sollentuna, Sweden) as described previously and according to the recommendation of the Clinical and Laboratory Standards Institute [10,16]. Briefly, a commercial Mueller–Hinton broth (Becton Dickinson, Le Pont-de-Claix, France) was treated with a Chelex resin (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) and then supplemented with divalent cations (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}). The concentration of iron and divalent cations in the broth was measured by flame spectrometry (QUALIO, Besançon, France). All ID-CAMHB batches prepared contained less than 0.03 mg/L iron. Cefiderocol MIC values in microplates were read by 3 operators and interpreted according to EUCAST PK-PD breakpoints (susceptible, ≤ 2 mg/L and resistant > 2 mg/L). At least two MIC determinations using the reference method was performed for each strain, and a third determination was carried out in case of variation of more than one dilution or difficulty of reading.

2.2.2. Other Susceptibility Testing Methods

The UMIC[®] cefiderocol unit test (Bruker, Wissembourg, France) and the microplate ComASP[®] (two tests by microplate) (Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy, distributed by I2A, Montpellier, France) were used according to the manufacturer's recommendations. Briefly, both tests are based on the inoculation of precoated wells containing cefiderocol at concentrations ranging from 0.03 to 32 mg/L for the UMIC[®] test and 0.008 to 128 mg/L for

the ComASP[®] method. The UMIC[®] strips were inoculated with 100 µL of a suspension prepared by adding 25 µL of a 0.5 McFarland adjusted bacterial suspension to 5 mL of iron-depleted CAMHB supplied by the manufacturer. The ComASP[®] method requires an additional step, which is a 1:20 dilution of the 0.5 McFarland bacterial suspension in a saline solution. As recommended by the EUCAST, the MIC was read as the first well in which the reduction of growth corresponds to a button of <1 mm or is replaced by the presence of light haze/faint turbidity [9]. Cefiderocol MTS from Liofilchem (Roseto degli Abruzzi, Italy, distributed by I2A, Montpellier, France) were tested with Becton Dickinson Mueller–Hinton agar (Heidelberg, Germany) as recommended by the supplier. All MIC values were read separately by 3 operators and the values obtained with strips were rounded to the upper highest 2-fold dilution, following the manufacturer's instructions. Disc diffusion assays were carried out following the EUCAST guidelines (<https://eucast.org/> (accessed on 21 June 2023)) with cefiderocol discs loaded at 30 micrograms from 3 manufacturers (Mast Diagnostic, Merseyside, UK; Liofilchem, Roseto degli Abruzzi, Italy; and Oxoid—Thermo Fisher Scientific, Basingstoke, UK) and Becton Dickinson MHA. This latter was chosen because the inhibition zone diameters for the *P. aeruginosa* ATCC 27853 quality control strain in previous study were within the acceptable range for this MHA manufacturer [10,17]. Colonies within inhibition zones were taken into account and diameters were measured independently by 3 operators and interpreted according to the recommendations of the EUCAST (strain categorized as susceptible if inhibition zone diameter ≥ 17 mm and resistant if inhibition zone diameter < 17 mm).

2.3. Data Analysis

Categorical agreement (CA), essential agreement (EA), inferior and superior bias were calculated according to ISO 20776-2:2021 standards, with the BMD method and EUCAST PK-PD breakpoints as reference. Percentages $\geq 90\%$ for EA, and a difference for bias $\pm 30\%$ were considered as acceptable.

3. Results

3.1. Broth Microdilution

The MICs values of cefiderocol ranged from 0.06 mg/L to >16 mg/L with a MIC₅₀ = 2 mg/L and a MIC₉₀ > 16 mg/L with the BMD reference method. Forty-two strains (43.3%) were classified as resistant to cefiderocol, according to the EUCAST PK-PD breakpoints (Table S1 and Figure S1). Interestingly, the MIC values of cefiderocol for the quality control strain *P. aeruginosa* ATCC 27853 were within the acceptable range for all microdilution tests, except for the UMIC[®] test, where one value was out of the acceptable range (Figure S2).

Compared with BMD reference method, the ComASP[®] and UMIC[®] microdilution tests displayed a CA rate higher than 90% (CA = 95.9%, $n = 93/97$, 95% CI 89.9–98.4 for ComASP[®] and CA = 93.8%, 95% CI 87.2–97.1 for UMIC[®]) (Figure 1a,b and Table 1). However, both methods did not achieve an acceptable 90% EA rate (81.4%, $n = 79/97$, 95% CI 72.6–87.9 for ComASP[®] and 78.4%, 95% CI 69.2–85.4 for UMIC[®]). While the UMIC[®] test tended to provide lower MIC values, as illustrated by the high percentage of inferior bias (−42.3%), the lower (−36.1%) and higher (+28.9%) bias values were significant for the ComASP[®] test (Figure 1a,b and Table 1). A total of four strains were classified as susceptible by each method, whereas they were classified as resistant by the reference method. Of these, two were misclassified by both BMD methods (17A1955 and 22A3377, which produced the NDM-1 and OXA-23 enzyme, respectively).

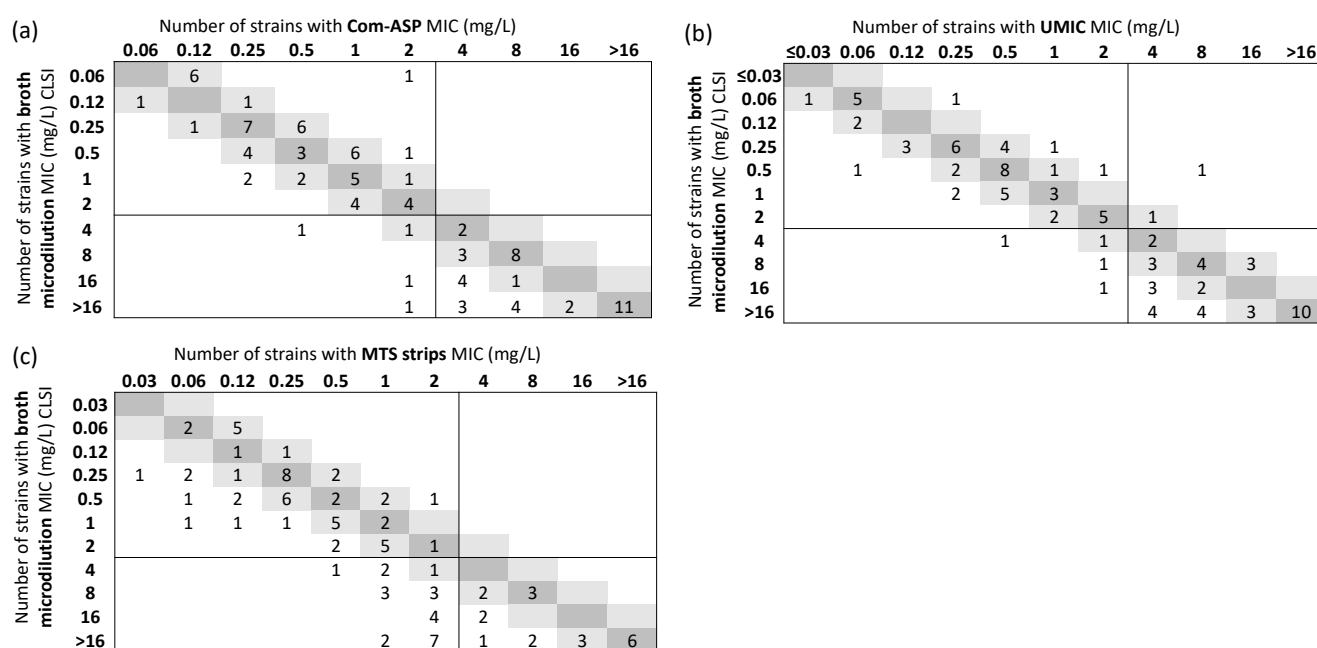


Figure 1. Correlation between cefiderocol MIC determined by broth microdilution reference method, (a) and by ComASP[®], (b) by UMIC[®] and (c) by MTS gradient test strips. The number of strains with MIC corresponding to the broth microdilution method, and 1-log₂ dilution are highlighted in dark and light grey areas, respectively. EUCAST 2023 PK-PD breakpoint is indicated by solid black lines.

Table 1. Performance of ComASP[®], UMIC[®], MTS strips, and discs for the determination of susceptibility to cefiderocol of 97 *Acinetobacter* spp. clinical isolates according to EUCAST PK-PD breakpoint in comparison with broth microdilution reference method.

		Performances (% , [n])				
		CA	EA	Bias high	Bias low	Difference of bias
Cefiderocol MIC determination						
	ComASP	95.9 (93)	81.4 (79)	+28.9% (22/76)	−36.1% (35/97)	−7.2%
	UMIC	93.8 (91)	78.4 (76)	+17.1% (13/76)	−42.3% (41/97)	−25.2%
	MTS strips	76.3 (74)	59.8 (58)	+14.5% (11/76)	−62.9% (61/97)	−48.4%
Disc diffusion (cefiderocol, 30 µg)						
	MAST	81.4 (79)	-	-	-	-
	Liofilchem	78.4 (76)	-	-	-	-
	Oxoid	72.2 (70)	-	-	-	-

CA, categorical agreement; EA, essential agreement; -, not applicable. The EUCAST 2023 PK/PD breakpoints were used to interpretate the results. In accordance with ISO 20776-2:2021, the acceptable rates are indicated in bold (EA ≥ 90%, and difference of bias low and high ± 30%).

3.2. Gradient Strips

While the QC were within acceptable limits, none of the calculated rates (CA = 76.3%, 95% CI 66.9–83.7; EA = 59.8%, 95% CI 49.8–69 and bias −48.4%) were acceptable for gradient strips (Figure 1c and Figure S2, Table 1). The high value of inferior bias (−62.9%) indicated that the method underestimated the MIC values in comparison with the BMD reference method. Thus, 55% of cefiderocol-resistant strains ($n = 23/42$) were misclassified as susceptible by the MTS strips.

3.3. Disc Diffusion

While the inhibition zone diameters for the *P. aeruginosa* ATCC 27853 QC strain were all within the acceptable range (23–29 mm) regardless of disc supplier (Mast, Liofilchem and Oxoid) (Figure S3), they did not meet the acceptability criteria (±1 mm of the tar-

get value) defined by the EUCAST in its warning published in August 2022 [12]. The disc diffusion method did not achieve an acceptable CA rate, which varied from 72.2% to 81.4% (Figure 2, Table 1). Of note, ten isolates (eight resistant and two susceptible to cefiderocol) showed microcolonies in the zone of inhibition for the three types of disc considered for reading. Whereas the disc diffusion method accurately categorized the cefiderocol susceptible strains, the proportion of misclassified strains among resistant isolates ($n = 42$) was 42.9% ($n = 18/42$), 50% ($n = 21/42$) and 64.3% ($n = 27/42$), for MAST, Liofilchem and Oxoid discs, respectively. These errors were not associated with a β -lactam resistance mechanism, disc reading difficulties, or a subpopulation of strains belonging to an identical genetic background.

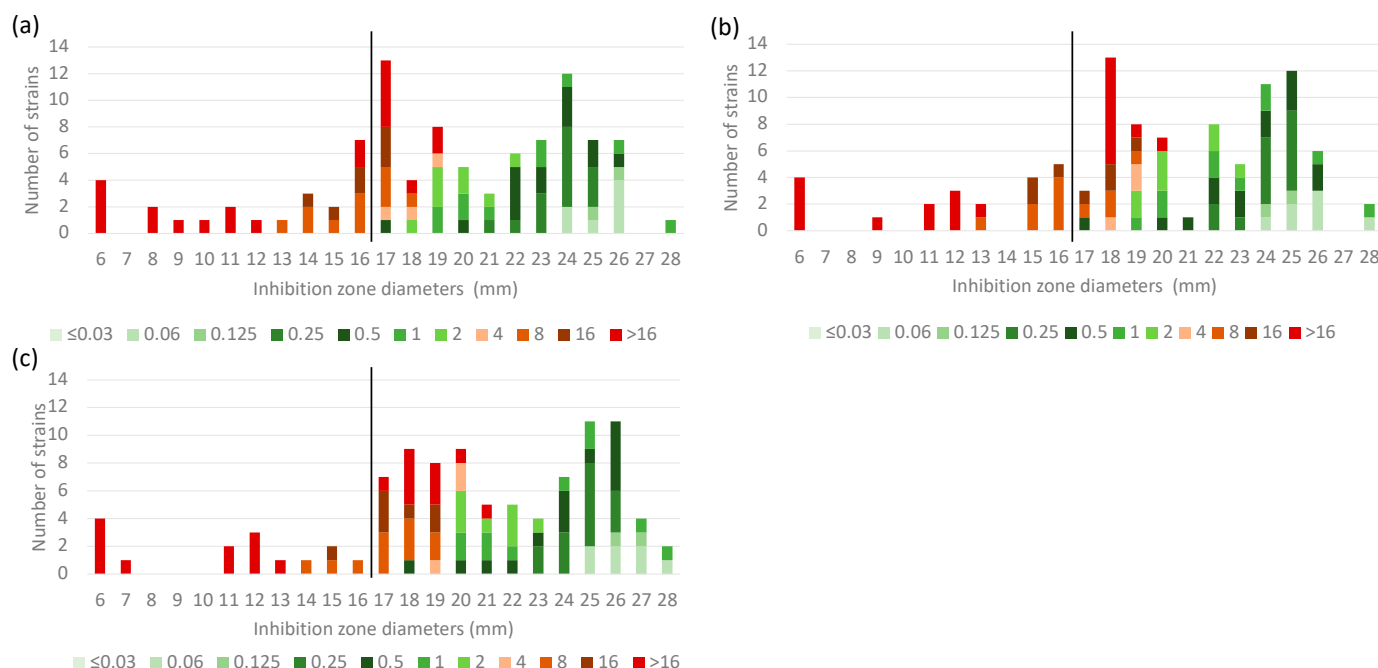


Figure 2. Distribution of inhibition zone diameter according to the MIC (mg/L) determined by broth microdilution reference method. Each isolate was tested with cefiderocol discs (30 µg) on Becton Dickinson Mueller-Hinton agar from manufacturers (a) Mast, (b) Liofilchem and (c) Oxoid. EUCAST 2023 PK-PD breakpoint is indicated by solid black line (17 mm).

4. Discussion

Using a strain collection set up to be representative of the current epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. strains, none of the methods tested fully met the criteria set by the International Standards Organization (ISO 20776-2:2021; EA $\geq 90\%$, difference of bias $\pm 30\%$). Both BMD methods evaluated (UMIC[®] and ComASP[®] tests) showed high CA rate ($\geq 90\%$) and acceptable differences of bias but EA rates remained below the 90% threshold. The UMIC[®] test tended to underestimate MIC values (bias inferior -42.9%) in *Acinetobacter* spp. Recently, the UMIC[®] method, tested on 44 *A. baumannii* isolates (of which 13 were resistant) showed similar performance (CA of 90.9%, EA of 84.1%) but lower inferior bias (-11.4%) [18]. Among the 42 cefiderocol-resistant strains of our study, three strains, producing an NDM-like enzyme alone ($n = 2$) or in combination with an OXA-23 enzyme ($n = 1$), and one OXA-72-producing isolate were misclassified as susceptible by one of the BMD methods (ComASP[®] or UMIC[®]), all with a MIC at 2 mg/L. In addition, both methods classified two strains as susceptible, one OXA-23 and one NDM-1, the latter with an MIC of 2 mg/L by both methods. However, it is important to note that independent of quality control results, a poor reproducibility of BMD and disc diffusion methods has been reported for *Acinetobacter* spp. strains [14]. In fact, some strains initially classified as resistant by the BMD method were found to be fully susceptible on repeat testing [14]. In our study, the determination of the MIC of cefiderocol by BMD

was repeated whenever a discrepancy was found between the BMD method and the test evaluated at more than one dilution, or resulted in a change in the categorization of the strain. In total, 16 strains (16.5%), initially classified as resistant ($n = 3$) or susceptible ($n = 13$), changed category on repeat testing. In addition, as previously mentioned, the interpretation of the BMD tests is often complicated by the presence of a haze or trail [14]. Indeed, more than a third (31%) of the strains tested in our collection were difficult to interpret, and the MIC of cefiderocol was determined after several tests.

The results obtained in this study using cefiderocol MTS gradient strips on clinical isolates of *Acinetobacter* spp. did not differ from those previously observed for *Enterobacteriales* and *P. aeruginosa* isolates, as they dramatically underestimated the cefiderocol MIC values [10,11]. At present, their use is strongly discouraged because of the risk of failing to identify a cefiderocol-resistant strain. Considering the acceptability criteria for *P. aeruginosa* ATCC 27853 quality control strain values published by EUCAST in August 2022 (± 1 mm from the target value), one to five values out of six experiments were above the acceptable limit, indicating that it would be difficult to interpret cefiderocol disc diffusion using these criteria [12]. From our study, it appears that the cut-off diameter corresponding to the PK/PD breakpoint established by EUCAST (≥ 17 mm, susceptible) is not sufficiently reliable for determining cefiderocol susceptibility on *Acinetobacter* spp. clinical strains. Indeed, a large number of strains (from 18 to 27 isolates, depending on the disc tested) were categorized as susceptible, whereas they were resistant by the reference method (Figure 2). A revision of the cut-off diameter seems necessary if its use is to be maintained. However, the disc diffusion method might be used as a screening tool for cefiderocol-susceptible strains. Over 21 mm (≥ 22 mm), all isolates were categorized as susceptible to cefiderocol, regardless of the disc supplier (Figure 2). For strains with an inhibition zone diameter < 22 mm, we suggest to confirm the disc zone diameter by a BMD method. However, this study was conducted with only one MHA supplier (Becton Dickinson) and further investigations are required to validate this breakpoint diameter with discs from other manufacturers.

Previous studies have reported that the production of PER- and NDM- β -lactamases is associated with an increase in cefiderocol MICs [19,20]. While it is difficult to predict cefiderocol susceptibility in *Enterobacteriales* and *P. aeruginosa* clinical isolates, identification of the β -lactamase resistance mechanisms in *Acinetobacter* spp. isolates can help predict cefiderocol susceptibility. In our collection, all PER-type β -lactamase-producing strains ($n = 10$) were highly resistant to cefiderocol (MIC > 16 mg/L), and more than 80% of strains producing NDM-like enzymes ($n = 26/31$) were also resistant to cefiderocol (MIC ≥ 4 mg/L). Four NDM-1-producing strains were susceptible with MIC close to the PK-PD breakpoint (MIC = 2 mg/L) (Table S1). Oxacillinase-producing strains that do not co-produce NDM-like or PER-like enzymes ($n = 52/97$) were more likely to be susceptible to cefiderocol, as 11.5% of these strains were resistant.

5. Conclusions

While the use of MTS strips should be strongly discouraged due to their underestimation of cefiderocol MICs, the disc diffusion method should be used as a susceptibility screening tool with a cut-off diameter of 22 mm. Although none of the commercially available BMD methods evaluated (UMIC[®] and ComASP[®] tests) met the acceptable criteria defined by the ISO, both showed a CA rate $> 90\%$, allowing their use for determining the cefiderocol susceptibility of *Acinetobacter* spp. isolates. Despite the technical difficulties in assessing cefiderocol MICs, MIC determination remains necessary for carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp., for which therapeutic alternatives are limited. The combination of a cefiderocol screening test by disc diffusion or MIC determination by BMD methods, together with rapid identification of the resistance mechanism, could help laboratories to categorize susceptible and resistant strains. Microbiologists should also alert clinicians to the difficulties in accurately determining the cefiderocol susceptibility of clinical isolates of *Acinetobacter* spp. in order to make the best therapeutic choice.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms11081971/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, K.J., D.F. and A.P.; Methodology, K.J., D.F. and A.P.; Validation, D.F. and A.P.; Formal analysis, S.G., P.T., S.P., V.P. and A.P.; Resources, P.T.; Data curation, D.F. and A.P.; Writing—original draft, A.P.; Writing—review & editing, K.J., D.F. and A.P.; Supervision, K.J., D.F. and A.P.; Funding acquisition, K.J. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: FNRC-AR is funded by the French Ministry of Health through the Santé publique France agency.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available upon request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Jiang, Y.; Ding, Y.; Wei, Y.; Jian, C.; Liu, J.; Zeng, Z. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*: A challenge in the intensive care unit. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 1045206. [CrossRef] [PubMed]
- Wong, D.; Nielsen, T.B.; Bonomo, R.A.; Pantapalangkoor, P.; Luna, B.; Spellberg, B. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: A century of challenges. *Clin. Microbiol. Rev.* **2017**, *30*, 409–447. [CrossRef] [PubMed]
- Tacconelli, E.; Carrara, E.; Savoldi, A.; Harbarth, S.; Mendelson, M.; Monnet, D.L.; Pulcini, C.; Kahlmeter, G.; Kluytmans, J.; Carmeli, Y.; et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: The WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 318–327. [CrossRef] [PubMed]
- Candel, F.J.; Santerre Henriksen, A.; Longshaw, C.; Yamano, Y.; Oliver, A. In vitro activity of the novel siderophore cephalosporin, cefiderocol, in Gram-negative pathogens in Europe by site of infection. *Clin. Microbiol. Infect.* **2022**, *28*, 447.e1–447.e6. [CrossRef] [PubMed]
- Karlowsky, J.A.; Hackel, M.A.; Tsuji, M.; Yamano, Y.; Echols, R.; Sahm, D.F. In vitro activity of cefiderocol, a siderophore cephalosporin, against Gram-negative bacilli isolated by clinical laboratories in North America and Europe in 2015–2016: SIDERO-WT-2015. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2019**, *53*, 456–466. [CrossRef] [PubMed]
- Zhanel, G.G.; Golden, A.R.; Zelenitsky, S.; Wiebe, K.; Lawrence, C.K.; Adam, H.J.; Idowu, T.; Domalaon, R.; Schweizer, F.; Zhanel, M.A.; et al. Cefiderocol: A siderophore cephalosporin with activity against carbapenem-resistant and multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *Drugs* **2019**, *79*, 271–289. [CrossRef] [PubMed]
- Tamma, P.D.; Aitken, S.L.; Bonomo, R.A.; Mathers, A.J.; van Duin, D.; Clancy, C.J. Infectious Diseases Society of America guidance on the treatment of AmpC β -lactamase-producing *Enterobacterales*, carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, and *Stenotrophomonas maltophilia* infections. *Clin. Infect. Dis.* **2022**, *74*, 2089–2114. [CrossRef] [PubMed]
- Paul, M.; Carrara, E.; Retamar, P.; Tängdén, T.; Bitterman, R.; Bonomo, R.A.; de Waele, J.; Daikos, G.L.; Akova, M.; Harbarth, S.; et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European society of intensive care medicine). *Clin. Microbiol. Infect.* **2022**, *28*, 521–547. [CrossRef] [PubMed]
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Cefiderocol MIC Testing—Guidance Document. Available online: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Guidance_documents/Cefiderocol_MIC_testing_EUCAST_guidance_document_201217.pdf (accessed on 2 July 2023).
- Devoos, L.; Biguenet, A.; Rousselot, J.; Bour, M.; Plésiat, P.; Fournier, D.; Jeannot, K. Performance of discs, sensititre EUMDROXF microplates and MTS gradient strips for the determination of the susceptibility of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* to cefiderocol. *Clin. Microbiol. Infect.* **2023**, *29*, 652.e1–652.e8. [CrossRef] [PubMed]
- Bonnin, R.A.; Emeraud, C.; Jousset, A.B.; Naas, T.; Dortet, L. Comparison of disk diffusion, MIC test strip and broth microdilution methods for cefiderocol susceptibility testing on carbapenem-resistant *Enterobacterales*. *Clin. Microbiol. Infect.* **2022**, *28*, 1156.e1–1156.e5. [CrossRef] [PubMed]
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Warnings. Available online: <https://www.eucast.org/ast-of-bacteria/warnings> (accessed on 12 June 2023).
- Simner, P.J.; Patel, R. Cefiderocol antimicrobial susceptibility testing considerations: The Achilles' Heel of the Trojan Horse? *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *59*, e00951–20. [CrossRef] [PubMed]
- Simner, P.J.; Palavecino, E.L.; Satlin, M.J.; Mathers, A.J.; Weinstein, M.P.; Lewis, J.S.; Humphries, R. Potential of inaccurate cefiderocol susceptibility results: A CLSI AST subcommittee advisory. *J. Clin. Microbiol.* **2023**, *61*, e0160022. [CrossRef]
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters. Version 13.0. 2023. Available online: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.0_Breakpoint_Tables.pdf (accessed on 12 May 2023).
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100 S*, 33rd ed.; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2023.

17. Matuschek, E.; Longshaw, C.; Takemura, M.; Yamano, Y.; Kahlmeter, G. Cefiderocol: EUCAST criteria for disc diffusion and broth microdilution for antimicrobial susceptibility testing. *J. Antimicrob. Chemother.* **2022**, *77*, 1662–1669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Dortet, L.; Nicolai, C.; Pfennigwerth, N.; Frisch, S.; Gonzalez, C.; Antonelli, A.; Giani, T.; Hoenings, R.; Gatermann, S.; Rossolini, G.M.; et al. Performance evaluation of the UMIC[®] Cefiderocol to determine MIC in Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **2023**, *20*, dkad149, *epub ahead of print*. [[CrossRef](#)]
19. Poirel, L.; Sadek, M.; Nordmann, P. Contribution of PER-type and NDM-type β -Lactamases to cefiderocol resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2021**, *65*, e0087721. [[CrossRef](#)]
20. Kaye, K.S.; Naas, T.; Pogue, J.M.; Rossolini, G.M. Cefiderocol, a siderophore cephalosporin, as a treatment option for infections caused by carbapenem-resistant Enterobacterales. *Infect. Dis. Ther.* **2023**, *12*, 777–806. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Titre : Caractérisation de variants ADC et de mécanismes impliqués dans la résistance au céfidérocol et aux carbapénèmes chez *Acinetobacter baumannii*

Mots clés : *Acinetobacter baumannii*, résistance aux β -lactamines, ADC, céfidérocol

Résumé : Bactérie pathogène opportuniste, *Acinetobacter baumannii* est bien connue des services de réanimation. Sa capacité d'acquisition et d'accumulation de nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques lui a valu d'être classée prioritaire par l'OMS pour le développement de nouvelles alternatives thérapeutiques en 2018.

La résistance aux antibiotiques de dernier recours comme les carbapénèmes chez *A. baumannii* est particulièrement problématique. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux mécanismes intrinsèques de résistance à ces molécules, ainsi qu'aux mécanismes de résistance au céfidérocol, β -lactamine mise sur le marché en 2020.

Le rôle de la céphalosporinase naturelle ADC a notamment été étudié, et a amené à la caractérisation de variants hydrolysant le méropénème (ADC-200 et ADC-256) ou associés à une diminution de sensibilité au céfidérocol (ADC-56, ADC-268 et ADC-276).

D'autres gènes naturellement présents chez *A. baumannii*, comme les gènes codant les PLPs, les régulateurs des systèmes d'efflux ou participant à l'import du fer dans la bactérie semble également impliqués dans la diminution de sensibilité au céfidérocol. L'accumulation de différents mécanismes permet d'atteindre des niveaux de résistance cliniquement significatifs.

Nos travaux ont aussi permis de démontrer que d'autres mécanismes transférables pouvaient contribuer à la perte de sensibilité au céfidérocol, comme la production des enzymes de type NDM.

Le variant NDM-9, grâce à son résidu glutamate en position 152, est capable d'hydrolyser plus efficacement le céfidérocol que NDM-1.

Title : Characterization of ADC variants and mechanisms involved in resistance to cefiderocol and carbapenems in *Acinetobacter baumannii*

Keywords : *Acinetobacter baumannii*, β -lactams resistance, ADC, cefiderocol

Abstract : *Acinetobacter baumannii* is an opportunistic pathogen well known in intensive care units. Its ability to acquire and accumulate numerous antibiotic resistance mechanisms has led to it being identified by the WHO as a priority for the development of new therapeutic alternatives in 2018.

Resistance to last-resort antibiotics such as carbapenems in *A. baumannii* is particularly threatening. In this study, we investigated the intrinsic mechanisms of resistance to these molecules as well as the mechanisms of resistance to cefiderocol, a β -lactamase that has been launched in 2020.

The role of the natural cephalosporinase ADC has been studied, leading to the characterisation of variants that hydrolyse meropenem (ADC-200 and ADC-256) or are associated with reduced sensitivity to cefiderocol (ADC-56, ADC-268 and ADC-276).

Other genes naturally present in *A. baumannii*, such as genes encoding PLPs, regulating efflux systems or involved in the import of iron into the bacterium, also appear to be involved in reducing susceptibility to cefiderocol. The accumulation of different mechanisms makes it possible to achieve clinically significant levels of resistance.

Our work has also shown that other transferable mechanisms could contribute to the loss of susceptibility to cefiderocol, such as the production of NDM-type enzymes.

The NDM-9 variant is able to hydrolyse cefiderocol more efficiently than NDM-1, thanks to its glutamate residue at position 152.