



Adaptation des Mécanismes de Résistance par Efflux Actif chez les Souches de *Pseudomonas aeruginosa* dans la Mucoviscidose

Lucie Vettoretti

► To cite this version:

Lucie Vettoretti. Adaptation des Mécanismes de Résistance par Efflux Actif chez les Souches de *Pseudomonas aeruginosa* dans la Mucoviscidose. Bactériologie. Université de Franche-Comté, 2009. Français. NNT : 2009BESA0003 . tel-02104185

HAL Id: tel-02104185

<https://univ-fcomte.hal.science/tel-02104185>

Submitted on 19 Apr 2019

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.

Université de Franche-Comté
Faculté de Médecine et de Pharmacie

N° 25-09-05

Thèse
Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Franche-Comté
en Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée par
Lucie VETTORETTI

**Adaptation des Mécanismes de Résistance par Efflux Actif chez les
Souches de *Pseudomonas aeruginosa* dans la Mucoviscidose**

Soutenue le 25 juin 2009

Devant le jury composé de :

Pr. Catherine NEUWIRTH
Dr. Thilo KÖHLER
Pr. Benoît GUERY
Dr. Jacques CROIZE
Pr. Patrick PLESIAT
Dr. Catherine LLANES

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de Thèse
Co-Directeur de Thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier vivement le directeur de cette thèse, le Professeur Patrick PLESIAT, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche et m'avoir fait confiance. Il m'a guidée et conseillée pendant toutes ces années et son assistance aussi bien matérielle que morale m'a permis de faire cette thèse dans de bonnes conditions.

Je tiens également à remercier le Docteur Catherine LLANES pour les précieux conseils qu'elle a bien voulu me dispenser durant l'élaboration de cette thèse et pour la patience qu'elle a manifestée à mon égard.

Malgré leur charge de travail, le Professeur Catherine NEUWIRTH, responsable du laboratoire de Bactériologie du CHU de Dijon, et le Docteur Thilo KÖHLER, chercheur au Centre Médical Universitaire de Genève, ont accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et je les en remercie de même que pour leur participation au jury.

Le Professeur Benoît GUERY du CHU de Lille et le Docteur Jacques CROIZE du CHU de Grenoble, qui m'ont fait l'honneur de participer au jury de soutenance et d'y apporter leurs expertises ; je les en remercie profondément.

Mes remerciements s'adressent également au Professeur Jean Charles DALPHIN responsable du service de Pneumologie du CHU de Besançon. L'étroite collaboration développée entre son service, le CRCM et le laboratoire de Bactériologie m'a permis de réaliser mes recherches sur des souches de la biothèque constituée au fil des années.

S'agissant de l'apprentissage puis de la maîtrise des techniques de mutagenèse dirigée et puces Clondiag[®], je remercie le Docteur Ina ATTREE du Laboratoire de Biochimie et de Biophysique des Systèmes Intégrés (UMR CNRS 5092) et le Docteur Thilo KÖHLER pour leurs conseils et l'hospitalité dont ils ont fait preuve envers moi lors des séjours que j'ai effectués à Grenoble et à Genève.

Le Laboratoire d'Hygiène Hospitalière du CHU de Besançon a réalisé le génotypage par électrophorèse en champ pulsé. Cette collaboration a été précieuse pour une partie de mes travaux et je tiens à remercier toute l'équipe.

En ce qui concerne la modélisation 3D de la protéine MexY je remercie Monsieur Gilles Phan du Laboratoire de Cristallographie, RMN Biologique (UMR CNRS 8015) de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Paris V pour cette réalisation.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans associer toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Enfin, je remercie ma famille et mes amis pour leurs encouragements et dédicace ce mémoire à mon Père trop tôt disparu.

Je tiens à mentionner que ce travail n'aurait pu être réalisé sans le soutien financier de l'association Vaincre la Mucoviscidose et du Conseil régional de Franche-Comté.

Sommaire

Introduction	11
---------------------	-----------

Revue de la littérature	15
--------------------------------	-----------

I. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> et mucoviscidose	19
1. Rappels sur la maladie	19
a. Génétique et épidémiologie	19
b. Déficits cellulaires et fonctionnels	20
c. Présentations cliniques	22
d. Progrès récents dans la prise en charge thérapeutique	24
2. Colonisation et infection par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
3. Conséquences cliniques et thérapeutiques	25
a. Infection et inflammation	25
b. Traitements antibiotiques usuels	26
4. Emergence de la résistance aux antibiotiques chez les isolats CF	28
a. Fréquence de la résistance observable <i>in vitro</i>	28
b. Détermination des profils de sensibilité et critères d'interprétation	29
c. Emergence de la résistance chez le patient	31
II. La résistance stable génotypique	32
1. Résistance aux β -lactamines	32
a. Les β -lactamases	33
b. L'efflux actif des β -lactamines	37
c. Les porines	53
d. Les Protéines Liant des Pénicillines (PLP ou PBP)	54
2. Résistance aux aminosides	55
a. Les enzymes modificateurs des aminosides	57
b. Résistance par efflux actif	59
c. Résistance par modification des lipopolysaccharides membranaires (LPS)	60
d. Résistance par méthylation de l'ARN16S	62
3. Résistance à la colistine	63
4. Résistance aux fluoroquinolones	64
a. Résistance par altération des cibles (QRDR)	65
b. Résistance par efflux actif	67
c. Résistance par modification de la perméabilité membranaire.	68
III. Résistance instable « phénotypique »	70
1. Induction de la β -lactamase AmpC	70
2. La résistance adaptative aux aminosides	72
a. Définition	72
b. Induction du système MexXY	72
c. Induction de la respiration anaérobie	74
d. Pertinence <i>in vivo</i>	75
3. Environnement pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose	76
a. Le mucus bronchique	76
b. Développement sous forme de biofilm	77
4. Résistance aux antibiotiques inhérente au mode de vie en biofilm	80
a. Micro-environnement protecteur conféré par le biofilm	81
b. Analyses transcriptionnelles globales	82
5. Small-colony variants (SCV)	85

Matériel et méthodes	89
-----------------------------	-----------

I. Techniques microbiologiques	91
1. Souches et plasmides	91
2. Milieux de culture	92

3.	Antibiogrammes	93
4.	Concentration minimale inhibitrice (CMI)	93
a.	CMI par dilution en milieu gélosé	93
b.	CMI en microplaque	94
c.	CMI par E-test	94
5.	Bactéricidie	94
6.	Facteurs de virulence	94
7.	Cinétique de croissance	95
8.	Test de formation de biofilm	95
II.	Techniques de biologie moléculaire	96
1.	Extraction de l'ADN	96
a.	Extraction d'ADN génomique à l'aide d'un kit	96
b.	Extraction d'ADN plasmidique selon la méthode de Kieser	96
c.	Extraction d'ADN plasmidique pour le clonage et le séquençage	97
2.	Amplification d'ADN par PCR et purification de son produit	97
3.	Dosage de l'ADN	98
4.	Electrophorèse analytique d'ADN	98
5.	Séquençage d'ADN	98
6.	Techniques de clonage	100
a.	Restriction enzymatique	100
b.	Ligature	100
c.	Transformation bactérienne	100
7.	Inactivation du gène <i>mexB</i> par recombinaison homologue	102
8.	Mutagenèse dirigée	104
III.	Génotypage	106
1.	Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	106
2.	Puces Clondiag®	107
3.	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE)	110
4.	Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA)	111
IV.	Quantification des ARNm par RT-PCR en temps réel	113
1.	Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADNc	113
2.	Amplification de l'ADNc	113
3.	Quantification de l'expression génique	114
V.	Analyse protéique	116
1.	Modélisation 3D	116
2.	Préparation des membranes totales de <i>P. aeruginosa</i>	116
3.	Préparation des membranes externes de <i>P. aeruginosa</i>	116
4.	Dosage des protéines - méthode à l'acide bicinchoninique	117
5.	Dosage de l'activité céphalosporinase AmpC	117
6.	Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	117
7.	Coloration au bleu de Coomassie	118
8.	Immuno-détection	118
	Résultats (1)	121
I.	Contexte clinique de l'étude - Problématique	125
II.	Prévalence des souches hypersensibles à la ticarcilline.	127
III.	Etude de l'activité céphalosporinase AmpC	130
IV.	Implication du système d'efflux actif MexAB-OprM dans le phénotype Tic^{HS}	131
1.	Production du système MexAB-OprM	133
a.	Expression de l'opéron, production des protéines	133
b.	Etude des gènes régulateurs de <i>mexAB-oprM</i>	133
c.	Etude de la co-régulation de MexAB-OprM avec d'autres systèmes d'efflux	134
2.	Intégrité du système d'efflux MexAB-OprM	135
3.	Fonctionnalité du système MexAB-OprM	138

4.	Conclusion : MexAB-OprM et phénotype Tic ^{HS}	140
V.	Implication du système MexXY(OprM) dans la résistance aux aminosides	140
1.	Surproduction du système MexXY(OprM)	140
2.	Contribution de MexXY(OprM) à la résistance aux aminosides	142
3.	Fonctionnalité du système MexXY(OprM)	144
4.	Conclusion : MexXY et résistance aux aminosides	151
VI.	Article	151
VII.	Résultats complémentaires	152
1.	Résistance à la ciprofloxacine : séquençage des QRDR	152
2.	Courbes de croissance	153
	Résultats (2)	157
I.	Contexte clinique de l'étude - Problématique	159
II.	Sélection des patients et des souches CF de colonisation chronique	160
III.	Génotypage des souches et comparaison des techniques utilisées	161
IV.	Suivi de la colonisation chez les différents patients sélectionnés	169
1.	Evolution de la résistance chez la patiente 1 [planche 1]	171
2.	Evolution de la résistance chez la patiente 7 [planche 2]	173
3.	Evolution de la résistance chez le patient 3 [planche 3]	175
4.	Diversification des souches de <i>P. aeruginosa</i> isolées chez le patient 4 [planche 4]	177
5.	Diversification des souches de <i>P. aeruginosa</i> isolées chez la patiente 5 [planche 5]	179
6.	Diversification des souches de <i>P. aeruginosa</i> isolées chez le patient 6 [planche 6]	181
V.	Conclusion	182
	Conclusion - Perspectives	185
	Annexe 1	193
	Annexe 2	195
	Références Bibliographiques	197

Liste des figures

Figure 1. Différentes catégories de mutations affectant la synthèse ou le fonctionnement de la protéine CFTR	18
Figure 2. Structure hypothétique du canal CFTR	21
Figure 3. Rôle du canal CFTR dans les échanges ioniques des cellules épithéliales pulmonaires	23
Figure 4. Comparaison de la clairance mucociliaire chez un sujet sain et chez un patient atteint de mucoviscidose	23
Figure 5. Flore bactérienne colonisant les poumons de patients atteints de mucoviscidose	25
Figure 6. Colonies de <i>P. aeruginosa</i> sauvage et mucoïde	27
Figure 7. Structure générale des β -lactamines	32
Figure 8. Antibiotogrammes de la souche PAOI et d'une souche surproduisant la céphalosporinase AmpC	33
Figure 9. Mécanisme de régulation de l'expression du gène <i>ampC</i>	34
Figure 10. Représentation schématique des différentes familles de systèmes d'efflux actif chez les bactéries à Gram négatif	38
Figure 11. Organisation structurale d'un système d'efflux actif tripartite de la famille RND d'après le modèle de cristallisation de AcrAB-TolC de <i>E. coli</i>	38
Figure 12. Représentations 2D et 3D de la protéine de membrane interne	40
Figure 13. Représentation schématique du réseau putatif de translocation des protons à travers la protéine AcrB de <i>E. coli</i>	41
Figure 14. Structure d'un monomère MexA de <i>P. aeruginosa</i>	42
Figure 15. Organisation trimérique de la protéine OprM et mécanisme d'ouverture de la protéine TolC	43
Figure 16. Représentation schématique des opérons codant les systèmes d'efflux actif impliqués dans la résistance aux β -lactamines	45
Figure 17. Antibiotogrammes de la souche PAOI et d'une souche surproduisant le système d'efflux actif MexAB-OprM	46
Figure 18. Régulation de l'expression de l'opéron <i>mexAB-oprM</i> .	48
Figure 19. Antibiotogrammes de la souche PAOI et d'une souche surproduisant le système d'efflux actif MexCD-OprJ	50
Figure 20. Antibiotogrammes de la souche PAOI et d'une souche surproduisant le système d'efflux actif MexXY(OprM)	51
Figure 21. Antibiotogrammes de la souche PAOI et d'une souche surproduisant le système d'efflux actif MexEF-OprN	52
Figure 22. Structure d'un monomère de la porine OprD	53
Figure 23. Antibiotogrammes de la souche PAOI et d'une souche déficiente en porine OprD	54
Figure 24. Structure des aminosides à noyau 2-désoxystreptamine bisubstitué en 4,5 ou en 4,6	56
Figure 25. Principales enzymes modificatrices des aminosides	57
Figure 26. Organisation et régulation de l'expression de l'opéron <i>mexXY</i>	59
Figure 27. Représentation schématique de la structure d'une molécule de LPS	61
Figure 28. Structure de la colistine (polymyxine E1).	63
Figure 29. Structure d'une fluoroquinolone : la ciprofloxacine	65
Figure 30. Inductibilité de la céphalosporinase AmpC chez la souche sauvage PAOI	71
Figure 31. Représentation schématique de la régulation de l'expression de l'opéron <i>mexXY</i> chez la souche PAOI	74
Figure 32. Culture de souches de <i>P. aeruginosa</i> dans un milieu artificiel reproduisant le mucus bronchique	77
Figure 34. Modèle d'induction de la formation de biofilm par les aminosides	80
Figure 35. Aspect morphologique de colonies de <i>P. aeruginosa</i> CF sauvage, d'un small-colony variant dérivant de cette même souche et d'un révertant	86

Figure 36. Evaluation qualitative du caractère hémolytique des souches de <i>P. aeruginosa</i> et de leur production de rhamnolipides	95
Figure 37. Test d'adhérence cellulaire	96
Figure 38. Stratégie utilisée pour inactiver le gène <i>mexB</i> chez PAO1 et chez les isolats cliniques	103
Figure 39. Stratégie utilisée pour obtenir la substitution F1018L dans <i>MexY</i>	104
Figure 40. Principe de la méthode de mutagenèse dirigée	105
Figure 41. Disposition, identification des sondes et des témoins positifs greffés sur la matrice de l'array tube <i>P. aeruginosa</i> (Clondiag®)	107
Figure 42. Révélation d'une puce Clondiag®	108
Figure 43. Critères d'interprétation des SNPs	109
Figure 44. Exemple d'amplification du locus 212 chez les souches de <i>P. aeruginosa</i> PAO1 et PA14	111
Figure 45. Statut bactériologique des 114 patients atteints de mucoviscidose suivis par le Centre de Ressource et de Compétence de la Mucoviscidose de Besançon	124
Figure 46. AntibioGramme d'une souche CF de <i>P. aeruginosa</i> présentant le phénotype particulier d'hypersensibilité aux β -lactamines et de résistance aux aminosides	124
Figure 47. Sensibilité à la ticarcilline et à la tobramycine de 189 souches CF collectées chez 46 patients entre 1998 et 2007	126
Figure 48. Profils de migration des souches sélectionnées après amplification aléatoire de l'ADN génomique (RAPD) avec l'amorce unique 272	127
Figure 49. Test d'inductibilité de la céphalosporinase <i>AmpC</i> chez la souche sauvage PAO1 et chez 2 isolats cliniques (2716 et 2721)	130
Figure 50. Analyse des protéines membranaires chez les isolats CF Tic ^{HS}	132
Figure 51. Quantification des transcrits des gènes codant les protéines régulatrices de <i>mexAB-oprM</i> chez 2 souches sauvages (PAO1, 3020S) et 2 souches Tic ^{HS} (3020R, 2858) sous-exprimant l'opéron	134
Figure 52. Représentation schématique des protéines <i>MexB</i> et <i>MexA</i> produites par les souches 2804, 3066 et 2993	135
Figure 53. Stratégie utilisée pour inactiver le gène <i>mexB</i> par recombinaison homologe	138
Figure 54. Quantification de l'expression du gène <i>mexY</i> par RT-PCR en temps réel et immuno-détection de la protéine dans des extraits membranaires	141
Figure 55. Niveaux de résistance à la gentamicine des 11 souches cliniques	142
Figure 56. Stratégie utilisée pour inactiver le gène <i>mexY</i> par intégration d'un plasmide suicide	143
Figure 57. Localisation des substitutions détectées dans la protéine <i>MexY</i> sur un modèle 2D de la pompe <i>MexB</i>	146
Figure 58. Modélisation 3D d'un dimère de <i>MexY</i> et localisation des substitutions F29S et F1018L	147
Figure 59. Interaction entre F1018 et Y542 sur un modèle structural de <i>MexY</i>	149
Figure 60. Modèle rotatif d'efflux d' <i>AcrB</i>	150
Figure 61. Courbes de croissance de la souche de référence PAO1 et des isolats CF sélectionnés	154
Figure 62. Apparition chronologique de différents phénotypes de résistance chez un patient CF colonisé de façon chronique	160
Figure 63. Profils de migration obtenus après amplification aléatoire de l'ADN génomique (RAPD)	162
Figure 64. Analyse qualitative de la production de rhamnolipides et du caractère hémolytique	177

Liste des tableaux

Tableau 1. Concentrations critiques de différents antibiotiques anti-pyocyanique _____	29
Tableau 2. Pourcentages de souches CF de <i>P. aeruginosa</i> sensibles à différents anti-pyocyanique _____	30
Tableau 3. Altérations dans les protéines régulant l'expression du gène <i>ampC</i> _____	36
Tableau 4. Concentrations minimales inhibitrices de sept β -lactamines chez différents mutants délétés _____	36
Tableau 5. Principaux substrats des systèmes d'efflux actif de <i>P. aeruginosa</i> _____	39
Tableau 6. Effet de la surproduction des systèmes Mex sur la résistance de <i>P. aeruginosa</i> aux antibiotiques _____	45
Tableau 7. Prévalence de la résistance enzymatique _____	58
Tableau 8. Mutations dans les sous-unités de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV _____	66
Tableau 9. Activité céphalosporinase, basale et induite, chez 7 isolats CF _____	71
Tableau 10. Gènes de <i>P. aeruginosa</i> dont l'expression varie lorsque la bactérie est cultivée en biofilm _____	84
Tableau 11. Gènes de <i>P. aeruginosa</i> dont l'expression varie lorsque le biofilm est exposé à la tobramycine _____	85
Tableau 12. Liste des souches utilisées _____	91
Tableau 13. Liste des plasmides utilisés _____	92
Tableau 14. Couples d'amorces utilisés pour le séquençage des gènes codant les systèmes d'efflux et leurs régulateurs _____	99
Tableau 15. Couples d'amorces utilisés pour le séquençage des QRDR _____	100
Tableau 16. Protocoles utilisés pour l'électroporation des souches de <i>E. coli</i> et de <i>P. aeruginosa</i> _____	101
Tableau 17. Liste des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée _____	106
Tableau 18. Liste des amorces utilisées pour le génotypage _____	112
Tableau 19. Amorces utilisées pour la quantification de l'expression génique par RT-PCR en temps réel. _____	115
Tableau 20. Valeurs des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de différents antibiotiques chez les souches CF de <i>P. aeruginosa</i> _____	128
Tableau 21. Dosage spectrophotométrique (A_{482}) de l'activité céphalosporinase AmpC _____	131
Tableau 22. Quantification de l'expression des gènes codant les protéines de différents systèmes d'efflux actif _____	137
Tableau 23. CMI de 3 substrats du système MexAB-OprM, avant et après inactivation du gène <i>mexB</i> _____	139
Tableau 24. Mécanismes défaillants impliquant l'hypersensibilité aux β -lactamines chez les isolats CF _____	139
Tableau 25. Mutations mises en évidence dans le gène <i>mexZ</i> chez les isolats étudiés _____	141
Tableau 26. Résistance à la gentamicine après la répression de <i>mexXY</i> (<i>pAZI7</i>) ou l'inactivation de <i>mexY</i> (<i>pUCΔY</i>) _____	144
Tableau 27. Substitutions d'acides aminés détectées dans les protéines MexX et MexY _____	146
Tableau 28. Niveaux de résistance de la souche FE60 après complémentation avec des variants mutés dans les gènes <i>mexX</i> et <i>mexY</i> _____	148
Tableau 29. Patients CF sélectionnés pour l'étude _____	161
Tableau 30. Comparaison des méthodes de génotypage utilisées dans l'analyse des séries hypervariables _____	164
Tableau 31. Interprétation des puces Clondiag® _____	166

Liste des planches 1

<i>Planche 1. Isolats du patient 1</i>	<i>170</i>
<i>Planche 2. Isolats du patient 7</i>	<i>172</i>
<i>Planche 3. Isolats du patient 3</i>	<i>174</i>
<i>Planche 4. Diversification des clones isolés chez le patient 4</i>	<i>176</i>
<i>Planche 5. Isolats du patient 5</i>	<i>178</i>
<i>Planche 6. Isolats du patient 6</i>	<i>180</i>

Liste des abréviations

A _{xxx}	: absorbance à xxx nm
ADN	: acide désoxyribonucléique
AMM	: autorisation de mise sur le marché
ARN	: acide ribonucléique
ARNm	: acide ribonucléique messenger
BCIP	: 5-bromo-1-chloro-3-indolylphosphate
BET	: bromure d'éthidium
BSA	: <i>bovine serum albumin</i>
BSAC	: <i>British Society of Antimicrobial Chemtherapy</i>
CA-SFM	: Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie
Chr	: chromosome
CLSI	: <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	: concentration minimale inhibitrice
CF	: <i>cystic fibrosis</i> (mucoviscidose)
CTAB	: <i>cethyltrimethyl ammonium bromide</i> (cétrimide)
dNTP	: désoxyribonucléoside triphosphate
ECBC	: examen cytobactériologique des crachats
EDS	: eau distillée stérile
EDTA	: acide éthylène diamine tétraacétique
Flp	: recombinaise de <i>S. cerevisiae</i>
FRT	: <i>flp recombinaise target</i>
GFP	: <i>green fluorescent protein</i>
h	: heure
HEPES	: acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthanesulfonique
HRP	: <i>horseradish peroxydase</i>
kb	: kilobase
mA	: milli Ampère
MH	: Mueller Hinton
mn	: minute
MOPS	: acide 3-(N-morpholino)propane sulfonique
NBT	: chlorure de nitrobleu de tétrazolium
PCR	: <i>polymerase chain reaction</i>
pb	: paire de bases
psi	: <i>pounds per square inch</i> (6 894,75 Pascals)
p/v	: poids/volume
RT-PCR	: <i>reverse transcription PCR</i>
s	: seconde
SDS	: sodium dodécyl sulfate
TAE	: tris acétate EDTA
TBE	: tris borate EDTA
TMB	: 3,3',5,5',tetraméthylbenzidine
UFC	: unité formant colonie
UV	: ultra violet
vol.	: volume
v/v	: volume/volume
wt	: <i>wild type</i>

Introduction

Avec une incidence généralement estimée à 1 sur 4600 naissances, la mucoviscidose (CF) est l'affection héréditaire la plus fréquente dans les populations d'origine caucasienne. Du point de vue clinique, la mucoviscidose se caractérise par une perturbation des échanges hydro-électriques transmembranaires au niveau des cellules épithéliales des tissus exocrines, notamment des voies aériennes. La production d'un mucus visqueux qui en résulte favorise la colonisation bronchique par diverses espèces bactériennes dont la plus significative sur le plan de la pathogénicité est *Pseudomonas aeruginosa*. Cette bactérie de l'environnement parvient à s'implanter chez les patients atteints de mucoviscidose et à aggraver la symptomatologie pulmonaire par son action pro-inflammatoire. La présence de *P. aeruginosa* s'accompagne souvent d'une dégradation progressive de la fonction respiratoire, rythmée par des phases d'exacerbation infectieuse. Le traitement de ce type d'infection-colonisation repose généralement sur l'utilisation d'antibiotiques tels que les β -lactamines et les aminosides. Si l'éradication de la bactérie peut être obtenue aux premiers stades de la colonisation grâce à l'administration d'antibiotiques adaptés, elle devient pratiquement impossible lorsque l'infection a atteint un stade chronique. En effet, malgré l'administration massive et répétée d'antibiotiques par voie parentérale et sous forme d'aérosols, *P. aeruginosa* subsiste dans les voies aériennes. Cette mauvaise efficacité thérapeutique résulte en partie des nombreux mécanismes de résistance, stables ou instables, développés par la bactérie chez le patient CF. Ainsi, *P. aeruginosa* peut acquérir des mécanismes instables, dits « phénotypiques » ou « adaptatifs » associés à son mode de vie dans l'environnement particulier du poumon CF. Ces adaptations phénotypiques n'excluent cependant pas l'acquisition de caractères de résistance stables liés à la survenue de mutations spontanées ou dus à des transferts de gènes (plasmides, transposons) entre espèces bactériennes. La résistance aux β -lactamines et aux aminosides observée chez de nombreuses souches CF implique fréquemment la surproduction de systèmes d'efflux actifs tels que MexXY(OprM), la surproduction de la céphalosporinase naturelle AmpC, une réduction de la perméabilité membranaire (déficit en porine OprF ou OprD).

Une analyse rétrospective de la collection de souches CF constituée sur une dizaine d'années par le laboratoire de Bactériologie du CHU de Besançon a révélé une faible variation de sensibilité des isolats de *P. aeruginosa* aux antibiotiques chez les malades colonisés de façon intermittente. Au contraire, chez la plupart des porteurs chroniques,

on observe, à plus ou moins long terme, une diversification parfois extrême des profils de résistance. Si certaines de ces sous-populations évoluent vers la multirésistance, d'autres deviennent hypersensibles à certains antibiotiques. L'analyse régulière des populations bactériennes présentes dans les expectorations des malades a pu mettre en évidence un phénotype particulier, nommé Tic^{HS}, dont la prévalence au sein de la collection était proche de 30 %. Les souches présentant ce phénotype très peu étudié dans la littérature colonisent, au CHU de Besançon, près d'un patient sur deux dans la mucoviscidose et un patient sur trois dans le cas de bronchite chronique obstructive. Paradoxalement, ces souches deviennent souvent résistantes aux aminosides. Ce travail vise donc à explorer, d'une part, la clonalité de l'ensemble des souches isolées chez un même patient afin d'étudier la diversification des isolats et des phénotypes de résistance au cours du temps, et d'autre part, à caractériser le phénotype Tic^{HS} en précisant notamment l'implication du système d'efflux MexXY(OprM) capable d'exporter les aminosides et du système MexAB-OprM qui joue un rôle majeur dans la résistance naturelle de *P. aeruginosa* aux β -lactamines.

Revue de la littérature

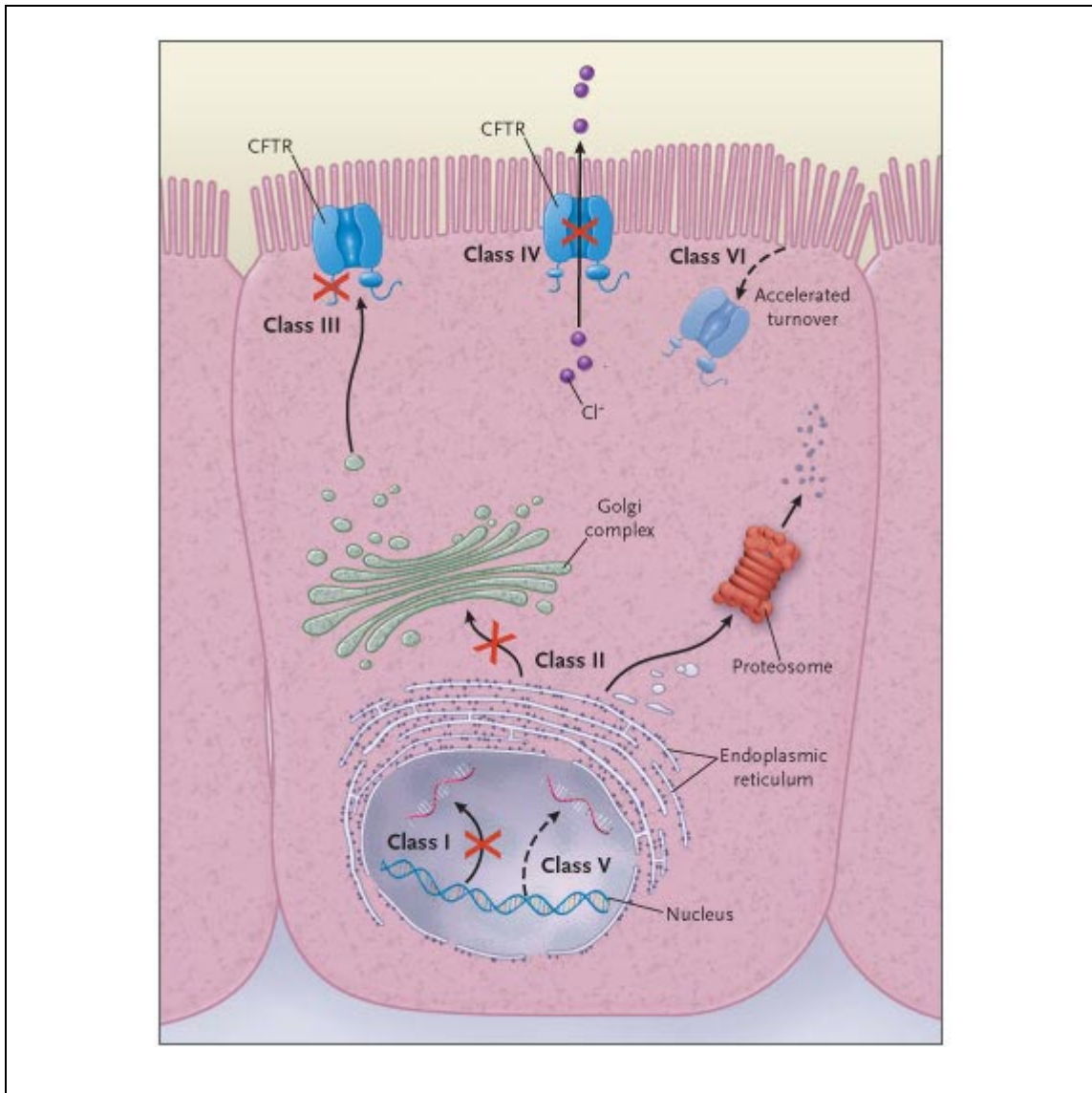


Figure 1. Différentes catégories de mutations affectant la synthèse ou le fonctionnement de la protéine CFTR (Rowe et al. 2005¹⁹¹).

- Mutations de classe I : défaut de synthèse de la protéine,
- Mutations de classe II : défaut de maturation de la protéine,
- Mutations de classe III : défaut d'adressage de la protéine,
- Mutations de classe IV : dysfonctionnement de la conduction de la protéine,
- Mutations de classe V : sous-expression du gène *CF*,
- Mutations de classe VI : instabilité de la protéine.

I. *Pseudomonas aeruginosa* et mucoviscidose

1. Rappels sur la maladie

a. Génétique et épidémiologie

Avec une incidence estimée en France à 1 sur 4600 naissances, la mucoviscidose (CF pour *Cystic Fibrosis*) est l'affection héréditaire la plus fréquente dans les populations d'origine caucasienne (Munck *et al.* 2005¹⁶⁰). Cette maladie à transmission autosomique récessive a pour origine une ou plusieurs mutations dans le gène *CF*. Ce gène de 180 000 pb, situé sur le bras long du chromosome 7, code une protéine nommée CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*). La glycoprotéine CFTR, de 1480 acides aminés, appartient à la famille des transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*) (Rommens *et al.* 1989¹⁹⁰). Elle se situe au niveau du pôle apical des cellules glandulaires exocrines (Anderson *et al.* 1991⁷) et participe au maintien de l'équilibre hydroélectrolytique des sécrétions muqueuses en contrôlant l'excrétion des ions Cl⁻ (Anderson *et al.* 1991⁷). A ce jour, 1566 mutations distinctes affectant le gène *CF* ont été décrites (<http://www.genet.sickkids.on.ca>) et classées en 6 catégories en fonction du type d'anomalie qu'elles provoquent chez la protéine [figure 1] :

- Les mutations de classe 1 entraînent soit (i) un arrêt prématuré de la traduction conduisant à la production d'une protéine tronquée ou à une absence de production, soit (ii) la production d'une protéine aberrante (Welsh and Smith 1993²³¹).
- Les mutations de classe 2 conduisent à la production d'une protéine non glycosylée qui n'est pas correctement adressée à la membrane cellulaire (Welsh and Smith 1993²³¹).
- Les mutations de classe 3 affectent la régulation de la protéine CFTR. Ces mutations sont essentiellement des mutations faux-sens, localisées dans les exons codant les domaines de liaison à l'ATP (Welsh and Smith 1993²³¹).
- Les mutations de classe 4, mutations faux-sens localisées dans les exons codant les domaines transmembranaires, altèrent la conduction ionique. Elles sont souvent considérées comme modérées et conduisent à une symptomatologie moins marquée (Welsh and Smith 1993²³¹).

- Les mutations de classe 5, affectant l'épissage du gène CF, entraînent une réduction de production de la protéine CFTR (Welsh and Smith 1993²³¹).
- Enfin, les mutations de classe 6 réduisent la stabilité du canal CFTR au niveau de la surface cellulaire, augmentant ainsi le "turn-over" de la protéine (Rowe *et al.* 2005¹⁹¹).

Une analyse de prévalence, effectuée sur 43849 chromosomes CF, révèle que toutes les mutations ne présentent pas la même distribution : seules les mutations $\Delta F508$, G542X, G551D, N1303K et W1282X ont une prévalence supérieure à 1 % (<http://www.genet.sickkids.on.ca>). La mutation $\Delta F508$ (mutation de classe 2), correspondant à la délétion d'un résidu phénylalanine en position 508 de la protéine CFTR, est retrouvée dans tous les pays étudiés et observée chez plus de 70 % des malades alors que les 4 autres mutations n'apparaissent que dans certaines populations (Estivill *et al.* 1997⁴⁵). Au sein d'un même pays, la distribution des mutations peut varier de façon significative selon l'origine géographique des patients et certaines mutations sont retrouvées très rarement, voire dans une seule famille (Bienvenu 2003¹⁶).

b. Déficits cellulaires et fonctionnels

De façon générale, les protéines de la famille ABC, dont fait partie CFTR, sont impliquées dans le transport vectoriel de substrats spécifiques tels que des sucres, ions, vitamines et lipides (Riordan 1993¹⁸⁵). Ces transporteurs présentent tous une organisation commune en deux parties symétriques ; chacune de ces 2 parties comporte (i) un domaine transmembranaire (*TMD : Trans-Membrane Domain* encore appelé *membrane spanning domain*) assurant l'ancrage de la protéine dans la membrane plasmique et (ii) un domaine cytoplasmique nommé NBD (*Nucleotide Binding Domain*) constituant un site de fixation et d'hydrolyse de l'ATP utilisé pour fournir l'énergie nécessaire au transport du soluté (Higgins 1995⁷³). En plus de ces 2 segments transmembranaires (TMD-1 et TMD-2) et de ces 2 domaines de fixation des nucléotides (NBD-1 et NBD-2) communs à tous les transporteurs ABC, la protéine CFTR possède un large domaine accessoire (domaine R) assurant la régulation de l'activité du canal [figure 2] (Anderson *et al.* 1991⁷).

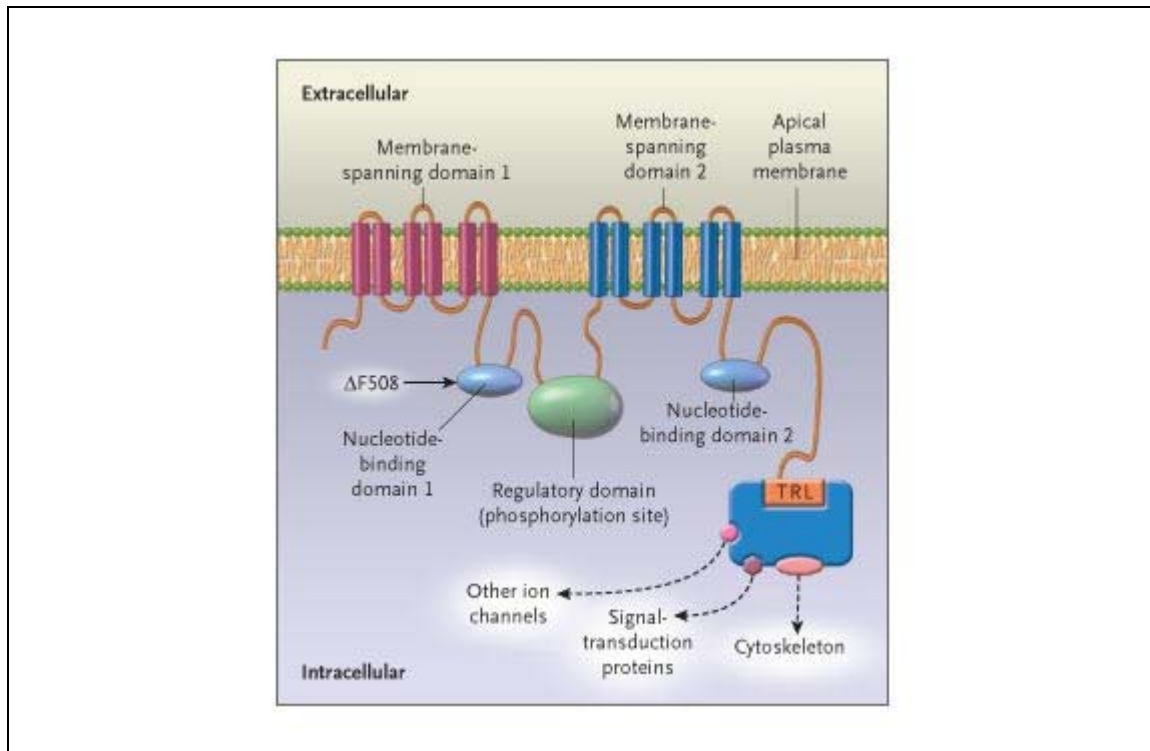


Figure 2. Structure hypothétique du canal CFTR (Rowe *et al.* 2005¹⁹²)

Ce canal présente 2 parties symétriques, reliées par un domaine régulateur, comportant chacune un domaine transmembranaire (*membrane spanning domain*) et un domaine de fixation et d'hydrolyse de l'ATP. L'extrémité C-terminale de la protéine CFTR présente un domaine TRL (thréonine, arginine, leucine) impliqué dans diverses fonctions telles que la conductance du canal, la régulation d'autres canaux, la transduction du signal, ou encore, l'adressage de la protéine en position apicale.

Sur le plan fonctionnel, la protéine CFTR est un canal ionique de faible conductance, activable par l'AMPc et permettant le passage des ions chlorures (Anderson *et al.* 1991⁷ ; Tabcharani *et al.* 1991²¹⁶). Les cellules épithéliales des différentes glandes exocrines de l'organisme peuvent ainsi contrôler le transport transmembranaire de sels et d'eau. Ce type de sécrétion est indispensable à de nombreuses fonctions cellulaires comme par exemple : le maintien d'un pH favorable pour l'action des enzymes digestives, le maintien d'un environnement salin pulmonaire, la maturation des spermatozoïdes, ou encore la formation des sécrétions sudoripares. Dans le cas de la mucoviscidose, le transport d'électrolytes est perturbé par le dysfonctionnement du canal CFTR et s'accompagne à des degrés divers de troubles obstructifs pulmonaires, d'insuffisance pancréatique, d'infertilité masculine et d'une sécrétion sudoripare anormalement concentrée en sels (Becq 2003¹⁴).

c. Présentations cliniques

Du point de vue clinique, la mucoviscidose est donc une exocrinopathie généralisée associée à des anomalies de sécrétion d'eau et d'électrolytes au niveau des cellules épithéliales des tissus exocrines. Elle débute précocement dans l'enfance et affecte principalement les voies aériennes pulmonaires et les canaux d'organes variés tels que ceux du pancréas exocrine, de l'intestin, du foie, des tubes séminifères et des glandes sudoripares (Rowe *et al.* 2005¹⁹¹).

Les manifestations digestives sont très polymorphes mais compromettent les trois fonctions majeures : la digestion, la motricité et l'absorption. Ainsi, l'obstruction des canaux pancréatiques aboutit à un déficit sécrétoire pancréatique exocrine entraînant une maldigestion et une fibrose progressive du pancréas. Par ailleurs, le tube digestif étant tapissé d'un mucus trop visqueux, le ralentissement du transit contribue à une malabsorption intestinale des nutriments. L'atteinte digestive provoque ainsi dans la plupart des cas des carences en vitamines liposolubles et oligoéléments (Munck *et al.* 2005¹⁶⁰).

Les atteintes pulmonaires dominant, quant à elles, le tableau clinique de la mucoviscidose et conditionnent le pronostic vital ; elles sont responsables de plus de 90% des décès des patients (Ramsey 1996¹⁸²). Le dysfonctionnement du canal CFTR des cellules épithéliales bronchiques entraîne une diminution de l'excrétion des ions Cl⁻ et une absorption excessive d'ions Na⁺ **[figure 3]**. Le déséquilibre ionique qui en résulte provoque une réabsorption passive de l'eau à travers la lumière endobronchique augmentant alors la viscosité du mucus qui recouvre l'épithélium pulmonaire (Becq 2003¹⁴). La production de ce mucus visqueux compromet l'efficacité de l'escalator mucociliaire **[figure 4]**, obstrue progressivement la lumière endobronchique et favorise la colonisation bronchique par diverses espèces bactériennes dont la plus significative est *Pseudomonas aeruginosa* (Ramsey 1996¹⁸² ; Becq 2003¹⁴). L'inflammation chronique qui en résulte, dès les premières années de la vie, contribue à détériorer progressivement l'épithélium bronchique, altérant ainsi la fonction respiratoire jusqu'à une issue fatale (Ramsey 1996¹⁸²).

d. Progrès récents dans la prise en charge thérapeutique

L'Association Française pour le Dépistage et la Prévention des Handicaps de l'Enfant (AFDPHE) a proposé fin 1999 la mise en place d'un dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose. Ce projet, généralisé à l'ensemble du territoire français fin 2002, devrait permettre le repérage de 98% des cas de mucoviscidose avant l'âge de 1 mois (Grosskopf *et al.* 2003⁶⁰). Malgré un diagnostic précoce, cette maladie requiert des traitements longs, contraignants et à visée symptomatique. Ils reposent essentiellement sur la prise en charge respiratoire (kinésithérapie, antibiothérapie, oxygénothérapie et greffe pulmonaire), digestive et nutritionnelle (apports d'extraits pancréatiques et régime alimentaire hypercalorique). La création en 2001 des Centres de Ressources et de Compétence de la Mucoviscidose (CRCM) constitués chacun d'une équipe pluridisciplinaire spécialiste de la maladie (médecin pédiatre ou pneumologue, biologiste, infirmière coordinatrice, kinésithérapeute, diététicien, psychologue, assistante sociale) a considérablement amélioré la prise en charge de la maladie. Implantés dans chaque région française, les CRCM répondent aux besoins des malades et de leur famille en assurant un suivi régulier et une coordination de l'ensemble des soins, notamment à domicile (Rault *et al.* 2001¹⁸⁴).

2. Colonisation et infection par *Pseudomonas aeruginosa*

La surinfection broncho-pulmonaire pratiquement constante au cours de la mucoviscidose est caractérisée par une colonisation successive ou concomitante par *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. D'autres germes [figure 5] peuvent également être retrouvés mais avec une fréquence variable : *Haemophilus influenzae*, *Burkholderia sp*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Alcaligenes sp*. (Mariani-Kurkdjian and Bingen 2003¹³²). Toutefois, l'infection chronique par le bacille pyocyane constitue le problème infectieux principal et marque le plus souvent un tournant évolutif délétère dans la maladie (Mariani-Kurkdjian and Bingen 2003¹³²). La primo-infection intervient en moyenne entre l'âge de 8 et 10 ans ; la contamination par *P. aeruginosa* s'effectue à partir de l'environnement naturel ou domestique car cette bactérie ubiquitaire vit à l'état saprophyte dans les zones humides telles que les éviers, siphons, robinetteries, égouts, lacs et sur les végétaux. Les appareils de nébulisation constituent également un réservoir bactérien potentiel. La contamination peut parfois avoir lieu lors

d'un séjour à l'hôpital par transmission entre patients. D'ailleurs, les patients atteints de mucoviscidose appartenant à une même fratrie sont souvent porteurs d'un clone bactérien identique (McCallum *et al.* 2001¹⁴² ; Mariani-Kurkdjian and Bingen 2003¹³²). Après contamination, la bactérie s'implante au niveau pulmonaire et peut y persister malgré une sensibilité initiale aux antibiotiques. Le rôle de *P. aeruginosa* dans la pathologie pulmonaire suscite encore de nombreuses interrogations. En effet, il n'existe pas de corrélation univoque entre l'évolution clinique et les résultats des prélèvements bactériologiques ; certains patients colonisés demeurant longtemps asymptomatiques alors que d'autres présentent rapidement une détérioration progressive de leur fonction respiratoire (Mariani-Kurkdjian and Bingen 2003¹³²).

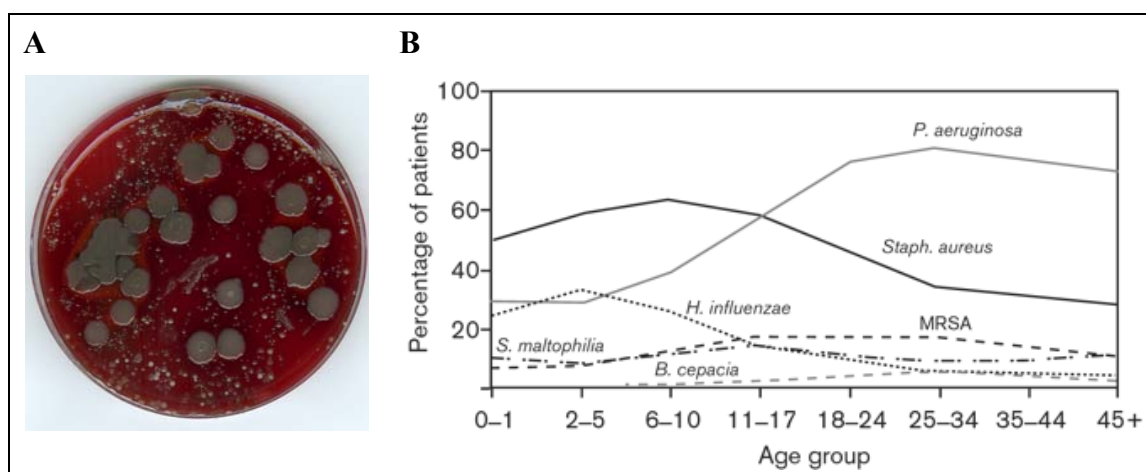


Figure 5. Flore bactérienne colonisant les poumons de patients atteints de mucoviscidose.

(A) Diversité de la flore bactérienne obtenue après ensemencement sur gélose au sang.

(B) Pourcentage des bactéries cliniquement importantes selon la tranche d'âge chez les patients atteints de mucoviscidose en France (Bilan de Données 2004 de l'Observatoire National de la Mucoviscidose ; http://www.vaincrelamuco.org/ewb_pages/o/observatoire-mucoviscidose.php).

3. Conséquences cliniques et thérapeutiques

a. Infection et inflammation

Chez les patients atteints de mucoviscidose, les mécanismes locaux de défense immunitaire sont incapables de maintenir la stérilité des voies aériennes. En s'implantant de façon durable dans l'arbre trachéobronchique des patients, *P. aeruginosa* entretient et exacerbe une réaction inflammatoire locale, caractérisée par un afflux massif de polynucléaires neutrophiles. Ces derniers s'accumulent dans les voies respiratoires et libèrent, en excès, leurs enzymes lysosomiales ainsi que différents

dérivés actifs de l'oxygène (radical hydroxyle, peroxyde d'hydrogène). Cette réaction inflammatoire qui s'accompagne d'une action protéolytique importante sur les composés macromoléculaires de la matrice extracellulaire, détériore progressivement l'épithélium bronchique et entraîne une insuffisance respiratoire (Ratjen and Doring 2003¹⁸³).

b. Traitements antibiotiques usuels

L'amélioration de la fonction respiratoire repose essentiellement sur l'association d'une kinésithérapie à un traitement anti-infectieux. La kinésithérapie régulière vise à faciliter l'évacuation des sécrétions bronchiques par l'accélération du flux respiratoire (Conférence de Consensus 2002³¹). Ces sécrétions se caractérisent par une hyperviscosité et une perte d'élasticité dues à la déshydratation du mucus et à la forte concentration en ADN libéré par les polynucléaires neutrophiles altérés sous l'effet des infections bactériennes (Becq 2003¹⁴). L'emploi régulier d'aérosols de désoxyribonucléase humaine recombinante (rhDNase), permettant la digestion de l'ADN extracellulaire, diminue la viscosité des sécrétions et facilite ainsi le drainage bronchique (Shak *et al.* 1990²⁰³). L'antibiothérapie constitue, quant à elle, le second volet de la prise en charge. Elle vise à éradiquer ou à diminuer l'inoculum bactérien. Le choix des antibiotiques ainsi que les posologies sont guidées par les résultats de l'examen cyto bactériologique des crachats (ECBC) et varient entre une primo-infection et une infection chronique. Les traitements antibiotiques habituellement prescrits comportent essentiellement des β -lactamines antipyracyanique (ticarcilline, pipéracilline, ceftazidime, imipénème, méropénème) et des aminosides (tobramycine, amikacine) par voie IV. La tobramycine et la colistine (polymyxine E) sont, quant à elles, administrées par voie inhalée (Conférence de Consensus 2002³¹).

Prise en charge thérapeutique de la primo-colonisation

Le traitement intensif des primo-colonisations permet d'obtenir assez régulièrement une éradication, au moins transitoire, du germe et peut prévenir ou retarder le passage à l'infection chronique, stade à partir duquel l'éradication de *P. aeruginosa* devient quasi impossible. Toutefois, aucun consensus international ne se dégage pour le traitement de la primo-colonisation. La plupart des équipes françaises utilise, en association, deux antibiotiques bactéricides (β -lactamine et aminoside) par voie IV pendant 14 à 21 jours,

suivis ou non d'aérosols de colistine pendant 3 à 6 mois. Les β -lactamines sont prescrites en 3 à 4 injections quotidiennes ou en perfusion continue. Le choix de la ceftazidime en perfusion continue se justifie par ses résultats cliniques satisfaisants et sa bonne tolérance veineuse. L'aminoside le plus utilisé est la tobramycine en dose unique journalière pour limiter sa toxicité rénale et auditive. L'efficacité du traitement prescrit est contrôlée par la réalisation d'un ECBC. En cas de culture positive, une nouvelle cure IV est débutée (Conférence de Consensus 2002³¹).

Prise en charge thérapeutique de la colonisation chronique

L'existence de 3 ECBC successifs à 1 mois d'intervalle permettant l'isolement de *P. aeruginosa* ($\geq 10^2$ UFC/mL) et/ou la présence d'au moins 2 arcs de précipitines anti-pyocyanique après immunoélectrophorèse en présence d'anticorps spécifiques définissent le stade de colonisation chronique (Hoiby 1977⁸¹). Le passage à la chronicité traduit l'adaptation de *P. aeruginosa* au milieu pulmonaire par diverses modifications phénotypiques. Par exemple, la sécrétion importante d'alginate (exopolysaccharide visqueux) qui confère un aspect mucoïde aux colonies bactériennes (Govan and Deretic 1996⁵⁸) [figure 6] diminue notablement, *in vivo*, l'efficacité bactéricide des antibiotiques, en particulier des aminosides (Mariani-Kurkdjian and Bingen 2003¹³²).

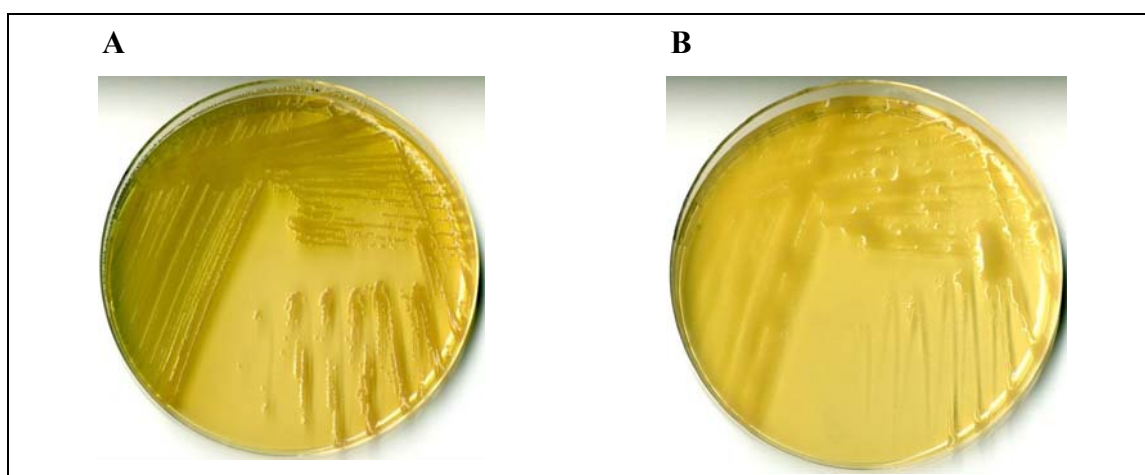


Figure 6. Colonies de *P. aeruginosa* sauvage (A) et mucoïde (B).

En fait, la présence au sein d'un même ECBC de plusieurs morphotypes avec des phénotypes de résistance différents, ainsi que la discordance entre l'efficacité de l'antibiotique évaluée *in vitro* et l'efficacité *in vivo* posent problème dans le choix de l'antibiothérapie (Mariani-Kurkdjian and Bingen 2003¹³²).

A ce stade de l'infection, le traitement a donc pour but de diminuer l'inoculum bactérien, d'espacer les exacerbations et de ralentir la dégradation fonctionnelle respiratoire. Les antibiotiques, choisis en fonction du dernier antibiogramme, sont utilisés seuls ou en association, par voie orale, IV ou inhalée, à des doses élevées, éventuellement hors AMM selon le stade et la gravité de l'infection (Conférence de Consensus 2002³¹). Afin de retarder le risque d'émergence de souches de *P. aeruginosa* résistantes, une bi-thérapie associant une β -lactamine à un aminoside est le plus souvent prescrite (Mariani-Kurkdjian and Bingen 2003¹³²). Ainsi, l'utilisation conjointe d'une β -lactamine (ceftazidime) et de la tobramycine est préconisée pendant au moins 14 jours. En cas de souches multirésistantes, une trithérapie est proposée en rajoutant de la ciprofloxacine (30 mg/kg/j) *per os* (Conférence de Consensus 2002³¹). Par ailleurs, il a été démontré que l'administration d'azithromycine permettait d'espacer les phases d'exacerbation, d'atténuer la réaction inflammatoire, et ainsi d'améliorer la fonction respiratoire (Foweraker *et al.* 2005⁴⁹).

4. Emergence de la résistance aux antibiotiques chez les isolats CF

a. Fréquence de la résistance observable *in vitro*

Chez les patients colonisés de façon chronique, l'antibiothérapie parvient à améliorer transitoirement la fonction respiratoire. Cette faible efficacité des antibiotiques est le résultat de mécanismes de résistance complexes réduisant la sensibilité naturelle de *P. aeruginosa* (Saiman 2007¹⁹²). Selon les études, les pourcentages des isolats sensibles aux différents anti-pyocyanique varient assez fortement [tableau 2]. Ainsi, les études menées en Amérique du Nord révèlent régulièrement des isolats de sensibilité réduite à la ticarcilline, la pipéracilline, l'aztréonam, la ceftazidime, la ciprofloxacine, la gentamicine et à l'amikacine (Burns *et al.* 2000²¹ ; Saiman 2007¹⁹²). En effet, parmi 110 souches isolées aux Etats-Unis et au Canada moins de 40 % d'entre elles présentaient une sensibilité aux 10 antibiotiques testés (Saiman 2007¹⁹²). A l'inverse, les travaux menés en France, par le Groupe d'Etude de la Résistance de *P. aeruginosa* (GERPA) mettent en évidence des profils de sensibilité relativement stables entre 1998 et 2007, à l'exception de l'aztréonam et de l'amikacine, pour lesquels on observe une diminution de la sensibilité. Par ailleurs, ces travaux révèlent que 80 % des souches isolées en 2007

sont sensibles au céfépime contre seulement 46 % en 1998 (Cavallo *et al.* 2000²⁶ ; Mérens *et al.* 2009¹⁴⁶). En revanche, quelles que soient les études répertoriées dans le **tableau 2**, l'ensemble des isolats présente une sensibilité réduite à l'amikacine et à la gentamicine mais pas à la tobramycine, antibiotique pourtant largement utilisé dans la mucoviscidose.

b. Détermination des profils de sensibilité et critères d'interprétation

L'absence de consensus pour la détermination des profils de sensibilité peut expliquer l'hétérogénéité des résultats observés entre les études. Bien que divers travaux aient pu établir une bonne corrélation entre différentes techniques telles que la dilution en milieu gélosé, la microdilution en milieu liquide ou encore l'utilisation de E-Test[®] (Saiman *et al.* 1999¹⁹³ ; Burns *et al.* 2000²¹), des variations existent en fonction des morphotypes sélectionnés (Foweraker *et al.* 2005⁴⁹). Par ailleurs, l'application de valeurs critiques différentes (*CLSI*, *BSAC*, *CA-SFM*) pour l'interprétation des CMI rend difficile les comparaisons [**tableau 1**]. Les valeurs critiques énoncées par le *CLSI*, le *BSAC* ou le *CA-SFM* varient peu pour la ceftazidime, le céfépime, l'imipénème, la ciprofloxacine ou encore les aminosides. En revanche, pour d'autres antibiotiques tels que la ticarcilline, la pipéracilline et l'aztréonam, des souches classées intermédiaires selon les critères du *CA-SFM* pourront être considérées comme sensibles par le *CLSI* [**tableau 2**].

Tableau 1. Concentrations critiques de différents antibiotiques anti-pyocyanique.

	Concentrations critiques (mg/L)								
	<i>CLSI</i> ^a			<i>CA-SFM</i> ^b			<i>BSAC</i> ^c		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Ticarcilline	≤ 64	-	≥ 128	≤ 16	32, 64	> 64	≤ 16	32, 64	≥ 128
Pipéracilline	≤ 64	-	≥ 128	≤ 16	32, 64	> 64	≤ 16	-	≥ 32
Ceftazidime	≤ 8	16	≥ 32	≤ 8	-	> 8	≤ 8	-	≥ 16
Céfépime	≤ 8	16	≥ 32	≤ 8	-	> 8			
Imipénème	≤ 4	8	≥ 16	≤ 4	8	> 8	≤ 4	8	≥ 16
Méropénème	≤ 4	8	≥ 16	≤ 2	4, 8	> 8	≤ 2	4, 8	≥ 16
Aztréonam	≤ 8	16	≥ 32	≤ 1	2 - 16	> 16	≤ 8	-	≥ 16
Ciprofloxacine	≤ 1	2	≥ 4	≤ 1	2	> 2	≤ 1	2, 4	≥ 8
Gentamicine	≤ 4	-	≥ 8	≤ 4	-	> 4	≤ 1	2, 4	≥ 8
Tobramycine	≤ 4	-	≥ 8	≤ 4	-	> 4	≤ 1	2, 4	≥ 8
Amikacine	≤ 16	-	≥ 32	≤ 8	16	> 16	≤ 8	16	≥ 32

^a Clinical and Laboratory Standards Institute ; ^b Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie ; ^c British Society of Antimicrobial Chemotherapy
S, sensible ; I, intermédiaire ; R, résistant

Tableau 2. Pourcentages de souches CF de *P. aeruginosa* sensibles à différents anti-pyocyanique.

Origine	Année	Critères*	% d'isolats sensibles										Références	
			Tic	Pip	Caz	Fep	Atm	Ipm	Mem	Cip	Gn	Tm		Amk
Etats-Unis (n=498)	-	CLSI	47	52	42	-	41	51	61	41	29	64	39	(Burns <i>et al.</i> 2000 ²¹)
France (n=70)	1998	CA-SFM	59	67	67	43	56	70	-	61	-	-	33	(Cavallo <i>et al.</i> 2000 ²⁶)
France (n=37)	1999	CA-SFM	62	73	73	46	67	59	-	59	-	89	27	(Cavallo <i>et al.</i> 2001 ²⁷)
Angleterre (n=417)	2000	BSAC	-	68	60	-	-	-	-	44	13	55	-	(Pitt <i>et al.</i> 2003 ¹⁷³)
Etats-Unis, Canada (n=110)	-	CLSI	-	22	27	16	21	24	39	27	12	34	23	(Saiman 2007 ¹⁹²)
Allemagne (n=172)	2006	CLSI	-	57	59	-	68	63	70	61	24	55	41	(Valenza <i>et al.</i> 2008 ²²⁵)
France (n=207)	2007	CA-SFM	67	74	80	80	42	79	-	73	-	81	58	(Mérens <i>et al.</i> 2009 ¹⁴⁶)

Tic, Ticarcilline ; Pip, Pipéracilline ; Caz, Céfazidime ; Fep, Céfépime ; Am, Aztréonam ; Imp, Imipénème ; Mem, Méropénème ; Cip, Ciprofloxacine ; Gn, Gentamicine ; Tm, Tobramycine ; Amk, Amikacine.
 Les pourcentages de sensibilité inférieurs à 50% figurent en gras dans le tableau.

*, non renseigné.
 * CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute (grisé) ; CA-SFM, Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie ; BSAC, British Society of Antimicrobial Chemotherapy (italique).
 (CLSI 2006³⁰ ; BSAC 2008²⁰ ; CA-SFM 2008²²)

c. Emergence de la résistance chez le patient

La progression de la résistance aux aminosides, ainsi qu'aux autres molécules anti-pyocyanique, pose actuellement problème en thérapeutique. Malgré une prise en charge précoce de l'infection à *P. aeruginosa* par une antibiothérapie adaptée et l'utilisation de doses massives d'antibiotiques, l'éradication du bacille pyocyanique reste difficile. Une des raisons de cette mauvaise efficacité thérapeutique tient aux nombreux mécanismes de résistance, stables ou instables, développés par la bactérie chez le patient (Saiman 2007¹⁹²). Les mécanismes de résistance stable, à déterminisme génétique, sont transmissibles à la descendance et leur expression peut être induite par l'exposition aux antibiotiques. La surproduction de systèmes d'efflux actif ou d'enzymes inactivatrices, conférant une résistance aussi bien aux β -lactamines qu'aux aminosides, constituent les principaux mécanismes stables (Bagge *et al.* 2002⁹ ; Islam *et al.* 2004⁸⁹ ; Vogne *et al.* 2004²²⁷ ; Henrichfreise *et al.* 2007⁷² ; Islam *et al.* 2009⁹⁰). Les mécanismes instables, dits phénotypiques, ne dépendent pas de l'acquisition de matériel génétique exogène ou de la survenue de mutations mais davantage de l'influence de l'environnement dans lequel la bactérie se développe. La résistance qui en résulte, non transmissible à la descendance, permet à la bactérie de s'adapter temporairement à cet environnement (Barclay *et al.* 1996¹³).

II. La résistance stable génotypique

1. Résistance aux β -lactamines

Les antibiotiques de la classe des β -lactamines constituent une vaste famille de molécules qui regroupe les pénames, les pénèmes, les céphèmes et les monobactames. Ces antibiotiques, caractérisés par la présence d'un noyau β -lactame [figure 7], sont actuellement les plus utilisés en thérapeutique en raison de leur large spectre d'activité et de leur action bactéricide rapide sur les bactéries sensibles. Ils ont pour cibles les PLP (Protéines Liant la Pénicilline), enzymes nécessaires à la synthèse d'un élément essentiel de la paroi bactérienne : le peptidoglycane. Chez les patients atteints de mucoviscidose, les β -lactamines les plus administrées dans le traitement des infections à bacille pyocyanique sont la ceftazidime, la pipéracilline, la ticarcilline et le céfépime. Cependant, depuis les premières utilisations de ces molécules, différents mécanismes de résistance sont apparus, conduisant parfois à des impasses thérapeutiques. En effet, *P. aeruginosa* est aujourd'hui capable de neutraliser l'action de ces antibiotiques en (i) diminuant la perméabilité de sa membrane externe, (ii) surproduisant différents systèmes d'efflux actif, (iii) modifiant ses PLP ou encore (iv) produisant des enzymes inactivatrices. Chez les isolats CF, c'est toutefois la résistance enzymatique contre cette famille d'antibiotiques qui apparaît prédominante (Kong *et al.* 2005¹⁰⁷).

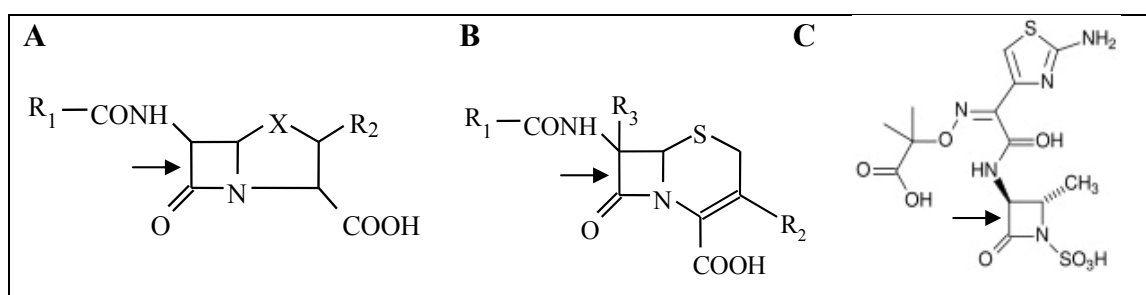


Figure 7. Structure générale des β -lactamines.

(A) Pénames, X=S ; Pénèmes, X=C ;

(B) Céphèmes, R3 = H ;

(C) Aztréonam (Monobactame),

Le cycle β -lactame est indiqué par la flèche

a. Les β -lactamases

Surproduction de la céphalosporinase AmpC

La presque totalité des souches de *P. aeruginosa* synthétise une céphalosporinase de classe I nommée AmpC, codée par un gène chromosomique dont l'expression est inductible (cf III.1 « Résistance instable phénotypique »). La production de cette enzyme contribue fortement à la résistance naturelle de la bactérie à l'ampicilline, à l'amoxicilline, aux céphalosporines de première et de deuxième génération (C1G, C2G), ainsi qu'au céfotaxime et à la ceftriaxone (Livermore 1995¹²²). Certaines souches de *P. aeruginosa* peuvent toutefois surproduire cette enzyme de façon stable, entraînant alors une augmentation du niveau de résistance à la plupart des β -lactamines anti-pyocyanique [figure 8]. La fréquence rapportée de ce phénomène varie fortement d'un pays à un autre et selon la pathologie sous-jacente. Ainsi, le taux d'isolats surproducteurs d'AmpC est plus élevé chez les souches isolées dans des situations où la pression de sélection antibiotique est forte comme par exemple chez les patients de réanimation ou ceux atteints de mucoviscidose (Livermore 1995¹²² ; Bert and Lambert-Zechovsky 1996¹⁵).

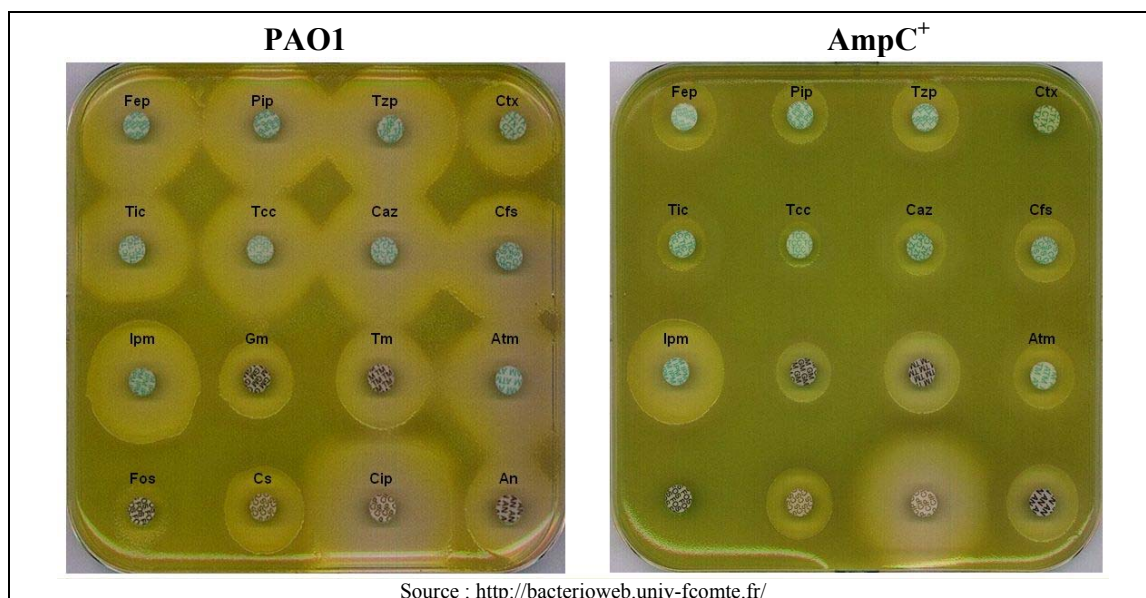


Figure 8. Antibiogrammes de la souche PAO1 et d'une souche surproduisant la céphalosporinase AmpC.

Comparativement à la souche sauvage de référence PAO1, un mutant surproduisant la céphalosporinase AmpC (AmpC⁺) présente une réduction des diamètres d'inhibition autour de toutes les β -lactamines : Fep, Céfépime ; Pip, Pipéracilline ; Tzp, Pipéracilline/Tazobactam ; Ctx, Céfotaxime, Tic, Ticarcilline, Tcc, Ticarcilline/Acide Clavulanique ; Caz, Ceftazidime ; Cfs, Cefsulodin ; Atm, Aztréonam.

Ipm, Imipénème ; Gm, Gentamicine ; Tm, Tobramycine ; Fos, Fosfomycine ; Cs, Colistine ; Cip, Ciprofloxacine ; An, Amikacine.

et al. 1986⁸³). En revanche, en présence d'antibiotique inducteur, la dégradation du peptidoglycane libère dans l'espace périplasmique des molécules de 1,6-anhydromuropeptides. Ces derniers, une fois transportés dans le cytoplasme grâce à la perméase AmpG, jouent le rôle de molécules inductrices transformant le répresseur en activateur transcriptionnel. Les molécules inductrices peuvent toutefois être dégradées par une N-acétyl-anhydromuramyl-L-alanine amidase codée par le gène *ampD* (Langae *et al.* 2000¹¹⁰). Cette enzyme permet donc, d'une part, de prévenir l'induction du gène *ampC* et, d'autre part, de recycler les éléments provenant de la dégradation du peptidoglycane (Holtje *et al.* 1994⁸² ; Normark 1995¹⁶⁷). Enfin le gène *ampE* code une protéine localisée dans la membrane cytoplasmique agissant comme un capteur spécifique des molécules requises pour l'induction (Honore *et al.* 1989⁸⁴).

Bien que les mécanismes de régulation de l'expression du gène *ampC* ne soient pas totalement identifiés chez *P. aeruginosa*, différents évènements génétiques peuvent être à l'origine de la surproduction constitutive de la céphalosporinase AmpC **[tableau 3]**. Ainsi, des travaux réalisés par Bagge *et al.* ont mis en évidence que la substitution Asp₁₃₅→Asn, préalablement identifiée chez *E. cloacae* dans la protéine AmpR, entraîne la surproduction constitutive de AmpC chez un isolat CF de *P. aeruginosa* (Bagge *et al.* 2002⁹). Ces travaux révèlent également que l'insertion de l'IS1669 dans le gène *ampD*, en inactivant la protéine AmpD, entraîne une accumulation de molécules inductrices et la surproduction constitutive de AmpC chez 2 autres isolats CF (Bagge *et al.* 2002⁹). Par ailleurs, deux homologues du gène *ampD* ont récemment été décrits chez *P. aeruginosa*. Il s'agit des gènes *ampDh2* et *ampDh3*, localisés dans des régions différentes du chromosome bactérien et qui participent à la régulation de l'expression du gène *ampC*. L'inactivation progressive de ces gènes chez un mutant *ampD*⁻ de PAO1, provoque l'expression accrue du gène *ampC* et l'augmentation par paliers de la résistance **[tableau 4]**. La délétion des trois gènes *ampD* permet d'obtenir chez la souche PAO1 la dépression totale de *ampC* associée à une résistance de haut niveau (Juan *et al.* 2006¹⁰⁰). A ce jour, le séquençage de ces gènes régulateurs chez des isolats cliniques a uniquement mis en évidence des associations de mutations dans les gènes *ampD* et *ampDh2* ou dans *ampD* et *ampDh3* **[tableau 3]** (Moya *et al.* 2008¹⁵⁹ ; Schmidtke and Hanson 2008¹⁹⁷).

Tableau 3. Altérations dans les protéines régulant l'expression du gène *ampC*.

Protéines altérées			
AmpR	AmpD	AmpDh2	AmpDh3
Substitutions d'acides aminés			
Asp ₁₃₅ →Asn ^a	Val ₁₀ →Ile ^b	Val ₄₀ →Ile ^c	Ile ₆₇ →Thr ^b
	Leu ₃₂ →Pro ^b		Asp ₁₃₇ →Gly ^b
	Gly ₄₆ →Ser ^b		Ala ₂₀₈ →Val ^b
	Gly ₁₄₈ →Ala ^b		Ala ₂₁₉ →Thr ^b
	Asp ₁₈₃ →Tyr ^b		
Décalage du cadre de lecture			
	Insertions ^{a,d}		
	Délétions ^{b,d}		

Asp, aspartate ; *Asn*, asparagine ; *Val*, valine ; *Ile*, isoleucine ; *Leu*, leucine ; *Pro*, praline ; *Gly*, glycine ; *Ser*, serine ; *Ala*, alanine ; *Tyr*, tyrosine ; *Thr*, thréonine.

^a (Bagge *et al.* 2002⁹), ^b (Schmidtke and Hanson 2008¹⁹⁷), ^c (Moya *et al.* 2008¹⁵⁹), ^d (Juan *et al.* 2005⁹⁹)

Tableau 4. Concentrations minimales inhibitrices de sept β-lactamines chez différents mutants délétés (Juan *et al.* 2006¹⁰⁰).

	CMI (mg/L)						
	Caz	Fep	Tic	Pip	Atm	Imp	Mem
PAO1	1	1	12	2	1	1,5	0,38
PAO1Δ <i>ampD</i>	8	4	32	64	6	2	1
PAO1Δ <i>ampDh2</i>	0,75	1	8	1,5	1	1	0,38
PAO1Δ <i>ampDh3</i>	1	1	12	3	1,5	1	0,38
PAO1Δ <i>ampDh2</i> + Δ <i>ampDh3</i>	0,75	1	6	2	0,5	1,5	0,38
PAO1Δ <i>ampD</i> + Δ <i>ampDh2</i> *	12	12	256	48	16	1	0,38
PAO1Δ <i>ampD</i> + Δ <i>ampDh3</i> *	48	32	>256	>256	16	1,5	2
PAO1Δ <i>ampD</i> + Δ <i>ampDh2</i> + Δ <i>ampDh3</i>	48	32	>256	>256	24	1,5	2

Caz, Ceftriaxime ; *Fep*, Céfépime ; *Tic*, Ticarcilline ; *Pip*, Pipéracilline ; *Atm*, Aztréonam ; *Imp*, Imipénème ; *Mem*, Méropénème.

* combinaisons de mutations retrouvées chez des isolats cliniques de *P. aeruginosa*.

Production d'autres β-lactamases

L'inactivation du gène *ampC* chez la souche PAO1 n'a que peu d'effet sur la sensibilité aux pénicillines, au méropénème et au céfotaxime ; Kong *et al.* ont émis l'hypothèse de l'existence d'une seconde β-lactamase chez *P. aeruginosa* également codée par un gène chromosomique (Kong *et al.* 2005¹⁰⁷). Les auteurs ont ainsi identifié une protéine présentant une forte homologie avec les β-lactamases de classe D (oxacillinas). Cette enzyme nommée PoxB ou encore Oxa-50 a aussi bien été détectée chez des souches environnementales que chez des isolats cliniques CF et non-CF ; elle confère à *P. aeruginosa* une résistance très modeste au méropénème et autres pénèmes (Girlich *et*

al. 2004⁵³ ; Kong *et al.* 2005¹⁰⁷). En plus de la résistance naturelle aux β -lactamines due à AmpC et PoxB/Oxa-50 peut s'ajouter une résistance dite « acquise ». Bien documentée chez les souches non CF, la production de β -lactamases supplémentaires codées par des éléments génétiques mobiles tels que des plasmides ou des intégrons reste toutefois très rare chez les isolats CF. A notre connaissance, seules deux études ont mis en évidence des souches CF possédant une β -lactamase de type VIM-2 et une de type PSE-3 portées respectivement par un intégron et un plasmide (Campbell *et al.* 1997²³ ; Cardoso *et al.* 2008²⁵).

b. L'efflux actif des β -lactamines

Un autre mécanisme développé par *P. aeruginosa* pour résister aux β -lactamines est la surproduction de systèmes d'efflux actif. Ces systèmes membranaires polyspécifiques sont capables de transporter activement, du milieu intracellulaire vers le milieu extérieur, des substrats très différents sur le plan de leur structure chimique. Les systèmes d'efflux actif s'opposent ainsi à l'accumulation des antibiotiques, limitant alors leur interaction avec des cibles le plus souvent intracellulaires. Ce phénomène engendre généralement une résistance croisée, de bas niveau, à plusieurs familles d'agents antibactériens (Poole 2004¹⁷⁴). Les systèmes d'efflux sont répartis en 5 familles en fonction de leurs similitudes de séquences en acides aminés et de l'énergie requise pour le transport. En effet, l'efflux de diverses molécules vers le milieu extracellulaire est un processus dynamique utilisant, soit l'hydrolyse de l'ATP, soit le gradient électrochimique membranaire par le biais d'un antiport. Ainsi, (i) les transporteurs de la famille ABC (*ATP Binding Cassette*) utilisent l'ATP comme source d'énergie, (ii) les transporteurs de la famille MATE (*Multidrug And Toxic compound Extrusion*) utilisent un antiport d'ions Na^+ , (iii) les transporteurs des familles MFS (*Major Facilitator Superfamily*), SMR (*Small Multidrug Resistance*) et RND (*Resistance Nodulation cell Division*) utilisent un antiport d'ions H^+ [figure 10]. Chez les bactéries à Gram négatif, les systèmes de la famille RND jouent un rôle particulier dans la résistance aux antibiotiques (Poole 2004¹⁷⁴ ; Poole 2005¹⁷⁵).

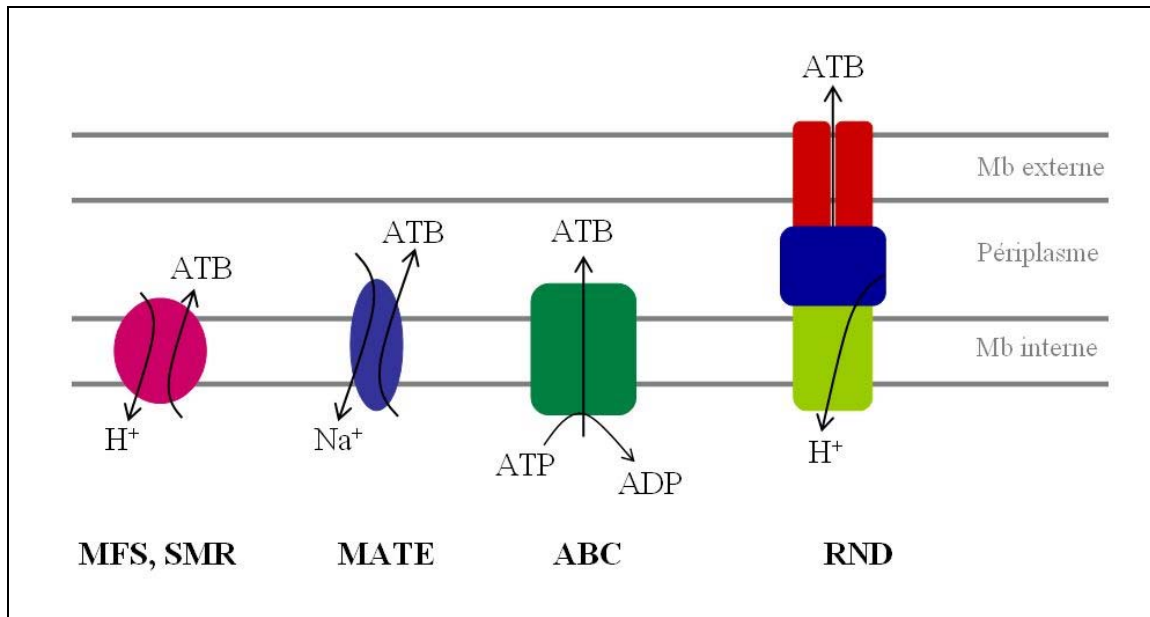


Figure 10. Représentation schématique des différentes familles de systèmes d'efflux actif chez les bactéries à Gram négatif.

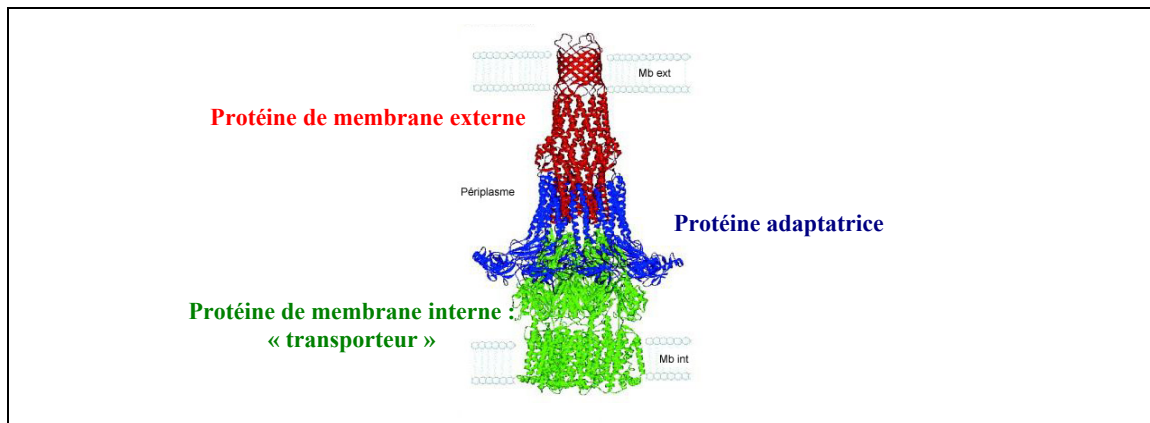


Figure 11. Organisation structurale d'un système d'efflux actif tripartite de la famille RND d'après le modèle de cristallisation de AcrAB-TolC de *E. coli* (Akama *et al.* 2004⁴).

Les systèmes d'efflux sont formés par l'assemblage de trois éléments :

- (i) une protéine insérée dans la membrane interne (Mb int) jouant le rôle de transporteur,
- (ii) une protéine en forme de canal traversant la membrane externe (Mb ext),
- (iii) une protéine adaptatrice reliant les deux précédentes.

Structure des systèmes d'efflux actif de la famille RND (Resistance Nodulation cell Division)

Dix systèmes d'efflux appartenant à la famille RND présentant une organisation structurale identique ont déjà été décrits chez *P. aeruginosa* (Li *et al.* 2003¹¹⁹ ; Schweizer 2003¹⁹⁹ ; Mima *et al.* 2005¹⁴⁹). Chaque système, caractérisé par sa spécificité de substrats [tableau 5], est formé de l'assemblage de trois éléments : (i) une protéine insérée dans la membrane cytoplasmique jouant le rôle de transporteur, (ii) une protéine en forme de canal traversant la membrane externe et (iii) une protéine adaptatrice reliant les deux précédentes [figure 11] (Zgurskaya and Nikaido 2000²⁴⁹).

Tableau 5. Principaux substrats des systèmes d'efflux actif de *P. aeruginosa*

Systèmes d'efflux	Principaux antibiotiques substrats	Références
MexAB-OprM	β -L, Tet, Tig, FQ, Chl, Ery, Tmp, Sul, Nov, Fus ...	(Li <i>et al.</i> 1994 ¹¹⁵ ; Li <i>et al.</i> 1995 ¹¹⁶ ; Masuda <i>et al.</i> 2000 ¹⁴⁰)
MexCD-OprJ	Tet, Tig, FQ, Ery, Chl, Fep, Caz, Cpm...	(Poole <i>et al.</i> 1996 ¹⁷⁶ ; Masuda <i>et al.</i> 2000 ¹³⁹)
MexEF-OprN	Tet, FQ, Chl, Ery, Tmp...	(Köhler <i>et al.</i> 1997 ¹⁰⁶)
MexJK/OprM	Tet, Ery	(Chuanchuen <i>et al.</i> 2002 ²⁹)
MexGHI-OmpD	Tet, FQ	(Aendekerk <i>et al.</i> 2002 ¹ ; Sekiya <i>et al.</i> 2003 ²⁰¹)
MexMN/OprM	Chl	(Mima <i>et al.</i> 2005 ¹⁴⁹)
MexPQ-OmpE	FQ, Ery	(Mima <i>et al.</i> 2005 ¹⁴⁹)
MexXY/OprM	Tet, FQ, AG, Fep, Ery, Tig	(Aires <i>et al.</i> 1999 ² ; Mine <i>et al.</i> 1999 ¹⁵⁰ ; Westbrook-Wadman <i>et al.</i> 1999 ²³³ ; Masuda <i>et al.</i> 2000 ¹³⁹ ; Dean <i>et al.</i> 2003 ³⁸)
MexVW/OprM	FQ, Ery, Tet, Chl	(Li <i>et al.</i> 2003 ¹¹⁹)

β -L, β -lactamines (sauf imipénème) ; Tet, Tétracycline ; Tig, Tigécyline ; FQ, Fluoroquinolones ; Chl, Chloramphénicol ; Ery, Erythromycine ; Tmp, Triméthoprim ; Sul, Sulfamides ; Nov, Novobiocine ; Fus, Acide fusidique ; Fep, Céfépime ; Caz, Ceftazidime ; Cpm, Cefpirome ; AG, Aminosides.

La protéine de membrane interne, appartenant à la superfamille des transporteurs RND, constitue l'élément actif du système prenant en charge les substrats. Comme toutes les protéines de la famille RND, l'élément « pompe » est constitué de (i) 12 segments transmembranaires d'hélices α (TMS 1 à TMS 12) et (ii) 2 larges boucles périplasmiques hydrophiles d'environ 300 acides aminés localisées entre les TMS 1 et 2 et les TMS 7 et 8 [figure 12] (Zgurskaya and Nikaido 2000²⁴⁹).

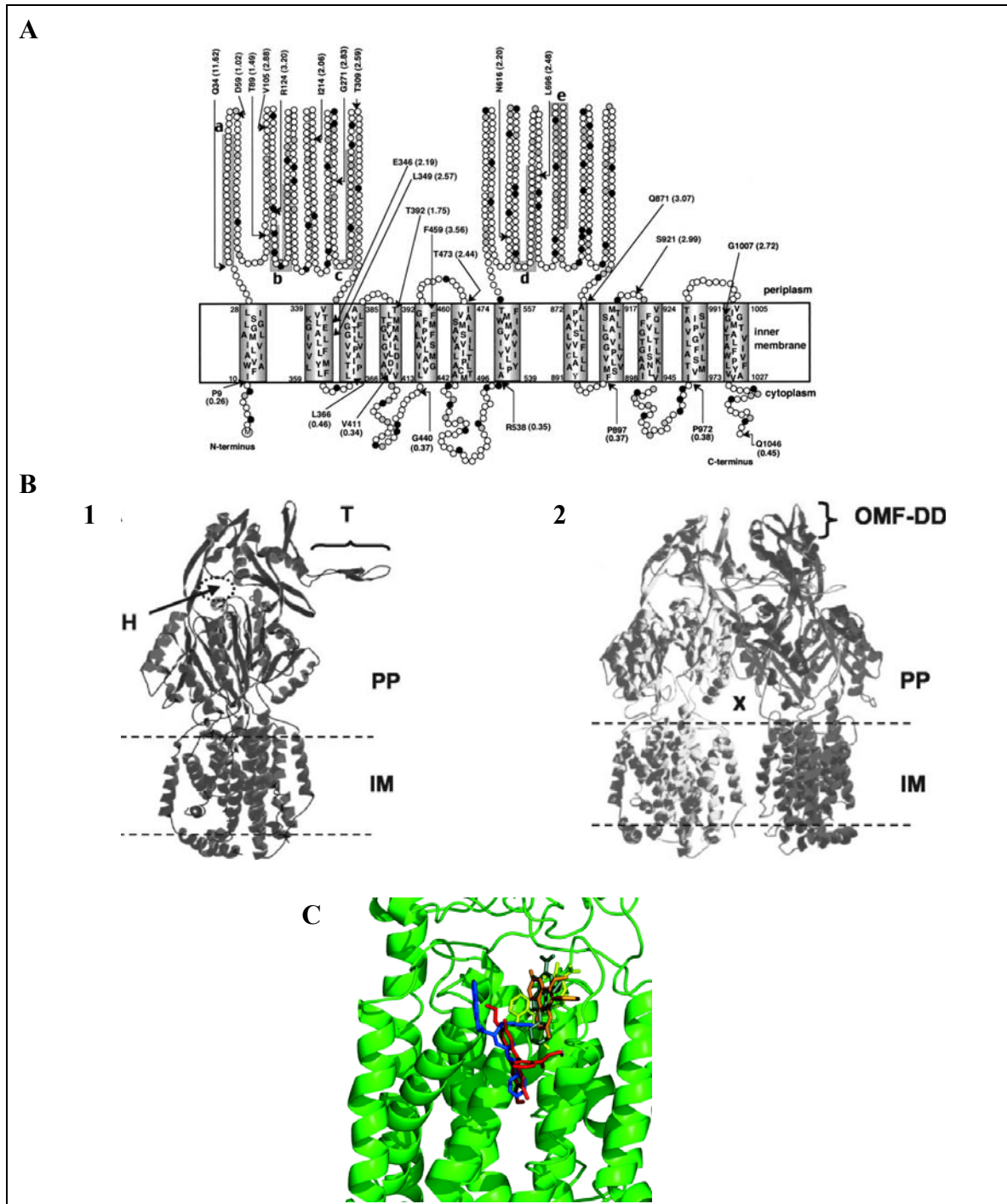


Figure 12. Représentations 2D et 3D de la protéine de membrane interne.

(A) Représentation 2D de MexB d'après Guan *et al.* La protéine est constituée de 12 segments transmembranaires enchassés dans la membrane cytoplasmique (*inner membrane*) et de 2 larges boucles périplasmiques hydrophiles (Guan *et al.* 1999⁶¹).

(B) Représentation d'un monomère de MexB (1) et d'un trimère (dont la monomère situé à l'arrière a été effacé) (2) d'après Middlemiss et Poole (Middlemiss and Poole 2004¹⁴⁷). Les régions notées T (*thumb*) et H (*hole*) sont impliquées dans la trimérisation du transporteur ; la région notée x correspond au vestibule formé par les boucles périplasmiques du trimère MexB. IM, Membrane interne ; PP, Périplasme ; OMF-DD, domaine putatif d'accrochage d'OprM.

(C) Co-cristallisation du transporteur AcrB de *E. coli* avec différents substrats dont la ciprofloxacine (Yu *et al.* 2005²⁴⁶).

Enchâssé dans la membrane cytoplasmique sous forme d'un trimère, cet élément couple l'import de protons à l'export de substrats **[figure 13]** (Paulsen *et al.* 1996¹⁷¹). La translocation des protons à travers la membrane est assurée par l'intermédiaire d'acides aminés chargés. Ainsi, des expériences de mutagenèse dirigée ont mis en évidence que les résidus Asp₄₀₇, Asp₄₀₈, Glu₄₁₄ localisés dans le TMS 4, le résidu Lys₉₄₀ localisé dans le TMS 10 et le le résidu Lys₉₇₈ localisé dans le TMS 11 sont nécessaires au fonctionnement des pompes MexB et MexF de *P. aeruginosa* (Guan and Nakae 2001⁶² ; Aires *et al.* 2002³) et AcrB de *E. coli* (Su *et al.* 2006²¹⁴ ; Takatsuka and Nikaido 2006²¹⁸). Les deux boucles périplasmiques participent, quant à elles, à la trimérisation du transporteur ; elles conditionnent la spécificité en substrats après association avec la protéine adaptatrice et la protéine de membrane externe (Mao *et al.* 2002¹³¹ ; Tikhonova *et al.* 2002²²² ; Middlemiss and Poole 2004¹⁴⁷). En effet, les boucles périplasmiques du trimère MexB délimitent un vestibule situé juste au dessus de la membrane interne, par lequel les substrats entrent dans la pompe à partir du cytoplasme ou de l'espace périplasmique (Middlemiss and Poole 2004¹⁴⁷).

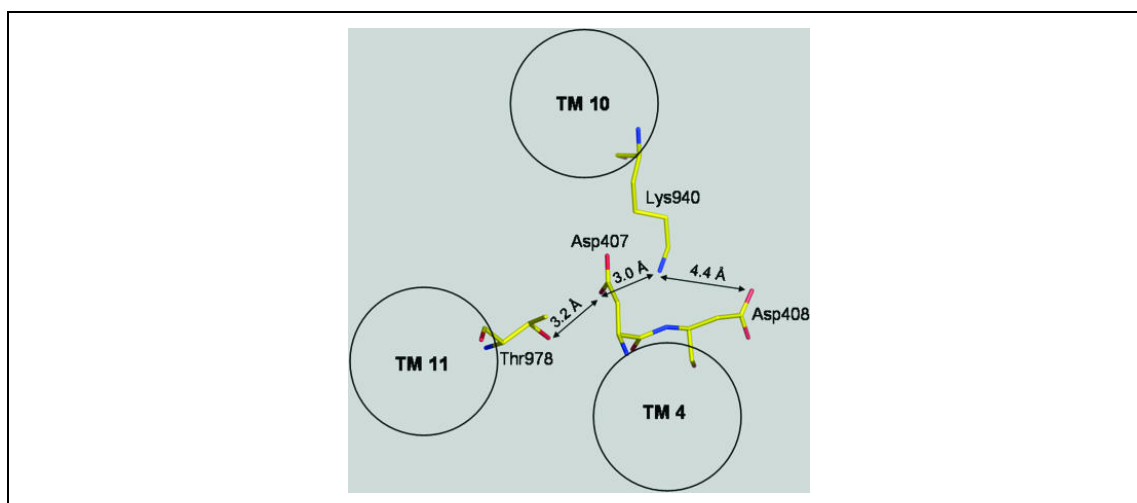


Figure 13. Représentation schématique du réseau putatif de translocation des protons à travers la protéine AcrB de *E. coli* (Su *et al.* 2006²¹⁴).

La translocation des protons à travers le transporteur s'effectue par interactions électrostatiques avec les résidus chargés Asp₄₀₇, Asp₄₀₈, Lys₉₄₀ et Thr₉₇₈ localisés dans les 4^{ème}, 10^{ème} et 11^{ème} segments transmembranaires.

Lys, lysine ; Asp, aspartate ; Thr, thréonine ; TM, *Transmembrane helix*

La protéine adaptatrice est chargée d'établir le lien entre l'élément « pompe » du système, situé dans la membrane interne et le pore de la membrane externe. Cette protéine de la famille MFPs (*Membrane Fusion Proteins*) est localisée dans le périplasme mais reste ancrée à la membrane interne par sa partie N-terminale grâce à des liaisons hydrophobes (Zgurskaya and Nikaido 2000²⁴⁹). MexA est la seule protéine adaptatrice cristallisée à ce jour chez *P. aeruginosa*. Plusieurs hypothèses d'organisation supramoléculaire ont été émises envisagées. La plus probable fait intervenir 13 monomères répartis en un hexamère et un heptamère dont l'assemblage forme un cylindre (Akama *et al.* 2004⁵). Chaque monomère [figure 14] forme une structure allongée constituée de trois domaines : (i) un premier domaine en tonneau permettant l'interaction avec l'élément « pompe » du système, (ii) un second domaine lipoylé constitué de 8 feuillets β et (iii) un dernier domaine constitué de 2 hélices α en épingle à cheveux, assurant l'interaction avec le pore de la membrane externe (Akama *et al.* 2004⁵ ; Higgins *et al.* 2004⁷⁴).

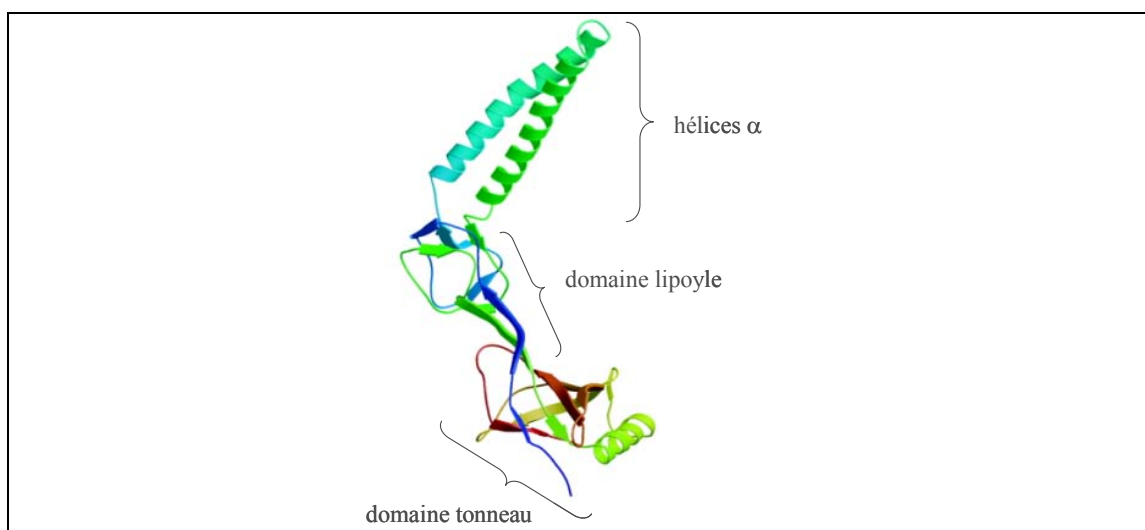


Figure 14. Structure d'un monomère MexA de *P. aeruginosa* (Akama *et al.* 2004⁵).

Chaque monomère MexA forme une structure allongée de 89 Å de long et de 35 Å de large et présente 3 domaines : un domaine d'hélice α en épingle à cheveux, un domaine lipoylé de feuillets β et un domaine tonneau.

Enfin, la **protéine de membrane externe** (*Outer Membrane Protein*) permet aux substrats de franchir la paroi bactérienne et empêche ainsi leur accumulation dans l'espace périplasmique. A l'inverse des MFPs, la protéine OMP de membrane externe est parfois interchangeable entre les différents systèmes d'efflux (Yoneyama *et al.* 1998²⁴⁴). Ainsi, la protéine OprM peut s'adapter naturellement aux couples MexA/MexB (Poole *et al.* 1993¹⁷⁸) ou MexX/MexY (Aires *et al.* 1999²) voire

MexE/MexF et MexC/MexD qui s'associent respectivement à OprN et OprJ (Gotoh *et al.* 1998⁵⁷ ; Maseda *et al.* 2000¹³⁵).

L'étude cristallographique révèle que le canal formé par OprM dans la membrane externe correspond à l'association de 3 monomères présentant chacun une extrémité N-terminale substituée par un acide gras modifié (Nikaido 2003¹⁶⁶ ; Akama *et al.* 2004⁴). Le trimère présente deux domaines : (i) un domaine en tonneau enchâssé dans la membrane, constitué de feuillets β et (ii) un second domaine constitué d'hélices α situé dans l'espace périplasmique [figure 14]. Le fonctionnement de la protéine OprM s'apparenterait à celui d'une autre OMP, TolC, décrite chez *E. coli* dont l'extrémité inférieure au contact du transporteur passe d'un état « ouvert » à un état « fermé » à la manière d'un diaphragme optique (Koronakis *et al.* 2000¹⁰⁸ ; Li and Poole 2001¹¹⁷). Il a été proposé mais non démontré que l'énergie nécessaire au changement conformationnel d'OprM serait apportée par la protéine TonB qui est impliquée dans le transfert d'énergie entre la membrane cytoplasmique et la membrane externe (Zhao *et al.* 1998²⁵¹).

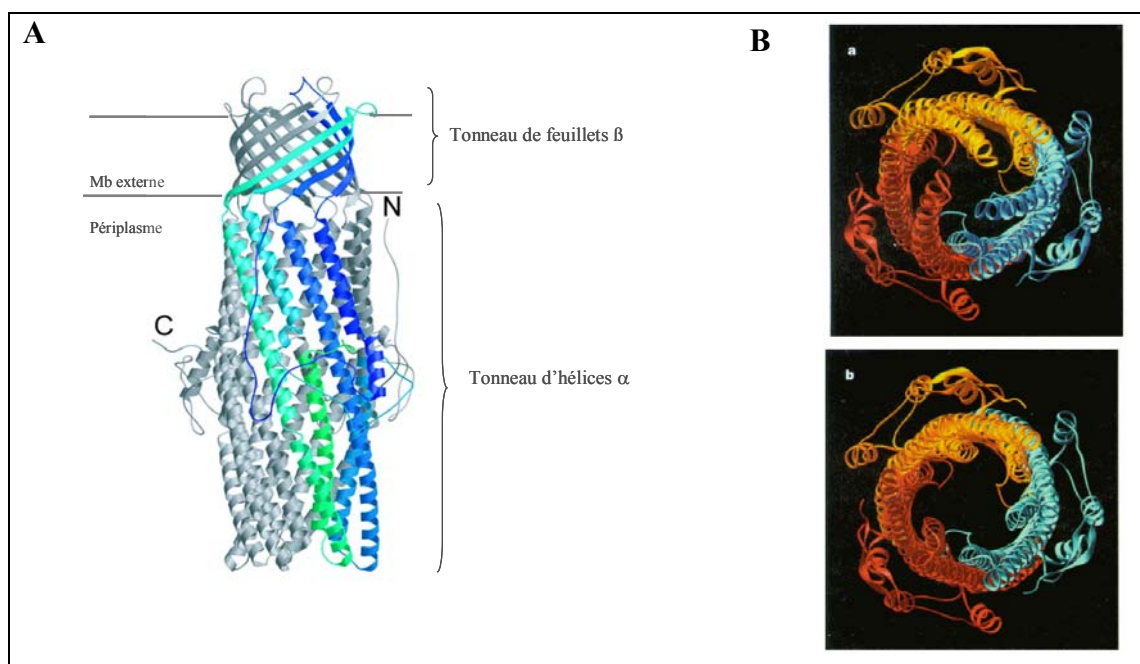


Figure 15. Organisation trimérique de la protéine OprM et mécanisme d'ouverture de la protéine TolC.

(A) Protéine OprM de *P. aeruginosa* : le tonneau constitué de feuillets β est enchâssé dans la membrane externe, alors que celui constitué d'hélices α est localisé dans le périplasma. Cette partie périplasmique mesure 100 Å de long ; le pore situé dans la membrane externe présente un diamètre de 6 à 8 Å (Akama *et al.* 2004⁴).

(B) Etat conformationnel « fermé » (a) et « ouvert » (b) de la protéine de membrane externe TolC de *E. coli* (Koronakis *et al.* 2000¹⁰⁸).

Systèmes impliqués dans l'efflux actif des β -lactamines

Parmi les différents systèmes d'efflux actif décrits chez *P. aeruginosa*, seuls les systèmes MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexXY(OprM) et MexEF-OprN [figure 16] peuvent conférer une résistance aux β -lactamines [tableau 6]. Ces systèmes sont codés par des opérons distincts sur le chromosome bactérien, comprenant de 2 à 3 gènes de structure. Un gène régulateur situé en amont assure le contrôle, négatif ou positif, de leur expression (Poole 2004¹⁷⁴). Produit constitutivement chez les bactéries sauvages, le système MexAB-OprM, joue un rôle fondamental dans la résistance naturelle à de nombreux agents toxiques ou antibiotiques dont les β -lactamines (Li *et al.* 1995¹¹⁶). MexCD-OprJ et MexXY(OprM) sont, en revanche, des systèmes dont la synthèse peut être induite par certains de leurs substrats (Morita *et al.* 2003¹⁵⁵ ; Jeannot *et al.* 2005⁹⁵ ; Morita *et al.* 2006¹⁵⁶). Les autres pompes d'efflux sont naturellement réprimées ; les conditions induisant leur synthèse demeurent encore inconnues (Li *et al.* 2003¹¹⁹). Tous ces systèmes peuvent être surproduits par la bactérie sous l'effet de mutations touchant des gènes régulateurs locaux ou globaux et engendrer une multirésistance vis-à-vis de leurs substrats respectifs (Grkovic *et al.* 2002⁵⁹).

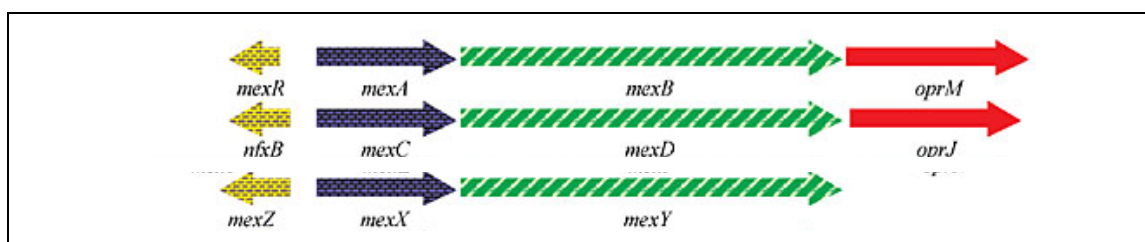


Figure 16. Représentation schématique des opérons codant les systèmes d'efflux actif impliqués dans la résistance aux β -lactamines (Schweizer 2003¹⁹⁹).

Le premier gène (en bleu) code la protéine adaptatrice périplasmique, le second (en vert) code la protéine de membrane interne, élément moteur du système, enfin, le dernier (en rouge) code la protéine de membrane externe. L'expression de ces opérons est sous contrôle d'un régulateur local (activateur ou répresseur) codé par un gène situé en amont (en jaune).

Tableau 6. Effet de la surproduction des systèmes Mex sur la résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques.

Système surproduit	Souche ou Mutant	Génotype	CMI (mg/L)							
			Tic	Caz	Fep	Atm	Imp	Tm	Amk	Cip
	PAO1		16	2	2	4	2	0,5	4	0,12
MexXY	MutGr1	<i>agrZ</i>	16	2	4	4	2	1	8	0,5
MexAB-OprM	PT629	<i>nalB</i>	64	4	4	16	2	0,5	4	0,25
	SC*	<i>nalC, agrZ</i>	64	2	8	16	2	1	8	1
	SC*	<i>nalD, agrZ</i>	64	4	8	16	2	1	8	0,5
MexCD-OprJ	EryR	<i>nfxB</i>	2	-	8	1	0,5	0,25	2	2
MexEF-OprN	PAO7H	<i>nfxC</i>	8	2	2	1	8	0,5	4	0,5

Tic, Ticarcilline ; Caz, Ceftazidime ; Fep, Céfépime ; Atm, Aztréonam ; Imp, Imipénème ; Tm, Tobramycine ; Amk, Amikacine Cip, Cirpofloxacin.

* Souche Clinique

- Le système MexAB-OprM

Produit constitutivement, le système d'efflux actif MexAB-OprM confère à la bactérie une résistance naturelle de bas niveau à différentes β -lactamines (à l'exception de l'imipénème) [figure 17] (Poole *et al.* 1993¹⁷⁸ ; Li *et al.* 1995¹¹⁶).

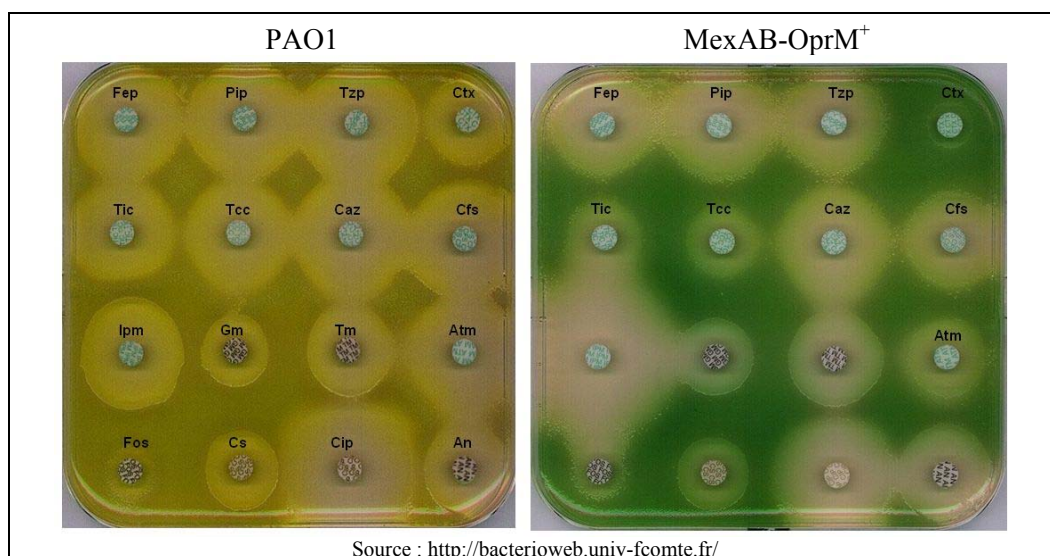


Figure 17. AntibioGrammes de la souche PAO1 et d'une souche surproduisant le système d'efflux actif MexAB-OprM.

La surproduction du système d'efflux actif MexAB-OprM (MexAB-OprM⁺) se traduit par une réduction des zones d'inhibition autour des disques de ticarcilline $\pm$ acide clavulanique (Tic, Tcc), de céfotaxime (Ctx) et d'aztréonam (Atm).

Fep, Céfépime ; Pip, Pipéracilline ; Tzp, Pipéracilline/Tazobactam ; Caz, Cefotaxime ; Cfs, Cefsulodin ; Ipm, Imipénème ; Gm, Gentamicine ; Tm, Tobramycine ; Fos, Fosfomycine ; Cs, Colistine ; Cip, Ciprofloxacine ; An, Amikacine.

Trois mécanismes différents contrôlent la production de ce système [figure 18].

Le premier à avoir été décrit est celui impliquant la protéine MexR codée par le gène *mexR* situé en amont de l'opéron *mexAB-oprM* et transcrit en sens inverse. La protéine MexR appartient à la famille des régulateurs transcriptionnels MarR ; elle assure la répression partielle de cet opéron en se liant sous forme d'un dimère, sur les sites I et II localisés dans région intergénique *mexR-mexA* (Evans *et al.* 2001⁴⁷). Récemment, il a été montré que l'expression de *mexAB-oprM* était également réprimée par un régulateur transcriptionnel de la famille TetR codé par le gène PA3574. Ce répresseur exerce son action en se liant sur un second promoteur de l'opéron *mexAB-oprM*, différent de celui contrôlé par MexR (Morita *et al.* 2006¹⁵⁴). Enfin, la 3^{ème} voie de régulation implique un petit

polypeptide de 53 acides aminés, codé par le gène *armR* pour *antirepressor for MexR* (*PA3719*) dont l'expression est régulée négativement par le produit du gène *PA3721*. La fixation du peptide ArmR sur MexR modifie l'espacement du domaine de fixation à l'ADN ce qui empêche alors le répresseur de se fixer sur les sites I et II de la région intergénique *mexR-mexA* (Daigle *et al.* 2007³² ; Wilke *et al.* 2008²³⁶). Ainsi, le système MexAB-OprM est surproduit chez des mutants présentant diverses altérations (insertions, délétions, substitutions nucléotidiques) dans les gènes répresseurs *mexR* (mutants *nalB*), *PA3574* (mutants *nalD*) ou encore *PA3721* (mutants *nalC*) [figure 18] (Poole *et al.* 1996¹⁷⁹ ; Cao *et al.* 2004²⁴ ; Sobel *et al.* 2005²¹⁰). De tels mutants se caractérisent par des niveaux de résistance modérés aux β -lactamines (CMI augmentées d'un facteur 2 à 16). Ainsi, les mutants *nalB* peuvent être facilement sélectionnés *in vivo* chez les patients en cours de traitement ou *in vitro* par des fluoroquinolones ou des β -lactamines (Ziha-Zarifi *et al.* 1999²⁵²). La fréquence d'émergence des mutants *nalB*, *nalC* ou *nalD* est relativement proche chez les isolats cliniques ; certaines souches pouvant à la fois être des mutants *nalB* et *nalC* (Llanes *et al.* 2004¹²³ ; Henrichfreise *et al.* 2007⁷²). En revanche, la surproduction du système d'efflux MexAB-OprM chez des isolats CF n'a pas été décrite à ce jour (Henrichfreise *et al.* 2007⁷²). Les résultats préliminaires de l'étude GERPA réalisée en France sur 208 isolats CF collectés en 2007 nuancent quelque peu cette observation. En effet, cette étude indique que 13,94 % des souches étudiées surexprimeraient l'opéron *mexAB-oprM* ; cette surexpression étant couplée dans 12,02 % des cas à celle l'opéron *mexXY* (Mérens *et al.* 2009¹⁴⁶). Ces données restent, toutefois, à valider par des approches phénotypiques.

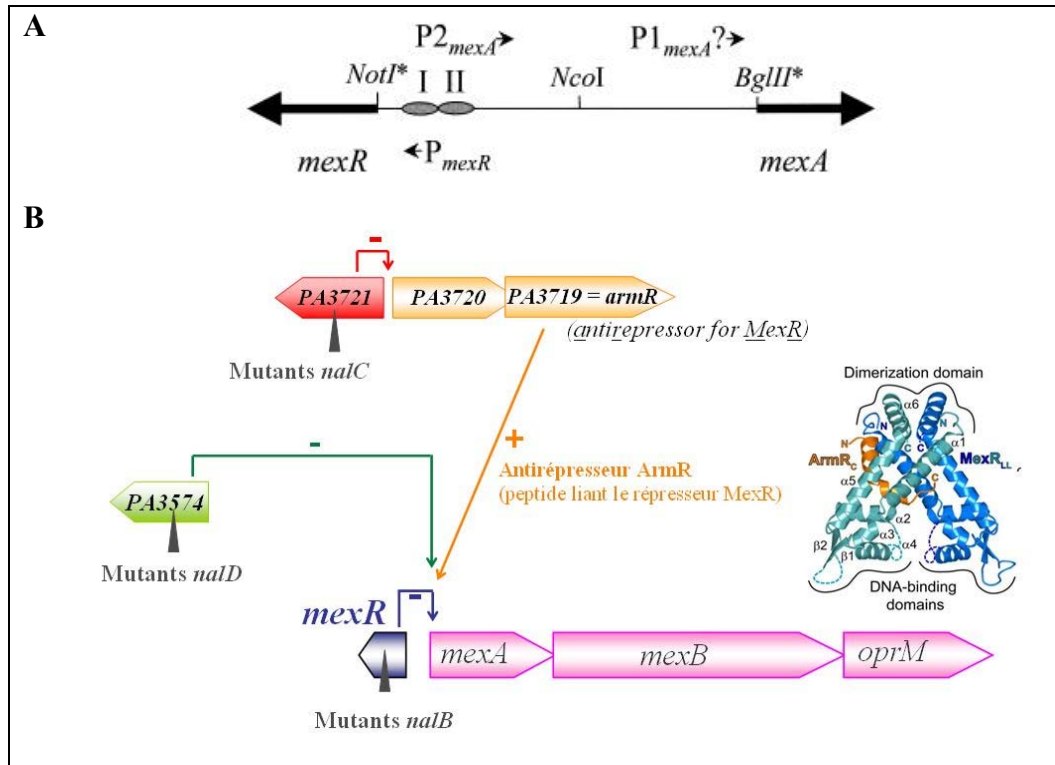


Figure 18. Régulation de l'expression de l'opéron *mexAB-oprM*.

(A) Représentation schématique de la région intergénique *mexR-mexA* d'après Evans *et al.* P_{mexR} : promoteur du gène *mexR* ; $P1_{mexA}$ et $P2_{mexA}$: promoteurs du gène *mexA*, le promoteur $P1$ permet une expression basale de *mexAB-oprM* conférant le phénotype de résistance aux souches sauvages de *P. aeruginosa* ; I et II : sites de fixation du répresseur MexR (Evans *et al.* 2001⁴⁷).

(B) Mécanismes de régulation : l'expression de l'opéron *mexAB-oprM* est (i) réprimée par les protéines codées par les gènes *mexR* et *PA3574* et (ii) activée lorsque le polypeptide codé par le gène *armR* (*PA3719*) se lie au répresseur MexR. Des mutations dans le gène *mexR* (mutants *nalB*) ou dans *PA3574* (mutants *nalD*) entraînent la surproduction du système. Ce dernier peut également être surproduit chez les mutants *nalC* qui surproduisent l'antirépresseur ArmR suite à des mutations inactivant *PA3721* (Poole *et al.* 1996¹⁷⁹ ; Cao *et al.* 2004²⁴ ; Daigle *et al.* 2007³² ; Wilke *et al.* 2008²³⁶).

- Le système MexCD-OprJ

Le système MexCD-OprJ, dont la production peut être induite par différents désinfectants utilisés en milieu hospitalier comme la chlorhexidine et le chlorure de benzalkonium (Morita *et al.* 2003¹⁵⁵), n'est que très faiblement produit chez les bactéries sauvages (Poole *et al.* 1996¹⁷⁶). Par ailleurs, ce système ne contribue pas à la résistance naturelle de *P. aeruginosa* vis-à-vis des fluoroquinolones, de l'érythromycine, du chloramphénicol, des tétracyclines, des céphalosporines zwitterioniques... car l'inactivation du gène *mexC* ne modifie pas la sensibilité à ces substrats (Poole *et al.* 1996¹⁷⁶). En revanche, le système MexCD-OprJ peut être surproduit chez des mutants présentant des altérations dans le gène répresseur *nfxB* (Okazaki and Hirai 1992¹⁶⁸ ; Masuda *et al.* 1996¹³⁷ ; Poole *et al.* 1996¹⁷⁶ ; Chuanchuen *et al.* 2001²⁸). Dans la plupart des cas, ces mutations conduisent à une substitution d'acides aminés (Arg₄₂→Gly ou Arg₄₂→His) au niveau de la région N-terminale de la protéine NfxB qui présente un motif hélice-tour-hélice (HTH) de fixation à l'ADN (Okazaki and Hirai 1992¹⁶⁸ ; Chuanchuen *et al.* 2001²⁸). D'autres substitutions peuvent, toutefois, être retrouvées en dehors de ce motif (His₈₇→Arg, Leu₈₈→Pro) (Poole *et al.* 1996¹⁷⁶ ; Chuanchuen *et al.* 2001²⁸ ; Jeannot *et al.* 2008⁹⁴). Les mutants *nfxB* présentent des niveaux de résistance aux fluoroquinolones, aux macrolides et aux β-lactamines zwitterioniques (céfépime, cefpirome) augmentés d'un facteur 4 à 16 (Poole *et al.* 1996¹⁷⁹ ; Masuda *et al.* 2000¹⁴⁰). En revanche, ces mutants apparaissent plus sensibles que les souches sauvages dont ils dérivent aux aminosides (facteur 2 à 32) et à quelques β-lactamines (ticarcilline, aztréonam, imipénème) suite à une moindre activité des systèmes d'efflux MexXY(OprM) et MexAB-OprM (Masuda *et al.* 1995¹³⁸ ; Masuda *et al.* 1996¹³⁷ ; Li *et al.* 2000¹¹⁸ ; Jeannot *et al.* 2008⁹⁴). Bien que la prévalence des mutants surproduisant le système MexCD-OprJ soit relativement faible chez les isolats cliniques (Higgins *et al.* 2003⁷⁵ ; Jeannot *et al.* 2008⁹⁴), Jalal *et al.* ont identifié des mutants *nfxB* chez des souches CF de *P. aeruginosa* résistantes à la ciprofloxacine (fluoroquinolone substrat du système MexCD-OprJ) (Jalal *et al.* 2000⁹²).

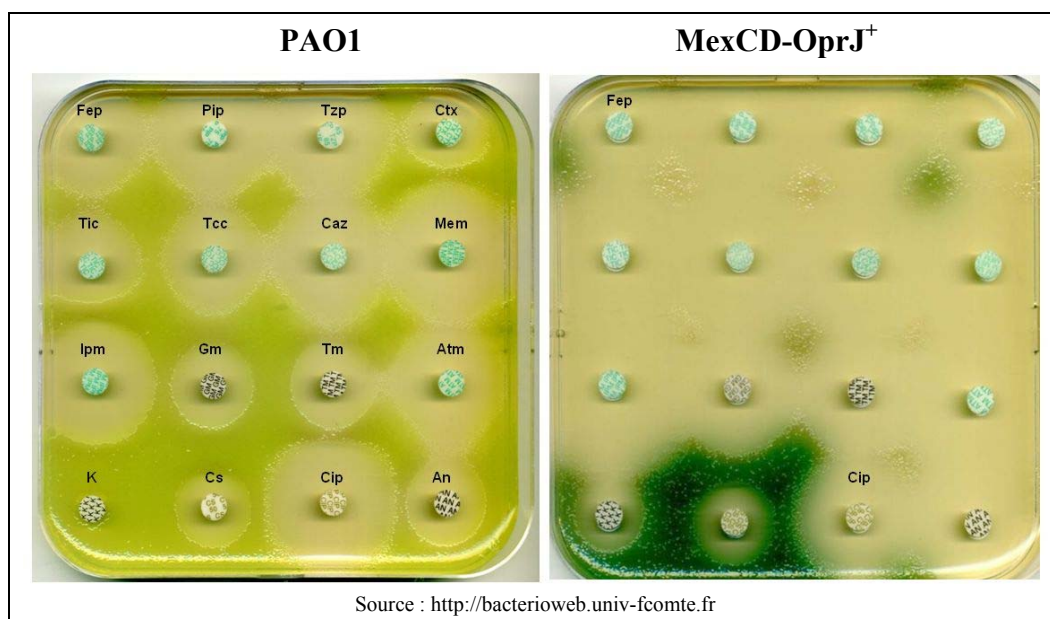


Figure 19. AntibioGrammes de la souche PAO1 et d'une souche surproduisant le système d'efflux actif MexCD-OprJ.

La surproduction du système d'efflux actif MexCD-OprJ chez les mutants *nfxB* (MexCD-OprJ⁺) entraîne une sensibilité réduite aux fluoroquinolones, telles que la ciprofloxacine (Cip), ainsi qu'aux β -lactamines zwitterioniques comme le céfépime (Fep). En revanche, les mutants *nfxB* se révèlent plus sensibles aux autres β -lactamines et aux aminosides suite à une réduction de l'activité des systèmes d'efflux actif MexAB-OprM et MexXY(OprM).

Pip, Pipéracilline ; Tzp, Pipéracilline/Tazobactam ; Ctx, Céfotaxime, Tic, Ticarcilline, Tcc, Ticarcilline/Acide Clavulanique ; Caz, Ceftazidime ; Mem, Méropénème ; Ipm, Imipénème ; Gm, Gentamicine ; Tm, Tobramycine ; Atm, Aztréonam ; K, Kanamycine ; Cs, Colistine ; An, Amikacine.

- Le système MexXY(OprM)

Le système d'efflux actif MexXY(OprM), dont le fonctionnement et la régulation seront détaillés dans le paragraphe II.2.b « Résistance aux aminosides », peut également conférer une résistance aux β -lactamines zwitterioniques telles que le céfépime et le ceftiofime [figure 20] (Aires *et al.* 1999²). Chez le mutant MutGr1 surproduisant constitutivement ce système, le niveau de résistance au céfépime est augmenté d'un facteur 2 relativement à la souche sauvage PAO1 (CMI de 2 mg/L) (Vogne *et al.* 2004²²⁷). La surproduction de ce système, fréquente chez les souches CF de *P. aeruginosa*, confère donc une résistance modérée au céfépime (CMI comprises entre 2 et 8 mg/L) (Islam *et al.* 2004⁸⁹ ; Vogne *et al.* 2004²²⁷ ; Islam *et al.* 2009⁹⁰).

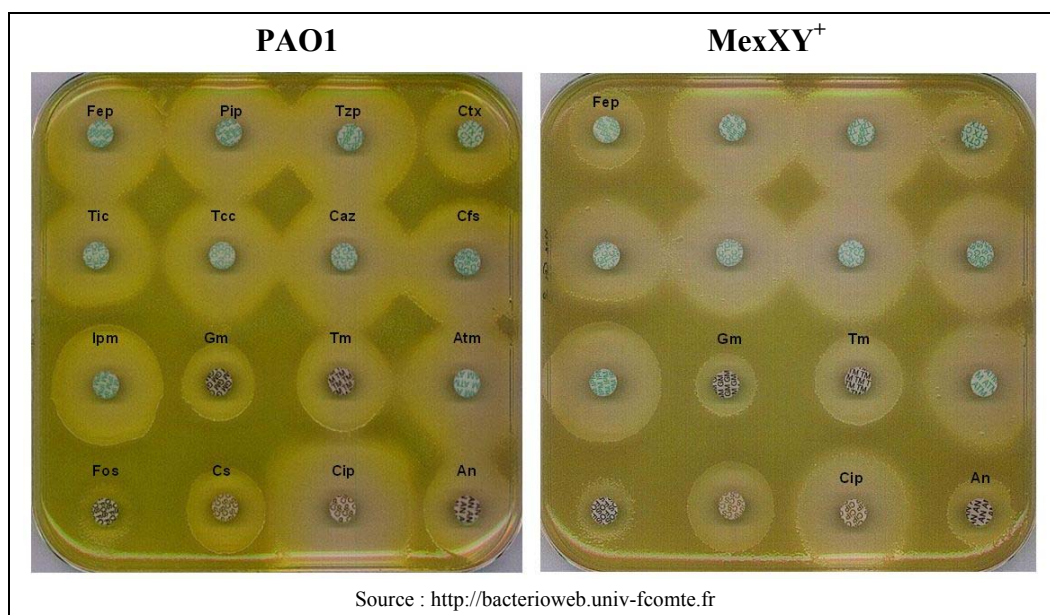


Figure 20. Antibioigrammes de la souche PAO1 et d'une souche surproduisant le système d'efflux actif MexXY(OprM).

Les mutants MexXY⁺, surproduisant le système d'efflux actif MexXY(OprM), présentent des réductions des zones d'inhibition autour des aminosides (Gm, gentamicine ; Tm, tobramycine ; An, amikacine), du céfépime (Fep) et de la ciprofloxacine (Cip).

Pip, Pipéracilline ; Tzp, Pipéracilline/Tazobactam ; Ctx, Céfotaxime, Tic, Ticarcilline, Tcc, Ticarcilline/Acide Clavulanique ; Caz, Ceftazidime ; Cfs, Cefsulodin ; Ipm, Imipénème ; Atm, Aztréonam ; Fos, Fosfomycine ; Cs, Colistine.

- Le système MexEF-OprN

Enfin, chez des mutants sélectionnés *in vitro* par la norfloxacine, le chloramphénicol ou la tétracycline, la surproduction du système MexEF-OprN est associée à une résistance aux carbapénèmes (imipénème et méropénème) [figure 21] (Masuda *et al.* 1995¹³⁸ ; Köhler *et al.* 1997¹⁰⁶) qui ne résulte pas d'une augmentation de l'efflux actif mais de la diminution concomitante de la production de la porine OprD (Masuda *et al.* 1995¹³⁸). Par ailleurs, Li *et al.* ont mis en évidence une relation inverse entre l'expression des opérons *mexEF-oprN* et *mexAB-oprM* (Li *et al.* 2000¹¹⁴). Ainsi, les souches surproduisant le système MexEF-OprN présentent une sensibilité diminuée aux β -lactamines par l'intermédiaire du régulateur MexT qui abolirait l'influence du médiateur intercellulaire du quorum sensing, le C4-HSL, sur l'expression de MexAB-OrpM (Masada *et al.* 2004¹³⁴).

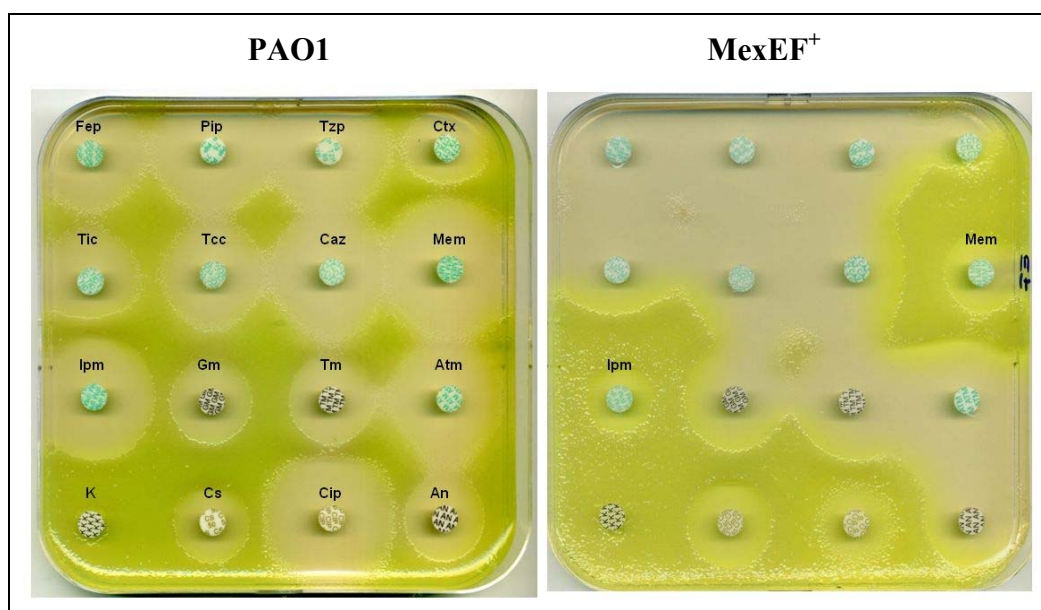


Figure 21. AntibioGrammes de la souche PAO1 et d'une souche surproduisant le système d'efflux actif MexEF-OprN.

Les mutants *nfxC* (MexEF⁺), surproduisant le système d'efflux actif MexEF-OprN, présentent une réduction des zones d'inhibition autour des disques d'imipénème (Ipm) et de méropénème (Mem) suite à une moindre production de la porine OprD. Ces souches sont également plus sensibles aux autres β -lactamines en raison d'une diminution de production du système d'efflux MexAB-OprM.

Fep, Céfépime ; Pip, Pipéracilline ; Tzp, Pipéracilline/Tazobactam ; Ctx, Céfotaxime, Tic, Ticarcilline, Tcc, Ticarcilline/Acide Clavulanique ; Caz, Ceftazidime ; Gm, Gentamicine ; Tm, Tobramycine ; Atm, Aztréonam ; K, Kanamycine ; Cs, Colistine ; Cip, Ciprofloxacine ; An, Amikacine.

c. Les porines

Pour atteindre leurs cibles situées au niveau de la membrane interne, les β -lactamines doivent, en tout premier lieu, franchir la membrane externe par l'intermédiaire de porines non spécifiques situées dans la membrane externe (Nikaido 2003¹⁶⁶). Chez *P. aeruginosa*, la protéine OprF, très conservée, est la porine majeure non spécifique permettant la diffusion lente de divers solutés. La porine OprD1 permet, quant à elle, la diffusion du glucose et de ses analogues structuraux ainsi qu'une diffusion relativement faible de l'imipénème. Par ailleurs, la porine OprD2 assure la diffusion d'acides aminés basiques et des carbapénèmes tels que l'imipénème et le méropénème (Trias and Nikaido 1990²²³ ; Trias and Nikaido 1990²²⁴). Des études de modélisation ont mis en évidence que ces solutés interagissent avec 8 larges boucles (nommées L1 à L8) de la porine exposées à la surface cellulaire [figure 22]. Les boucles L2 et L3 permettent la reconnaissance des acides aminés et de l'imipénème (Huang and Hancock 1996⁸⁶) alors que les boucles L5, L7 et L8 celle du méropénème (Huang *et al.* 1995⁸⁷). L'absence de OprD2 ou son dysfonctionnement suite à de substitutions d'acides aminés entraîne chez *P. aeruginosa* une résistance sélective aux carbapénèmes [figure 23] (Pai *et al.* 2001¹⁷⁰ ; Evans and Segal 2007⁴⁶ ; Giske *et al.* 2008⁵⁴). Ce type de phénomène semble très fréquent chez les souches isolées de patients atteints de mucoviscidose (Mérens *et al.* 2009¹⁴⁶).

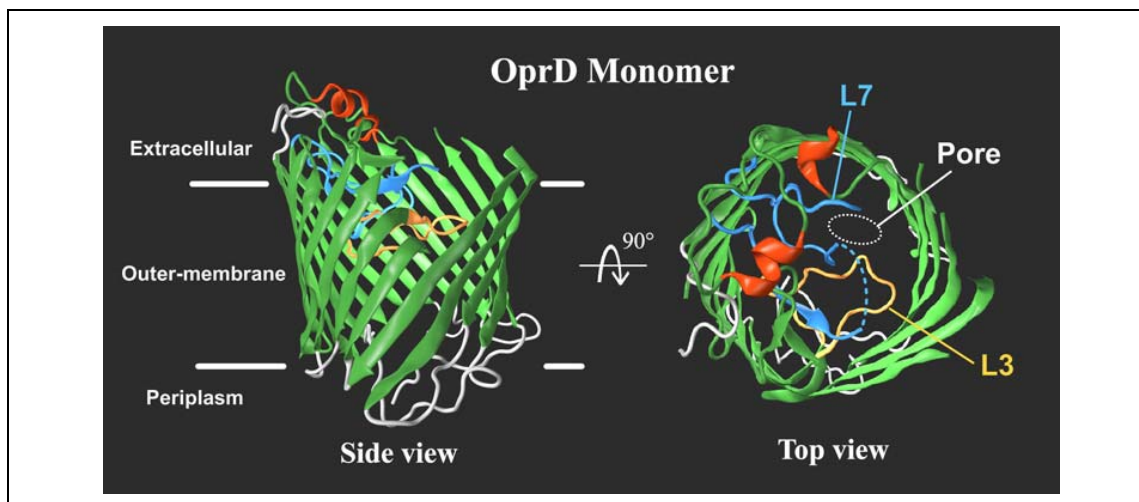


Figure 22. Structure d'un monomère de la porine OprD (Biswas *et al.* 2007¹⁷).

Les boucles L3 et L7 intervenant dans la reconnaissance des acides aminés, de l'imipénème et du méropénème apparaissent sur la vue du dessus (*Top view*).

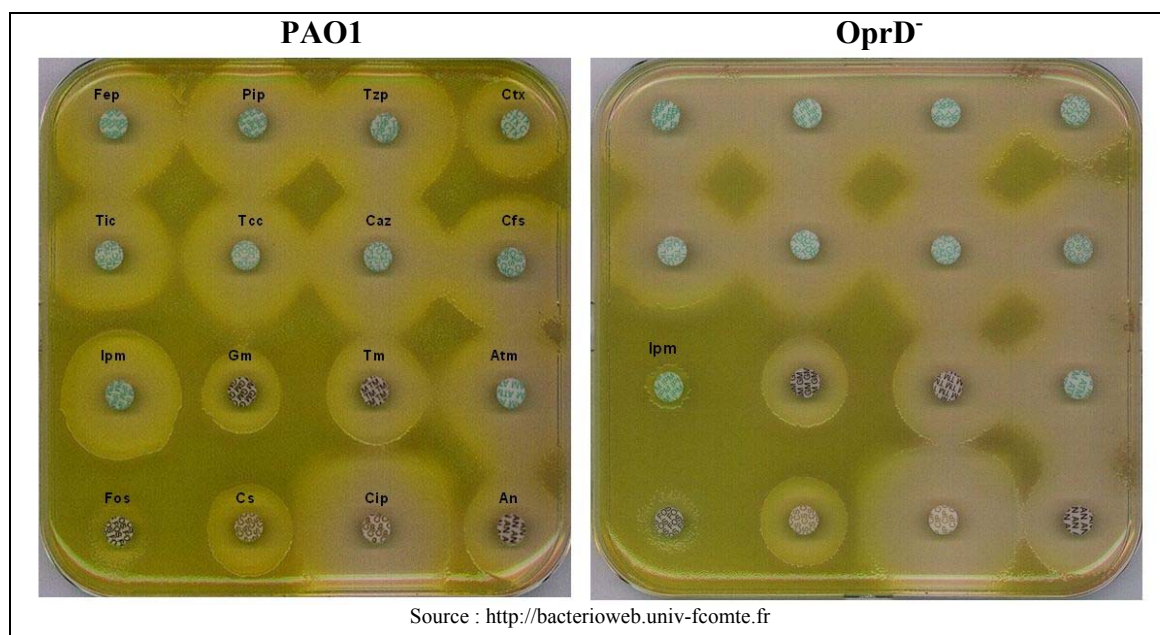


Figure 23. Antibiotogrammes de la souche PAO1 et d'une souche déficiente en porine OprD.

La souche OprD⁻ présente une réduction du diamètre de la zone d'inhibition autour de l'imipénème (Ipm).

Fep, Céfépime ; Pip, Pipéracilline ; Tzp, Pipéracilline/Tazobactam ; Ctx, Céfotaxime, Tic, Ticarcilline, Tcc, Ticarcilline/Acide Clavulanique ; Caz, Ceftazidime ; Cfs, Cefsulodin ; Gm, Gentamicine ; Tm, Tobramycine ; Atm, Aztréonam ; Fos, Fosfomycine ; Cs, Colistine ; Cip Ciprofloxacine ; An, Amikacine.

d. Les Protéines Liant des Pénicillines (PLP ou PBP)

Les β -lactamines inhibent la synthèse de la paroi bactérienne par blocage de l'action d'enzymes appelées PLP (Protéines Liant la Pénicilline) localisées dans l'espace périplasmique. Ces enzymes catalysent les réactions de transpeptidation et de transglycosylation constituant les étapes terminales de la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi. Chez *E. coli*, on compte pas moins de 13 PLP appartenant à deux groupes (i) les PLP de haut poids moléculaire parmi lesquelles figurent celles de classe A (PLP 1a, 1b et 1c) et de classe B (PLP 2 et 3) et (ii) celles de faible poids moléculaire (PLP 4, 5, 6, 7 et 8) (Legaree *et al.* 2007¹¹²). La sous-expression comme la surproduction de certaines PLP, la production de PLP altérées dont l'affinité pour les antibiotiques est réduite peut conférer aux bactéries une résistance sélective aux β -lactamines. Par exemple, la surproduction de la PLP 3 chez une souche de *P. aeruginosa* augmente la résistance à l'aztréonam, au céfépime, à la ceftazidime et au cefsulodin (Liao and Hancock 1995¹²⁰). En revanche, ce mécanisme n'a aucun effet sur les niveaux de résistance aux antibiotiques ayant pour cibles

préférentielles les PLP 1 et 2 (respectivement la cephaloridine et l'imipénème) (Liao and Hancock 1995¹²⁰). Chez certains isolats cliniques la sous-expression des PLP 2 et 3 serait la cause d'une résistance plus élevée aux carbapénèmes (Giske *et al.* 2008⁵⁴). La variation des niveaux de PLP s'observe également chez les souches de mucoviscidose. Les travaux réalisés par Godfrey *et al.* sur l'émergence de la résistance aux β -lactamines chez des patients CF traités par de fortes doses de tobramycine et de pipéracilline ont mis en évidence la modification des PLP. Les auteurs ont ainsi montré que les souches CF étudiées ne produisaient plus de PLP 3 ou produisaient une cible sur laquelle la [¹⁴C]-pénicilline était incapable de se fixer. Par ailleurs, ces souches présentaient une production accrue de la PLP 6 (Godfrey *et al.* 1981⁵⁶).

2. Résistance aux aminosides

De par leur spectre d'activité étendu et leur caractère rapidement bactéricide, les aminosides occupent une place importante dans le traitement des infections à *P. aeruginosa*, chroniques ou aiguës. Chimiquement, les aminosides sont des polycations hydrophiles composés, dans la majorité des cas, de plusieurs cycles glycosidiques et d'un cycle aminocyclitol (2-désoxystreptamine) substitué en position 4,5 ou 4,6 [figure 24] (Magnet and Blanchard 2005¹²⁷). Leur action antibactérienne, bien que complexe, s'exerce essentiellement sur le ribosome en bloquant ou en perturbant la synthèse protéique. Par exemple, la fixation de certains aminosides sur la sous-unité 30S du ribosome perturbe la reconnaissance codon-anticodon et conduit à la production de peptides aberrants non fonctionnels. L'accumulation de ces peptides dans la cellule s'avère finalement létale pour la bactérie (Mingeot-Leclercq *et al.* 1999¹⁵¹). La sensibilité naturelle de *P. aeruginosa* aux aminosides résulte de l'expression de plusieurs mécanismes intrinsèques. Ainsi, la faible perméabilité de la membrane externe qui constitue un obstacle naturel à la pénétration intracellulaire et à l'efficacité de nombreux antibiotiques participe à cette résistance de bas niveau (Hancock 1984⁶⁵). De surcroît, la production d'une enzyme modificatrice de type phospho-transférase, l'APH(3')IIb, codée par un gène chromosomique confère à *P. aeruginosa* une résistance naturelle élevée à la kanamycine et à la néomycine (Zeng and Jin 2003²⁴⁸).

A

Antibiotic

R₁

R₂

R₃

R₄

Ribostamycin

H

NH₂

OH

H

Butirosin

NH₂

OH

H

Paromomycin

H

OH

OH

NeomycinB

H

NH₂

OH

Lividomycin A

H

OH

H

B

Antibiotic

R₁

R₂

R₃

R₄

R₅

R₆

R₇

R₈

R₉

R₁₀

Kanamycin A

H

NH₂

OH

OH

OH

H

H

H

OH

CH₂OH

Kanamycin B

H

NH₂

OH

OH

NH₂

H

H

H

OH

CH₂OH

Tobramycin

H

NH₂

OH

H

NH₂

H

H

H

OH

CH₂OH

Dibekacin

H

NH₂

H

H

NH₂

H

H

H

OH

CH₂OH

Gentamicin B

H

NH₂

OH

OH

OH

H

CH₃

OH

CH₃

H

Gentamicin C1

CH₃

NHCH₃

H

H

NH₂

H

CH₃

OH

CH₃

H

Gentamicin C1A

H

NH₂

H

H

NH₂

H

CH₃

OH

CH₃

H

Gentamicin C2

CH₃

NH₂

H

H

NH₂

H

CH₃

OH

CH₃

H

Sisomicin*

H

NH₂

H

H

NH₂

H

CH₃

OH

CH₃

H

Netilmicin*

H

NH₂

H

H

NH₂

CH₂CH₃

CH₃

OH

CH₃

H

Isepamicin

H

NH₂

OH

OH

OH

CH₃

OH

CH₃

H

Arbekacin

H

NH₂

H

H

NH₂

H

H

OH

CH₂OH

Amikacin

H

NH₂

OH

OH

OH

H

H

OH

CH₂OH

Figure 24. Structure des aminosides à noyau 2-déoxystreptamine (en rouge) bisubstitué en 4,5 (A), ou en 4,6 (B) d'après Magnet *et al.* (Magnet and Blanchard 2005¹²⁷).

La bactérie peut également développer des mécanismes additionnels qui (i) s'opposent à la pénétration des aminosides (modification des LPS, altération du transport actif) ou favorisent leur efflux, (ii) inactivent l'antibiotique ou (iii) diminuent l'affinité de ces agents pour leur cible (Poole 2005¹⁷⁵). L'association de plusieurs mécanismes de résistance non enzymatique a été analysée chez des doubles, triples et quadruple mutants ayant des gènes *galU*, *rplY*, *mexZ* et/ou *nuoG* inactivés. L'association des mécanismes augmente graduellement la résistance aux aminosides (El'Garch *et al.* 2007⁴⁴).

a. Les enzymes modificateurs des aminosides

Les aminosides se fixent sur le ribosome par leurs fonctions $-OH$ et $-NH_2$. La modification enzymatique de certaines de ces fonctions par la bactérie peut donc réduire fortement l'affinité de l'antibiotique pour sa cible, créant un état d'insensibilité. Trois catégories d'enzymes modificateurs ont été décrites chez *P. aeruginosa* : les amino-acétyl-transférases (AAC) qui neutralisent les fonctions $-NH_2$; les phospho-transférases (APH) et les nucléotidyl-transférases (ANT) qui neutralisent les fonctions $-OH$. La nomenclature utilisée pour désigner ces trois catégories tient compte de [figure 24] :

- la réaction catalysée (nucléotidylation : ANT ; acétylation : AAC ; phosphorylation APH),
- la position du carbone portant le groupement modifié (chiffre arabe, suivi du signe « ' » lorsque ce carbone appartient au cycle fixé en position 4 du noyau 2-déoxystreptamine ou du signe « '' » lorsqu'il s'agit du cycle en position 5 ou 6.
- la spécificité en substrats en chiffre romain.

Les gènes codant des enzymes de fonction identique sont distingués par une lettre minuscule (Mingeot-Leclercq *et al.* 1999¹⁵¹).

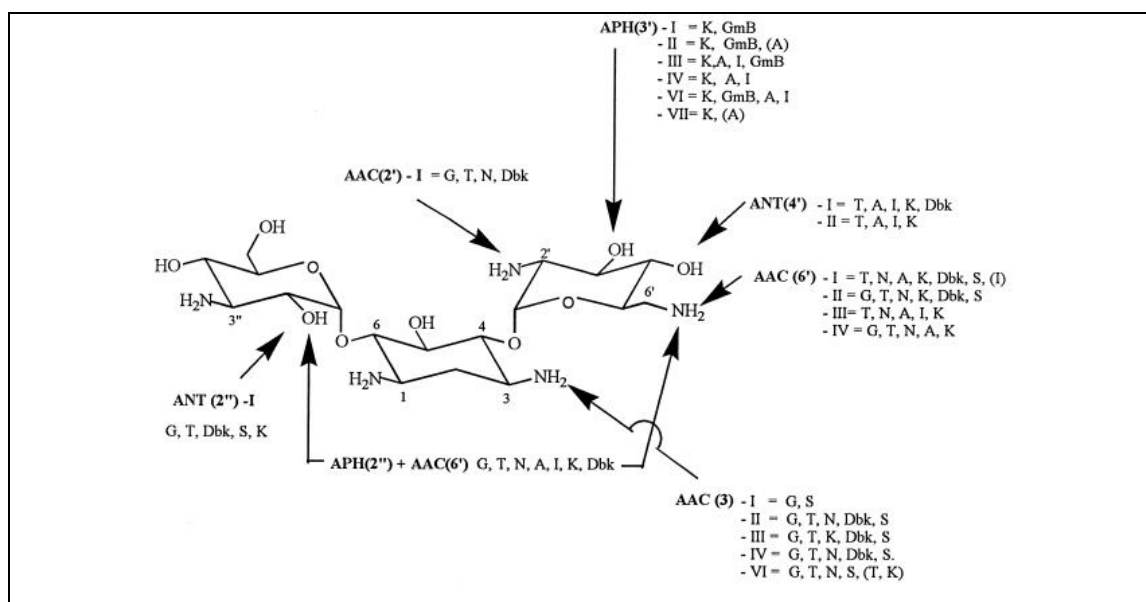


Figure 25. Principales enzymes modificateurs des aminosides (Mingeot-Leclercq *et al.* 1999¹⁵¹).

A, Amikacine ; G, Gentamicine ; GmB, Gentamicine B ; T, Tobramycine ; N, Nétilmicine ; K, Kanamycine ; I, Isépacine ; S, Sisomicine ; Dbk, Dibécacine.

Etant donné que ces enzymes sont stéréo-spécifiques et que la nature et la localisation des fonctions modifiables varient d'un aminoside à l'autre, il s'en suit une résistance de haut niveau qui n'affecte que les substrats spécifiques de chaque enzyme [figure 24]. Si l'APH(3')IIb est produite naturellement par l'espèce (résistance à la kanamycine et à la néomycine), les autres enzymes modificatrices sont, quant à elles, acquises de façon aléatoire *via* des éléments génétiques mobiles (plasmides, transposons). Elles confèrent aux souches une résistance de haut niveau à plusieurs aminosides (Mingeot-Leclercq *et al.* 1999¹⁵¹ ; Zeng and Jin 2003²⁴⁸ ; Henrichfreise *et al.* 2007⁷²).

Alors que la prévalence de la résistance enzymatique aux aminosides est importante chez les souches de *P. aeruginosa* isolées dans différents contextes cliniques (70 à 80%), elle se révèle faible chez les souches isolées de patients atteints de mucoviscidose [tableau 7]. Par exemple, les travaux de MacLeod *et al.* sur 143 souches pour lesquelles la CMI de la tobramycine était supérieure à 16 mg/L indiquaient la présence de mécanismes enzymatiques dans moins de 10 % des cas. Parmi les 11 enzymes recherchées par PCR, seules une ANT(2'')-Ia et une AAC(6')-Ib' ont été détectées (MacLeod *et al.* 2000¹²⁵). De la même façon, Islam *et al.* n'ont pu mettre en évidence les enzymes modificatrices AAC(6')-Ib, ANT(4')-IIb, et APH(3')-IIps chez 15 isolats CF résistants aux aminosides (CMI de l'amikacine comprise entre 16 et 256 mg/L) (Islam *et al.* 2004⁸⁹).

Tableau 7. Prévalence de la résistance enzymatique

Souches de <i>P. aeruginosa</i>				Pourcentage de la résistance enzymatique	Références
Origine	n	Patients	Résistance *		
Etats-Unis	125	non CF	AG	82,6	(Miller <i>et al.</i> 1997 ¹⁴⁸)
Etats-Unis	151	non CF	AG	76,3	(Miller <i>et al.</i> 1997 ¹⁴⁸)
Europe	1499	non CF	AG	77,5	(Miller <i>et al.</i> 1997 ¹⁴⁸)
France	52	non CF	AG	71,2	(Dubois <i>et al.</i> 2008 ⁴²)
Etats-Unis	27	CF	Amk	0	(Hurley <i>et al.</i> 1995 ⁸⁸)
Etats-Unis	56	CF	Tm	12,5	(Shawar <i>et al.</i> 1999 ²⁰⁴)
Etats-Unis	143	CF	Tm	9,8	(MacLeod <i>et al.</i> 2000 ¹²⁵)
Suède	15	CF	AG	0	(Islam <i>et al.</i> 2004 ⁸⁹)

AG : Aminosides, Amk : Amikacine, Tm : Tobramycine.

* les critères peuvent varier selon les concentrations critiques retenues dans chaque pays.

b. Résistance par efflux actif

Chez *P. aeruginosa*, seul le système d'efflux actif MexXY(OprM) est capable d'exporter les aminosides vers le milieu extérieur et entraîner une résistance à cette famille d'antibiotiques (Westbrock-Wadman *et al.* 1999²³³). Ce système est codé par un opéron constitué de deux gènes : *mexX* et *mexY* dont l'expression est inductible (III. 2. c *Induction du système MexXY*). Pour former un système tripartite fonctionnel, les protéines MexX et MexY doivent s'associer à un troisième élément (OprM) situé dans la membrane externe, codé par l'opéron *mexAB-oprM* (Masuda *et al.* 1996¹³⁷). Chez les souches sauvages, la production du système MexXY(OprM) est faible (Aires *et al.* 1999²). En effet, l'expression de l'opéron *mexXY* est la sous dépendance d'un répresseur de la famille TetR, nommé MexZ, codé par un gène situé en amont de l'opéron et transcrit en sens inverse (Aires *et al.* 1999² ; Westbrock-Wadman *et al.* 1999²³³). Les répresseurs appartenant à cette famille sont connus pour se fixer sous forme de dimères sur des régions spécifiques de l'ADN, grâce à un motif conservé hélice-tour-hélice (HTH) (Meier *et al.* 1988¹⁴⁴). MexZ se lie ainsi à la région intergénique *mexZ-mexX*, au niveau d'une zone comprenant deux séquences répétées inversées de 10 pb, séparées par 4 pb [figure 26]. Les promoteurs de l'opéron *mexXY* et du gène *mexZ* étant chevauchant, la fixation du répresseur empêche à la fois la transcription de l'opéron et module celle de son propre gène (Matsuo *et al.* 2004¹⁴¹).

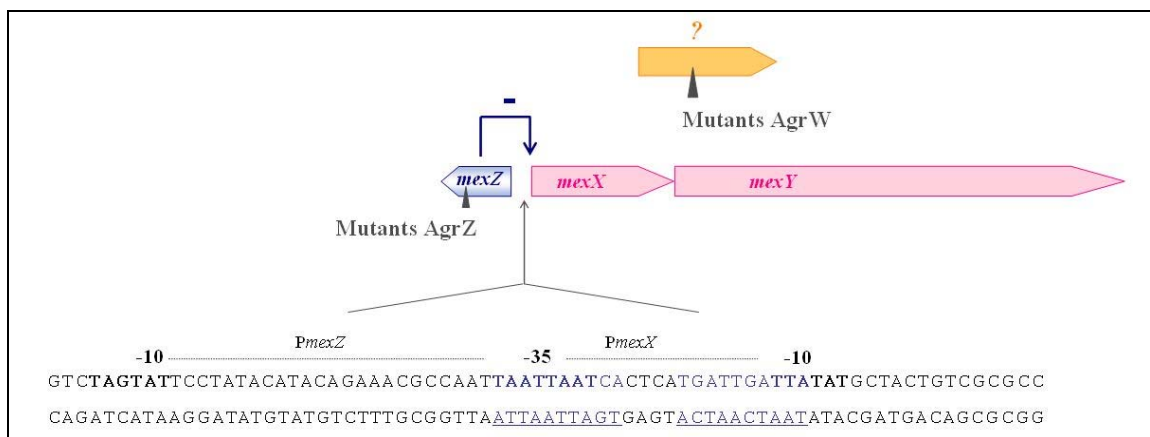


Figure 26. Organisation et régulation de l'expression de l'opéron *mexXY*.

L'expression de l'opéron *mexXY* est constitutivement réprimée par le produit du gène *mexZ*, situé en amont et transcrit en sens inverse. MexZ se lie sous forme de dimère au niveau des deux séquences répétées inversées (en bleu) situées dans la région intergénique *mexZ-mexXY*. Les promoteurs des gènes *mexZ* et *mexX* (*P_{mexZ}* et *P_{mexX}*) situés dans cette région, sont chevauchants ; les régions -10 et -35 sont notées en gras. Des mutations survenant dans le gène *mexZ* (mutants *agrZ*) ou dans des loci inconnus (mutants *agrW*) sont à l'origine de la surexpression de l'opéron.

Le mécanisme d'induction de l'expression de l'opéron *mexXY* est décrit dans le paragraphe III. 2. c.

Naturellement réprimé chez les souches sauvages, ce système peut être surproduit chez certains mutants lorsque des mutations surviennent dans le gène répresseur *mexZ* (mutants *agrZ*) ou dans des *loci* inconnus (mutants *agrW*). Ces mutants peuvent s'obtenir aussi bien *in vitro* que *in vivo*. La surexpression constitutive de l'opéron *mexXY* qui en résulte entraîne une résistance modérée aux aminosides (CMI augmentées d'un facteur 2 à 8 par rapport à la souche de référence PAO1) mais également aux fluoroquinolones et au céfépime (Llanes *et al.* 2004¹²³). Toutefois, il n'y a pas de relation proportionnelle stricte entre le niveau de surproduction du système et les niveaux de résistance observés (Sobel *et al.* 2003²¹¹ ; Llanes *et al.* 2004¹²³). Une étude réalisée sur 170 souches non CF de *P. aeruginosa* a révélé que 58,2 % d'entre elles surexprimaient l'opéron *mexXY* (Hocquet *et al.* 2007⁷⁸). Une large proportion de ces isolats présentait des niveaux de résistance modérés à l'amikacine (CMI comprise entre 8 et 16 mg/L). Chez les souches fortement résistantes aux aminosides la surproduction du système MexXY(OprM) est fréquente et s'associe à d'autres mécanismes de résistance (Hocquet *et al.* 2007⁷⁸). Quant aux souches isolées de patients mucoviscidosiques, il est maintenant bien établi que MexXY(OprM) peut être à l'origine d'une résistance modérée à forte aux aminosides en absence d'enzymes modificatrices (Islam *et al.* 2004⁸⁹ ; Vogne *et al.* 2004²²⁷ ; Islam *et al.* 2009⁹⁰).

c. Résistance par modification des lipopolysaccharides membranaires (LPS)

Structure des LPS

Les LPS qui forment l'essentiel du feuillet superficiel de la membrane externe comprennent (i) une partie lipidique appelée lipide A, (ii) une pièce intermédiaire appelée core, (iii) un polymère saccharidique portant l'antigène O [figure 27]. Le lipide A est un disaccharide constitué de 2 résidus glucosamine substitués par 5 à 7 résidus d'acides gras à longue chaîne. Cet élément toxique assure l'ancrage de la molécule de LPS dans la membrane externe (Wilkinson 1996²³⁷). Le core fait le lien entre le lipide A et les chaînes polysaccharidiques. Il comprend des molécules de sucres fortement phosphorylées, ce qui confère un caractère électronégatif à la membrane externe. Cette propriété favorise l'interaction des agents antibactériens polycationiques comme les

aminosides et les polymyxines (Hancock and Wong 1984⁶⁷ ; Wilkinson 1996²³⁷). Enfin, les chaînes polysaccharidiques se déployant à la surface de la membrane externe dans le milieu extracellulaire constituent un feutrage hydrophile. De longueur variable, elles sont composées d'une répétition de 30 à 50 unités saccharidiques de deux types : les bandes A et les bandes B. Les LPS de bande A contiennent un polymère neutre, faiblement immunogène de D-rhamnose qui représente 90 % des LPS retrouvés dans la membrane externe (Rivera *et al.* 1988¹⁸⁶ ; Rocchetta *et al.* 1999¹⁸⁹). A l'opposé, les LPS bande B renferme des répétitions d'unités polysaccharides riches en sucres aminés, support de l'antigène somatique "O". Les variations structurales de l'antigène O sont à la base de la classification des souches en 20 sérotypes différents (Rivera and McGroarty 1989¹⁸⁸). Certaines souches de *P. aeruginosa*, appelées « rough », ne sont plus sérotypables en raison d'altérations qualitatives ou quantitatives des molécules de LPS (Hancock *et al.* 1983⁶⁶).

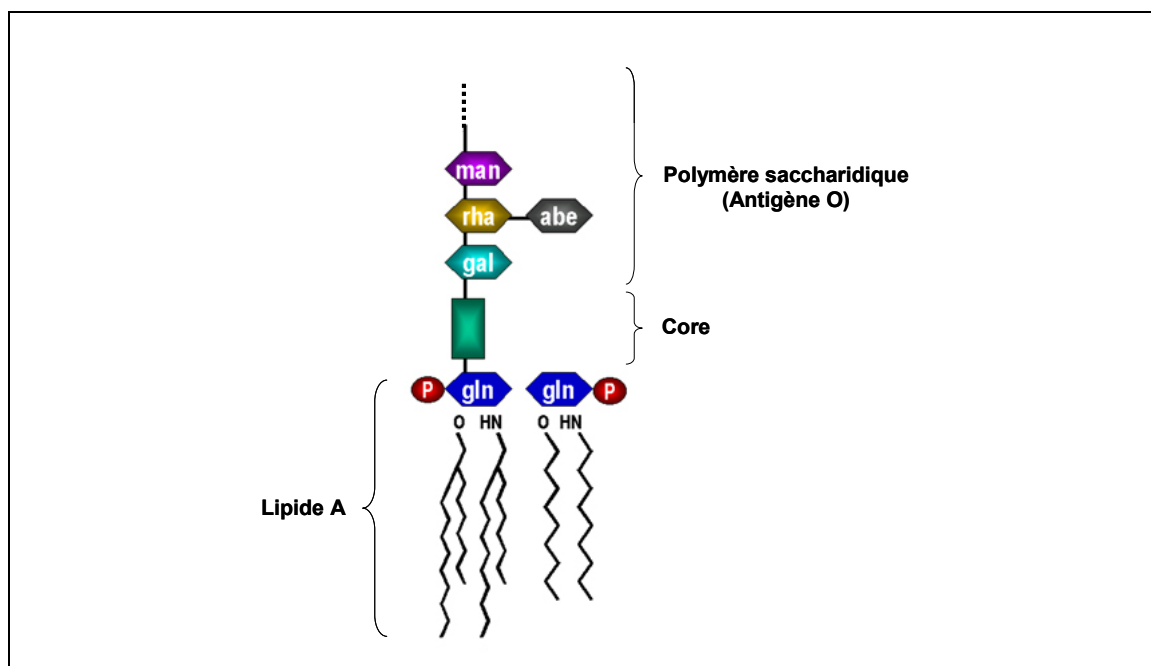


Figure 27. Représentation schématique de la structure d'une molécule de LPS

Les LPS bactériens sont constitués d'une partie lipidique insérée dans la membrane externe, le lipide A, d'une pièce intermédiaire appelée core et d'un polymère saccharidique complexe portant l'antigène O ou un polymère de D-Rhamnose.

Mécanismes de pénétration des aminosides

Le passage des aminosides à travers la membrane externe s'effectue par la bicouche lipidique et non par la voie des porines, comme c'est le cas pour la plupart des autres antibiotiques (β -lactamines, fluoroquinolones, tétracyclines...). En effet, les aminosides établissent des interactions électrostatiques avec les LPS composant le feuillet externe de cette membrane asymétrique. Grâce à leurs nombreuses charges électropositives (3 à 5) les aminosides se fixent sur les groupements phosphate et pyrophosphate du core et, de ce fait, déplacent les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} qui assurent normalement la cohésion entre les molécules adjacentes de LPS (Hancock and Wong 1984⁶⁷ ; Rocchetta *et al.* 1999¹⁸⁹). La déstabilisation transitoire de l'arrangement des molécules de LPS suffit à ces antibiotiques plans et flexibles pour s'insérer dans la bicouche lipidique et atteindre l'espace périplasmique (Kadurugamuwa *et al.* 1993¹⁰¹).

Modification des LPS et impact sur la résistance aux aminosides

La modification structurale des LPS peut être à l'origine d'une résistance de bas niveau aux aminosides. En effet, chez le mutant FE49, dérivant de la souche PAO1, les molécules de LPS sont privées de leur partie polysaccharidique et d'une partie du core ce qui tend à diminuer les charges électronégatives avec lesquelles les aminosides interagissent pour franchir la membrane externe (El'Garch *et al.* 2007⁴⁴). Il en résulte alors une augmentation du niveau de résistance aux aminosides d'un facteur 2 comparativement à la souche PAO1 (El'Garch *et al.* 2007⁴⁴). Ce phénomène s'observe également chez les souches « *rough* » colonisant les patients atteints de mucoviscidose, chez lesquelles les molécules de bande B sont souvent absentes (Kadurugamuwa *et al.* 1993¹⁰¹).

d. Résistance par méthylation de l'ARN16S

Le méthylation ribosomale, un mécanisme de protection développé par les organismes producteurs d'aminosides (actinomycètes), s'effectue sur le résidu G en position 1405 de l'ARN16S au niveau du site A (Galimand *et al.* 2003⁵⁰). Décrit dans un premier temps chez les entérobactéries (Galimand *et al.* 2003⁵⁰), la méthylation de l'ARN16S est un mécanisme qui confère à *P. aeruginosa* une résistance à toutes les

2-desoxystreptamines bisubstituées en 4,6 mais qui n'affecte pas l'activité de la néomycine (Yokoyama *et al.* 2003²⁴²). A ce jour, plusieurs gènes codant des méthylases de ce type ont été identifiés chez *P. aeruginosa*. Le premier cas de résistance par méthylation de l'ARN16S a été décrit chez des souches cliniques isolées au Japon. Ces souches notamment résistantes à la tobramycine, l'amikacine, la gentamicine et à l'arbécacine possèdent un gène *rmtA* codant une méthylase homologue à celle produite par les actinomycètes. Il semble que le gène *rmtA*, porté par un transposon situé sur un plasmide conjugatif, ait diffusé à partir des actinomycètes (Yokoyama *et al.* 2003²⁴²).

3. Résistance à la colistine

La colistine [figure 28], antibiotique appartenant à la famille des polymyxines, est un polypeptide cyclique, cationique, ciblant les membranes bactériennes. Bien qu'ayant une activité intrinsèque intéressante vis-à-vis des bactéries à Gram négatif, cet antibiotique est peu utilisé en thérapeutique humaine en raison de sa néphrotoxicité (Falagas and Kasiakou 2005⁴⁸). En revanche, il est fréquemment administré, par voie inhalée, au stade de la colonisation précoce ou intermittente chez les patients atteints de mucoviscidose pour tenter d'éradiquer *P. aeruginosa* dont les profils de résistance évoluent peu au cours du temps (Johansen *et al.* 2008⁹⁸ ; Mérens *et al.* 2009¹⁴⁶). Toutefois, depuis quelques années, on observe l'émergence de rares clones hautement résistants à cet antibiotique (CMI supérieure à 50 mg/L comparativement à la souche PAO1 pour laquelle la CMI est de 3 mg/L) (Johansen *et al.* 2008⁹⁸).

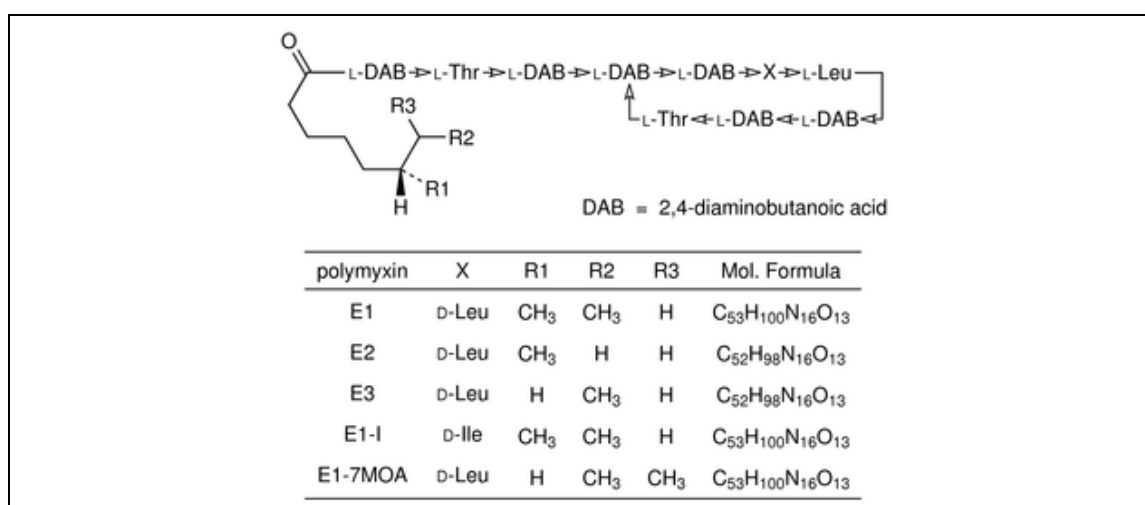


Figure 28. Structure de la colistine (polymyxine E1).

Chez les isolats CF de *P. aeruginosa*, la résistance à la colistine, résulte d'une modification des LPS (Johansen *et al.* 2008⁹⁸). En effet, la fixation de la colistine au niveau de la membrane externe est rendue possible grâce à des interactions électrostatiques entre le polycation et les groupements négatifs portés par les molécules de LPS. Par un mécanisme similaire à celui utilisé par les aminosides, la colistine franchit la membrane externe puis s'insère dans la membrane cytoplasmique créant une fuite des composés cellulaires et un arrêt de la respiration cellulaire fatal pour la bactérie (Falagas and Kasiakou 2005⁴⁸).

Chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, le système à deux composants PmrA-PmrB est connu pour son rôle dans la régulation de la résistance aux polypeptides cationiques. L'activation de PmrA-PmrB régulant les loci *pmrE* et *pmrF*, codant respectivement une UDP-glucose déshydrogénase et une glycosyltransférase, entraîne la modification des groupements phosphate du core et du lipide A des LPS ainsi que l'ajout d'un 4-amino-arabinose sur le phosphate 4' du lipide A. De telles modifications réduisent les échanges électrostatiques à la surface de la cellule et l'interaction avec les polypeptides cationiques (Gunn *et al.* 1998⁶³). Un système de modification des LPS, homologue à PmrA-PmrB, a été mis en évidence chez des mutants spontanés de *P. aeruginosa* résistants à la polymyxine B. L'activation du système PmrA-PmrB, régulant les loci *PA3552* à *PA3559*, entraîne l'ajout d'un 4-amino-arabinose sur le groupement phosphate du lipide A. Comme dans le cas de *S. typhimurium*, cette modification empêche la pénétration de l'antibiotique dans la cellule bactérienne (McPhee *et al.* 2003¹⁴³ ; Moskowitz *et al.* 2004¹⁵⁷).

4. Résistance aux fluoroquinolones

Les fluoroquinolones, antibiotiques de synthèse, sont utilisées dans de nombreuses infections bactériennes car elles possèdent un pouvoir bactéricide rapide. Ces antibiotiques ont pour cibles les topoisomérases bactériennes de type II : l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Bien que présentant de grandes homologues de structure et de séquences protéiques, ces deux enzymes assurent des fonctions distinctes mais cruciales pour le maintien de la topologie de l'ADN. L'ADN gyrase, hétéro-tétramère constitué de deux sous-unités GyrA et de deux sous-unités GyrB, introduit des surenroulements négatifs qui en relâchant l'ADN, permettent la progression des ADN- et ARN-

polymérase. La topoisomérase IV, constituée des sous-unités ParC et ParE, assure, quant à elle, la séparation des copies d'ADN circulaire double brin entre la cellule-mère et la cellule-fille après la réplication du chromosome ou des plasmides. La fixation des quinolones sur ces deux enzymes cible empêche la réplication et la transcription de l'ADN bactérien bloquant ainsi toute division cellulaire (LeVine *et al.* 1998¹¹³). Toutefois, *P. aeruginosa* est capable de s'adapter par des mutations à cette famille d'antibiotiques en surproduisant divers systèmes d'efflux actif, en diminuant l'affinité des cibles ou encore en réduisant la perméabilité membranaire (porines, LPS).

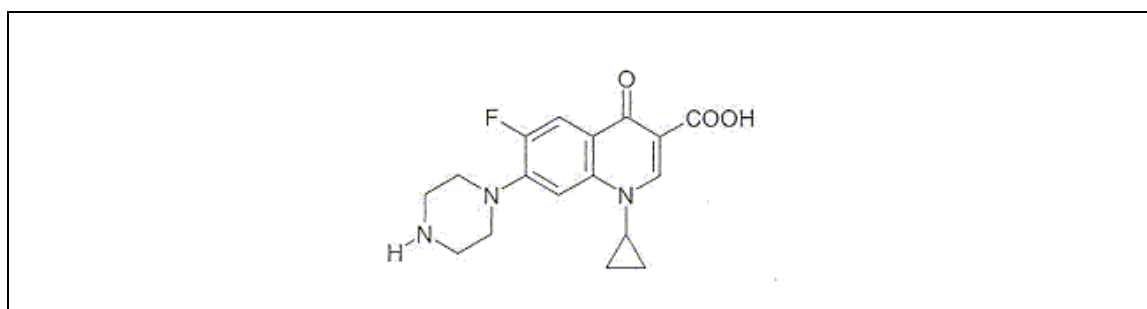


Figure 29. Structure d'une fluoroquinolone : la ciprofloxacine

a. Résistance par altération des cibles (QRDR)

Des mutations dans les *Quinolone Resistance-Determining Region* (QRDR) des gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et/ou *parE* affectent la liaison des fluoroquinolones sur leurs cibles (Yoshida *et al.* 1990²⁴⁵). Chez les souches cliniques résistantes de *P. aeruginosa*, l'altération des QRDR des sous-unités GyrB et ParC est peu fréquente (Hooper 2001⁸⁵). Elle conduit à une résistance modérée aux fluoroquinolones (CMI de la ciprofloxacine égale à 2 mg/L comparativement à la CMI de PAO1, 0,125 mg/L) (Mouneimne *et al.* 1999¹⁵⁸ ; Akasaka *et al.* 2001⁶). Plus communes, les mutations dans le gène *gyrA* sont responsables d'une augmentation plus forte des CMI de 1 à 64 mg/L (Akasaka *et al.* 2001⁶). Celles dans *parC* sont rares (Jalal and Wretlind 1998⁹³), toutefois l'association de mutations dans *gyrA* et *parC* conduit à de très hauts niveaux de résistance (CMI 128 mg/L) (Akasaka *et al.* 2001⁶) [tableau 8]. Chez les souches isolées de patients atteints de mucoviscidose, les mutations affectent essentiellement la sous-unité GyrA (Thr83 → Ile et Asp87 → Asn) et sont associées à des niveaux de résistance à la ciprofloxacine allant de 2 à 8 mg/L (Jalal *et al.* 2000⁹²).

Tableau 8. Mutations dans les sous-unités de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV.

Sous-unités	Mutations dans les QRDR*	Références
GyrA	Thr ₈₃ → Ile , Ala	(Mouneimne <i>et al.</i> 1999 ¹⁵⁸ ; Akasaka <i>et al.</i> 2001 ⁶)
	Asp ₈₇ → Tyr, Asn , Gly	
	Gly ₅₄ → Lys	
	Ala ₆₇ → Ser	
	Ser ₄₆₄ → Phe, Tyr	
GyrB	Glu ₄₆₆ → Asp	(Mouneimne <i>et al.</i> 1999 ¹⁵⁸ ; Akasaka <i>et al.</i> 2001 ⁶)
	Ala ₄₇₇ → Val	
	Thr ₄₇₃ → Met	
	Gln ₄₆₉ → Val	
	Gln ₄₅₉ → Gln	
ParC	Ser ₈₀ → Leu , Trp	(Mouneimne <i>et al.</i> 1999 ¹⁵⁸ ; Akasaka <i>et al.</i> 2001 ⁶)
	Glu ₈₄ → Lys	
	Leu ₉₅ → Gln	
	Ala ₈₈ → Pro	
	Asp ₄₂₀ → Asn	
ParE	Ala ₄₂₆ → Val	(Akasaka <i>et al.</i> 2001 ⁶)
	Ala ₄₇₃ → Val	
	Glu ₄₅₉ → Val	

*Les altérations les plus fréquentes figurent en caractère gras

b. Résistance par efflux actif

Systèmes d'efflux de la famille RND

Chez *P. aeruginosa*, plusieurs systèmes d'efflux actif sont capables de transporter les fluoroquinolones et d'engendrer une résistance modérée vis-à-vis de ces antibiotiques (CMI augmentées d'un facteur 2 à 8).

- Ainsi, le système d'efflux MexXY(OprM) peut s'opposer à l'accumulation intracellulaire de la ciprofloxacine, de l'ofloxacine, de l'énoxacine, de la norfloxacine. Mais son efficacité est faible vis-à-vis des 4-quinolones comme l'acide nalidixique (Masuda *et al.* 2000¹³⁹). Sa surproduction stable chez le mutant MutGr1 entraîne une augmentation d'un facteur 4 la CMI de la ciprofloxacine. Les souches CF surproduisant le système MexXY(OprM) ont, quant à elles, des valeurs de CMI comprises entre 0,25 et 4 mg/L (0,125 mg/L pour la souche de référence PAO1 (Vogne *et al.* 2004²²⁷)).
- Les systèmes MexCD-OprJ et MexEF-OprN peuvent aussi conférer une résistance aux fluoroquinolones lorsqu'ils sont surproduits constitutivement. Le système MexEF-OprN, réprimé chez les bactéries sauvages, ne participe pas à la résistance intrinsèque de *P. aeruginosa*. En revanche, il peut être surproduit sous l'effet de mutations dans les gènes régulateurs *mexS* et *mexT* (Köhler *et al.* 1999¹⁰⁵ ; Maseda *et al.* 2000¹³³ ; Sobel *et al.* 2005²¹⁰). Une étude réalisée par Jalal *et al.* a mis en évidence la surproduction de MexCD-OprJ ou MexEF-OprN chez des souches CF de *P. aeruginosa* résistantes à la ciprofloxacine (CMI comprises entre 0,5 et 2 mg/L) (Jalal *et al.* 2000⁹²). Chez certains isolats, une résistance de haut niveau (CMI de la ciprofloxacine de 8 mg/L) peut être atteinte lorsque la surproduction de ces deux systèmes est associée à des altérations dans GyrA (Jalal *et al.* 2000⁹²). D'autres systèmes d'efflux de la famille RND peuvent également exporter les fluoroquinolones tels que MexGHI-OmpD, MexPQ-OmpE et MexVW-OprM (Aendekerk *et al.* 2002¹ ; Li *et al.* 2003¹¹⁹ ; Mima *et al.* 2005¹⁴⁹). Toutefois à notre connaissance leur rôle dans la résistance des souches cliniques CF ou non-CF n'a pas été démontré à ce jour.

Autres systèmes d'efflux s'accommodant des fluoroquinolones

Chez *P. aeruginosa*, trois autres systèmes susceptibles de transporter les fluoroquinolones ont été décrits, à savoir PmpM, RifAB et Orf12 (Poole 2005¹⁷⁵). Toutefois, leur rôle dans la résistance des isolats cliniques n'est pas clair.

La protéine PmpM, codée par le gène *PA136*, appartient à la famille des transporteurs MATE. Comme les autres membres de cette famille, le transporteur PmpM utilise un antiport Na^+ /substrat pour l'efflux. Sa surproduction chez une souche préalablement délétée des systèmes RND augmente modestement (facteur 2) les CMI de la ciprofloxacine, de la norfloxacine et de l'ofloxacine (He *et al.* 2004⁷¹).

Le système RifAB qui appartient à la famille SMR et qui est codé par les gènes *PA1540* et *PA1541*, participe à la résistance naturelle à la ciprofloxacine. Ainsi, sa délétion chez un mutant obtenu en laboratoire s'accompagne d'une augmentation de la sensibilité à différents antibiotiques tels que l'amikacine, la streptomycine, le chloramphénicol et la ciprofloxacine (Daigle *et al.* 2007³³).

Enfin, le système Orf12-Orf11-Orf10 (famille des transporteurs ABC) codé par un support plasmidique (pRSB101) peut conférer une résistance à la norfloxacine chez certaines souches (Szczepanowski *et al.* 2004²¹⁵).

c. Résistance par modification de la perméabilité membranaire.

Modification des LPS

L'analyse de mutants résistants de *P. aeruginosa* obtenus par culture sur ciprofloxacine a révélé des modifications dans la composition de leur membrane externe notamment des altérations des LPS (Legakis *et al.* 1989¹¹¹). Par ailleurs, la fixation sur les molécules de LPS de résidus 4-amino-arabinose (*cf* II. 3 « Résistance à la colistine »), lors de la croissance en présence de polyamines (spermidine, putrescine...) peut conférer à *P. aeruginosa* une résistance de bas niveau aux fluoroquinolones (CMI augmentées d'un facteur 2 à 8) (Kwon and Lu 2006¹⁰⁹).

Altération des porines

Les travaux de Zhanel *et al.* visant à comparer des mutants résistants à la ciprofloxacine obtenus *in vitro* avec la souche de départ révèlent des modifications dans les protéines constituant la membrane externe. L'utilisation d'un anticorps dirigé contre la protéine OprF a permis de mettre en évidence la perte de cette porine chez les bactéries résistantes (Zhanel *et al.* 1995²⁵⁰).

III. Résistance instable « phénotypique »

Certains mécanismes de résistance ne dépendent pas de l'acquisition de matériel génétique exogène ou de la survenue de mutations mais davantage de l'influence de l'environnement dans lequel la bactérie se développe. La résistance qui en résulte, qualifiée de « phénotypique », présente un caractère instable qui permet à la bactérie de s'adapter temporairement à cet environnement.

1. Induction de la β -lactamase AmpC

La céphalosporinase naturelle AmpC peut être surproduite transitoirement en réponse à une exposition à des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques inducteurs tels que l'imipénème, la céfoxitine, l'ampicilline ou encore l'acide clavulanique **[figure 29]** (Livermore 1995¹²²). Ce phénomène répond à la nécessité pour la bactérie de recycler certains éléments du peptidoglycane tels que les 1,6-anhydromurapeptides (Normark 1995¹⁶⁷). Comme nous avons pu le voir précédemment (*II. 1. a « Production de la céphalosporinase AmpC »*), ces molécules constituent des inducteurs capables de transformer le répresseur AmpR en activateur transcriptionnel. La production de l'enzyme AmpC peut être activée, aussi bien chez des mutants obtenus en laboratoire (Langaee *et al.* 2000¹¹⁰) que chez des isolats cliniques (Campbell *et al.* 1997²³ ; Bagge *et al.* 2002⁹ ; Juan *et al.* 2005⁹⁹). On distingue différents phénotypes selon le niveau et l'inductibilité de la production de l'enzyme AmpC **[tableau 9]** (Campbell *et al.* 1997²³) :

- Chez certaines souches, l'enzyme est produite à un niveau basal relativement faible qui reste inductible.
- Le second phénotype regroupe les souches dont la production basale est modérée mais hyper-inductible au vu de la forte augmentation potentielle de l'activité enzymatique.
- Enfin, chez d'autres souches, l'enzyme AmpC est produite à un niveau basal très élevé. L'exposition à un antibiotique inducteur n'a que peu d'effet sur l'activité céphalosporinase.

La majorité des isolats CF présente une production basale modérée et une hyper-inductibilité (Campbell *et al.* 1997²³). Toutefois, la cinétique d'hydrolyse n'est pas le reflet direct de l'activité enzymatique. En effet, l'efficacité de AmpC dépend, à la fois, de la perméabilité de la membrane externe et de l'efflux des molécules d'antibiotiques (Jacoby 2009⁹¹).

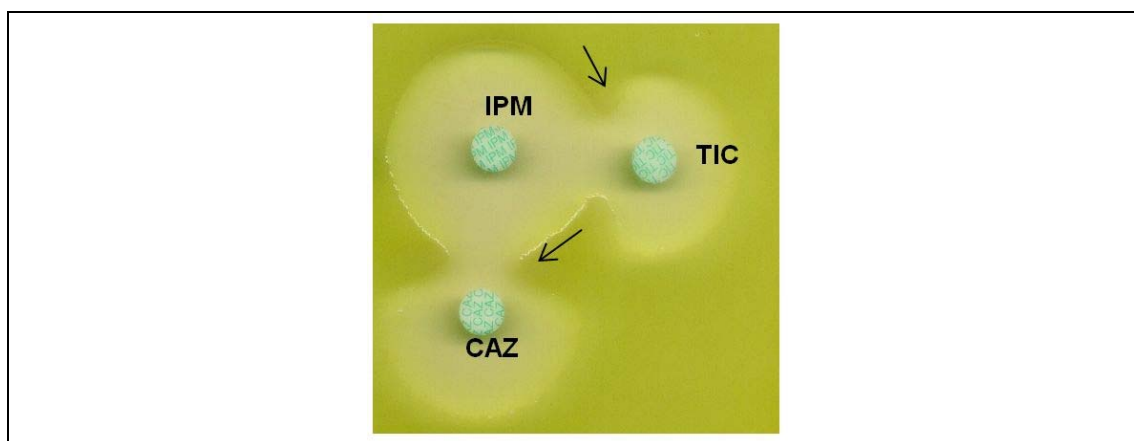


Figure 30. Inductibilité de la céphalosporinase AmpC chez la souche sauvage PAO1

L'inductibilité de la production de la céphalosporinase AmpC, détectable par la méthode de diffusion en milieu gélosé, se traduit par un antagonisme entre l'antibiotique inducteur, comme l'imipénème (IPM) et les antibiotiques substrats de AmpC comme la ticarcilline (TIC) et la ceftazidime (CAZ).

Tableau 9. Activité céphalosporinase, basale et induite, chez 7 isolats CF (Campbell *et al.* 1997²³).

Phénotypes	Souches	Activité céphalosporinase (mU)*	
		basale	induite
Production basale faible, inductible			
	PAO1	20	850
	176-8	10	380
Production basale modérée, hyper-inductible			
	238	160	5540
	237	240	3420
	94	590	4650
Production basale élevée, constitutive			
	176-9	5260	5350
	258	8430	9150
	397	5580	8670

* L'activité enzymatique est mesurée par spectrophotométrie à 482 nm et définie comme suit : 1 mU équivaut à 1 nmol de nitrocéfine hydrolysée par minute et par mg de protéine

2. La résistance adaptative aux aminosides

a. Définition

La résistance adaptative correspond à un état transitoire et réversible au cours duquel une bactérie, précédemment exposée à un aminoside, devient insensible à cet antibiotique (Daikos *et al.* 1990³⁴). Diverses études montrent que, *in vitro*, l'exposition de *P. aeruginosa* à une concentration d'aminoside correspondant à une fraction ou à un multiple de la CMI durant quelques heures induit un état réfractaire pouvant persister jusqu'à 48 h, au cours duquel la résistance aux aminosides est significativement augmentée (Daikos *et al.* 1990³⁴ ; Karlowsky *et al.* 1996¹⁰³). La durée de l'exposition initiale ainsi que la concentration d'aminosides conditionnent toutefois l'intensité et la durée de la phase d'insensibilité à cette famille d'antibiotiques (Barclay *et al.* 1996¹³). Le mécanisme particulier de la résistance adaptative, diminue l'efficacité thérapeutique de ces molécules. Il ne résulterait pas de la sélection de mutants mais davantage de l'émergence d'une sous-population de variants chez lesquels l'expression de certains gènes est induite (Karlowsky *et al.* 1996¹⁰³). Ainsi, lors de la période réfractaire on observe (i) une diminution de l'accumulation intracellulaire d'aminosides résultant d'un défaut de pénétration (Karlowsky *et al.* 1996¹⁰³) et d'une augmentation de l'efflux vers le milieu extérieur (Hocquet *et al.* 2003⁷⁹), (ii) une modification de la composition en protéines de la membrane cytoplasmique (Karlowsky *et al.* 1996¹⁰³) vraisemblablement liée à la surproduction de systèmes d'efflux actif (Hocquet *et al.* 2003⁷⁹) et (iii) la surexpression de certains gènes impliqués dans le métabolisme anaérobie de la bactérie (Karlowsky *et al.* 1997¹⁰²).

b. Induction du système MexXY

La caractérisation du système d'efflux actif MexXY(OprM) (Aires *et al.* 1999²) et son expression inductible par les antibiotiques (Masuda *et al.* 2000¹³⁹) ont permis d'envisager son intervention dans le phénomène de résistance adaptative. L'étude de la souche de référence PAO1 ainsi que de mutants MexXY⁻ (souche 11B) et OprM⁻ (souche PAO1T) a montré que la résistance adaptative induite par la gentamicine était corrélée à la surproduction des protéines MexX et MexY. Par ailleurs, il est apparu que le mécanisme nécessitait la production de la protéine OprM pour former un système d'efflux fonctionnel. Cette protéine codée par l'opéron *mexAB-oprM* n'est, quant à elle,

pas surproduite durant la résistance adaptative (Hocquet *et al.* 2003⁷⁹). La surproduction des protéines MexX et MexY est dépendante des conditions d'exposition à l'antibiotique. Ainsi, la production apparaît maximale après une exposition de 2 h à une dose de 1,6 mg/L de gentamicine et diminue à partir de 4 h d'exposition (Hocquet *et al.* 2003⁷⁹). Le mécanisme de résistance adaptative met donc en jeu une synthèse *de novo* des protéines MexX et MexY et l'induit l'expression de l'opéron *mexXY*.

Des travaux récents ont montré que l'expression de l'opéron *mexXY* est induite lorsque la synthèse protéique est perturbée, soit par des mutations affectant les protéines ribosomales L1 ou L25 (El'Garch *et al.* 2007⁴⁴), soit par des antibiotiques tels que le chloramphénicol, la tétracycline, la gentamicine, ou encore la tobramycine (Jeannot *et al.* 2005⁹⁵). Le mécanisme de cette induction est toutefois indirect car les antibiotiques inducteurs ne se fixent pas sur le répresseur de l'opéron MexZ (Matsuo *et al.* 2004¹⁴¹). Le système d'efflux actif MexXY étant surproduit lorsque la synthèse protéique est perturbée, Morita *et al.* ont envisagé l'hypothèse selon laquelle les véritables molécules inductrices seraient les di- et tri-peptides toxiques produits par la cellule lors de la dégradation des protéines aberrantes (Morita *et al.* 2006¹⁵⁶). Ces données suggèrent, d'une part, l'existence d'un lien fonctionnel entre le ribosome et le système d'efflux actif MexXY et, d'autre part, un rôle physiologique de l'efflux actif associé au blocage de la traduction. L'induction de l'expression de l'opéron *mexXY* par le chloramphénicol, molécule non-substrat de ce système, conforte cette dernière hypothèse (Jeannot *et al.* 2005⁹⁵). Un des liens fonctionnels entre le ribosome et MexXY pourrait être la protéine PA5471. En effet, chez la souche sauvage PAO1, l'induction de l'expression de *mexXY* nécessite la présence du gène *PA5471* dont l'expression augmente parallèlement à celle de *mexY* en présence d'antibiotiques (Morita *et al.* 2006¹⁵⁶). Récemment, Islam *et al.* ont mis en évidence un phénomène similaire chez des isolats CF résistants aux aminosides surproduisant le système d'efflux actif MexXY (Islam *et al.* 2009⁹⁰). Cependant, l'inactivation du locus *PA5471* n'affectant, ni le niveau de production de MexXY, ni les niveaux de résistance chez un mutant *agrZ*, on peut penser que le produit du gène *PA5471*, module indirectement l'activité du répresseur MexZ (Morita *et al.* 2006¹⁵⁶). Le mécanisme de régulation de l'expression de l'opéron *mexXY* fait actuellement l'objet d'études au sein du laboratoire de Bactériologie (travaux de Katy Jeannot).

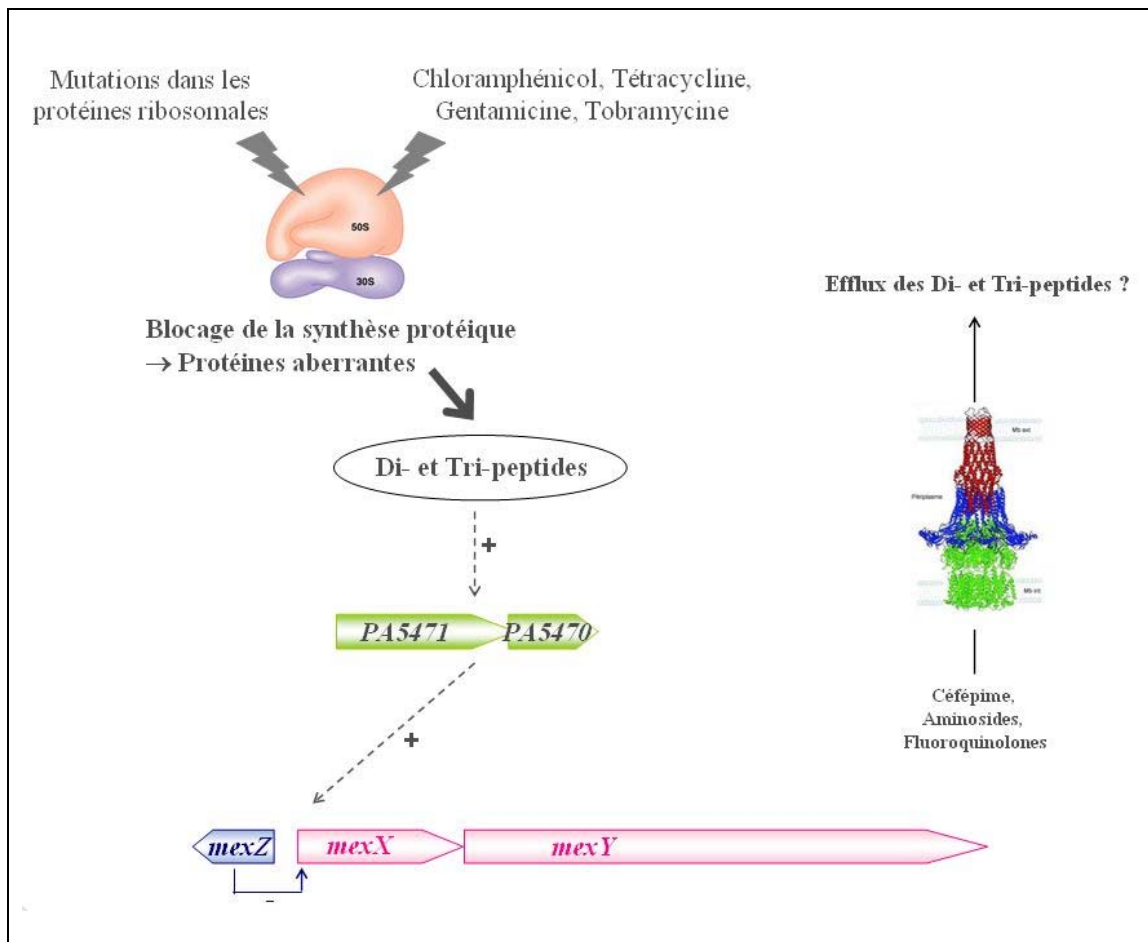


Figure 31. Représentation schématique de la régulation de l'expression de l'opéron *mexXY* chez la souche PAO1.

Les molécules de di- ou tri-peptides qui résultent de la dégradation des protéines aberrantes suite à la perturbation de la synthèse protéique constitueraient des molécules inductrices de l'expression *mexXY*. Le système d'efflux actif MexXY (OprM) serait alors chargé d'exporter ces molécules toxiques vers le milieu extracellulaire.

L'induction de l'expression de *mexXY* passe de façon indirecte par l'opéron *PA5470-PA5471* ; le mécanisme exact reste toutefois inconnu à ce jour.

c. Induction de la respiration anaérobie

Au cours de la résistance adaptative, on peut observer la surexpression de certains gènes de la voie respiratoire anaérobie (Karlowisky *et al.* 1996¹⁰³). Bien que *P. aeruginosa* soit décrit comme un organisme aérobie strict, il est capable de se développer en anaérobiose en présence de nitrates, nitrites ou arginine comme accepteur final d'électrons (Zannoni 1989²⁴⁷). L'activation des voies anaérobies du métabolisme énergétique implique l'expression de nombreux gènes (*nir*, *nor*, *nar*...) codant différentes enzymes impliquées dans la réduction des nitrates (Hassett *et al.* 2002⁶⁸). Le gène *nirS*, qui code une nitrite réductase responsable de la conversion des nitrites (NO_2^-)

en monoxyde d'azote (NO) ainsi que le gène *anr* qui détermine un régulateur global impliqué dans la survie de la bactérie en anaérobiose sont surexprimés au cours de la résistance adaptative (Karlowsky *et al.* 1997¹⁰²). Or, la conversion vers la voie anaérobie a un impact sur l'accumulation intracellulaire des aminosides. En effet, le franchissement de la membrane cytoplasmique par ces antibiotiques nécessite une interaction électrostatique transitoire avec les groupements électronégatifs des phospholipides, puis un transport actif en deux phases (EDP-I et EDP-II, pour *Energy-Dependent Phase I/II*). La première étape, dont la vitesse est proportionnelle à la concentration de l'antibiotique, dépend surtout de la composante $\Delta\Psi$ de la force proton-motrice. La seconde, qui correspond à l'entrée massive et rapide d'aminoside dans la cellule résulterait de la formation de « brèches » dans la membrane cytoplasmique par des peptides aberrants. Pendant la résistance adaptative l'induction des voies de respiration anaérobies tend à diminuer la force proton-motrice et à ralentir l'accumulation intracellulaire des aminosides (Taber *et al.* 1987²¹⁷).

d. Pertinence *in vivo*

La faible concentration en oxygène régnant au sein du biofilm et la présence de nitrates dans l'environnement pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose reproduisent des conditions de développement en anaérobiose ou en microaérophilie (Hassett *et al.* 2002⁶⁸ ; Walters *et al.* 2003²³⁰). Décrite dans un premier temps *in vitro*, la résistance adaptative est également observée *in vivo* dans des modèles expérimentaux d'infection chez le rat et la souris ; elle entraîne une diminution de l'activité bactéricide des aminosides (Daikos *et al.* 1991³⁵ ; Xiong *et al.* 1997²³⁹). Une étude réalisée par Barclay *et al.* chez 7 patients atteints de mucoviscidose révèle que les populations pulmonaires de *P. aeruginosa* sont capables d'utiliser ce mode de résistance en réponse à l'exposition à un aminoside. En effet, chez les patients n'ayant pas reçu de cure récente d'antibiotiques (n=3), une résistance adaptative modérée est détectée entre 1 h et 4 h après une nébulisation de 80 mg de tobramycine et qui persiste 24 h avant un retour au phénotype sauvage (Barclay *et al.* 1996¹³). Cette résistance transitoire peut poser problème lors du diagnostic bactériologique car elle est indétectable une fois les bactéries cultivées au laboratoire (Karlowsky *et al.* 1996¹⁰³). En revanche, chez les patients traités quotidiennement par deux aérosols de tobramycine (n=4), la résistance adaptative est détectée avant même l'inhalation de la dose de 80 mg d'antibiotique

(Barclay *et al.* 1996¹³). Ce mécanisme de résistance transitoire constitue un argument majeur en faveur de l'administration unique journalière d'aminoside (Barclay and Begg 2001¹²).

3. Environnement pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose

Chez les patients atteints de mucoviscidose, *P. aeruginosa* adopte un mode de vie en biofilm ou se développe sous la forme de micro-colonies. Ce mode de vie confère à *P. aeruginosa* un micro-environnement protecteur vis-à-vis des antibiotiques lui permettant ainsi de persister malgré les traitements itératifs (Govan and Deretic 1996⁵⁸). Des travaux récents suggèrent que la formation de ce biofilm serait favorisée par la quantité et la composition du mucus qui tapisse les voies aériennes de ces patients (Moreau-Marquis *et al.* 2008¹⁵³).

a. Le mucus bronchique

L'environnement pulmonaire des patients CF est caractérisé par la production de quantités importantes de mucus qui obstruent les voies aériennes (Gibson *et al.* 2003⁵¹). Ce mucus, majoritairement composé de protéines hautement glycosylées appelées mucines, de lipides, d'acides aminés, d'ions et d'ADN constitue un environnement favorable au développement bactérien. Différentes études ont mis en évidence une corrélation entre la composition du mucus bronchique et l'évolution phénotypique de *P. aeruginosa* lors de la colonisation pulmonaire (Hassett *et al.* 2002⁶⁸ ; Sriramulu *et al.* 2005²¹²).

Chez les patients atteints de pathologie pulmonaire inflammatoire, l'air expiré contient du monoxyde d'azote (NO), agent antimicrobien majoritairement produit par les cellules neutrophiles. Chez les patients atteints de mucoviscidose, les faibles quantités de NO présentes dans l'air expiré pourraient indiquer une consommation de cet accepteur final d'électrons par un mode de vie anaérobie de *P. aeruginosa* (Hassett *et al.* 2002⁶⁸). Par ailleurs, le développement de micro-colonies de *P. aeruginosa*, phénotype retrouvé dans le contexte de la mucoviscidose, a été obtenu dans un milieu artificiel contenant des mucines porcines, des sels (NaCl, KCl) et des acides aminés

[figure 32 A] (Sriramulu *et al.* 2005²¹²). Dans ce milieu, l'apparition du caractère mucoïde, de pigments ou encore de variants de petite taille est favorisée, confortant l'hypothèse selon laquelle le mucus bronchique favorise la diversification phénotypique des souches de *P. aeruginosa* [figure 32 B] (Sriramulu *et al.* 2005²¹²).

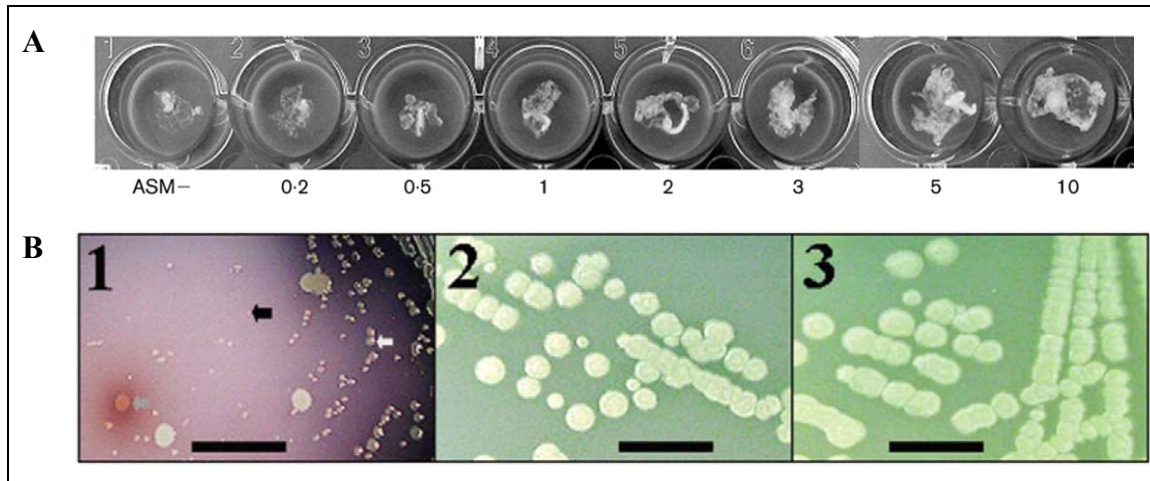


Figure 32. Culture de souches de *P. aeruginosa* dans un milieu artificiel reproduisant le mucus bronchique (Sriramulu *et al.* 2005²¹²).

(A) **Formation de micro-colonies de *P. aeruginosa*.** Chaque cupule contient une concentration croissante d'acides aminés comprise entre 0,2 et 10 mg/mL. La cupule ASM⁻ ne contient pas d'acides aminés.

(B) **Diversification des colonies *P. aeruginosa*.** Après 45 jours de culture sur milieu ASM⁺ (1) en comparaison à une culture réalisée sur milieu ASM⁻ (2) ou sur milieu TSB (3). La culture sur milieu ASM⁺ entraîne l'apparition de colonies naines (flèche noire), pigmentées (flèche grise) ou encore muqueuses (flèche blanche).

ASM, *Artificial Sputum Medium* ; TSB, *Tryptone Soy Broth*.

b. Développement sous forme de biofilm

Structure et formation du biofilm

Les biofilms formés par *P. aeruginosa* sont constitués d'une population bactérienne dense, adhérent à une surface solide et entourée d'une matrice extracellulaire de nature polysaccharidique contenant du glucose, du rhamnose et du mannose (Drenkard 2003⁴⁰). L'alginate, polymère d'acide D-mannuronique et d'acide L-guluronique, a longtemps été considéré comme l'élément de base de cette matrice polysaccharidique. Il a été établi qu'il n'est, toutefois, pas indispensable au développement d'un biofilm chez la souche PAO1 (Wozniak *et al.* 2003²³⁸). En revanche, l'alginate est surproduit lorsque le biofilm est exposé à l'imipénème. L'augmentation du volume de la matrice extracellulaire qui en résulte altère d'autant plus la fonction respiratoire (Bagge *et al.*

2004¹⁰). La formation de biofilm *in vitro* s'effectue en plusieurs étapes [figure 33] (Sauer 2003¹⁹⁵) :

- Une phase d'attachement initial de la bactérie sur un support solide. Cette fixation, polaire et réversible, fait intervenir les flagelles, les fimbriae et les pili de type IV.
- Une phase d'adhésion irréversible avec perte du flagelle et synthèse d'une matrice exopolysaccharidique. A ce stade, la structure est monocouche.
- Une 1ère phase de maturation durant laquelle on observe une stratification de la structure grâce à la production d'adhésines permettant des interactions cellules/cellules.
- Une seconde phase de maturation au cours de laquelle le biofilm adopte une structure complexe en forme de champignon.
- Enfin, lorsque la source de carbone diminue, les bactéries présentes à la surface de la structure vont se disperser. Cette étape, qui est rendue possible grâce à la production de nouveaux flagelles, permet aux bactéries de coloniser d'autres milieux (Sauer *et al.* 2004¹⁹⁶).

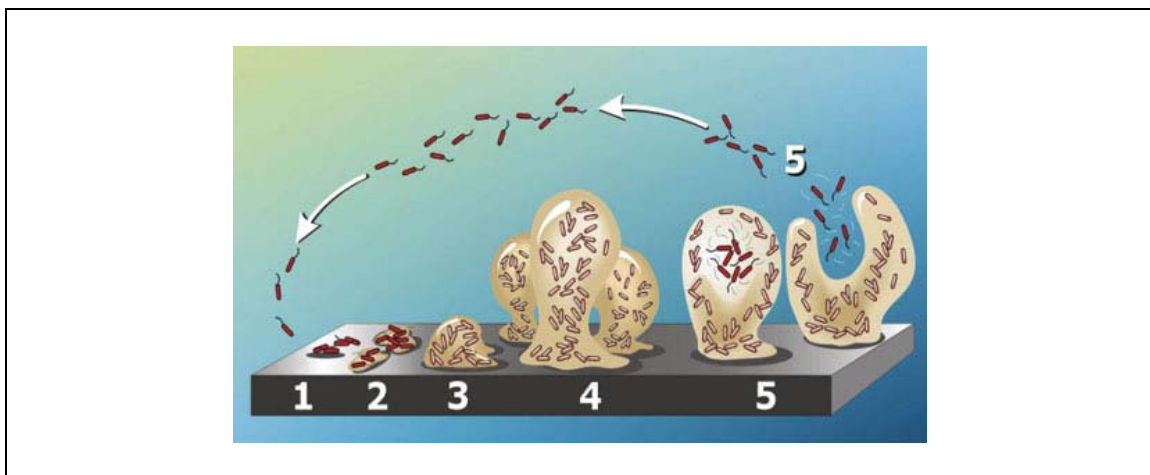


Figure 33. Représentation schématique de la formation de biofilm (Sauer 2003¹⁹⁵)

- (1) phase d'attachement initial ;
- (2) phase d'adhésion irréversible bactérie/surface, structure monocouche ;
- (3) 1^{ère} phase de maturation, structure stratifiée, taille 10µm ;
- (4) seconde phase de maturation, structure « champignon » (100µm) ;
- (5) phase de dispersion.

Induction de la formation de biofilm

La formation de biofilm chez *P. aeruginosa* peut être induite lorsque la bactérie est exposée à des aminosides, antibiotiques largement utilisés chez les patients atteints de mucoviscidose (Hoffman *et al.* 2005⁸⁰). Une étude réalisée par Hoffmann *et al.* a mis en évidence que la tobramycine, la gentamicine, l'amikacine et la streptomycine peuvent induire la formation de biofilm sans pour autant affecter la croissance bactérienne. L'induction est optimale lorsque les bactéries sont exposées à des concentrations subinhibitrices de tobramycine, l'effet maximal étant observé pour une concentration de 0,3 mg/L, soit 1/3 de la CMI (Hoffman *et al.* 2005⁸⁰) [figure 34]. Ce phénomène n'implique pas une production accrue d'exopolysaccharides constituant la matrice extracellulaire mais entraîne une augmentation de la biomasse bactérienne. L'analyse de mutants insertionnels a révélé que la formation de biofilm n'était plus inductible lorsque le gène PA2818 était inactivé. Ce gène, nommé *arr* (*aminoglycoside response regulator*), serait nécessaire pour la formation de biofilm en réponse à une exposition à la tobramycine. Il code une phosphodiesterase localisée sur la membrane cytoplasmique de la cellule bactérienne. La protéine Arr possède un domaine senseur situé dans le périplasme et un domaine EAL (motif Glutamine, Alanine, Leucine) transducteur du signal côté cytoplasmique (Hoffman *et al.* 2005⁸⁰). L'activité phosphodiesterase portée par le domaine EAL régule négativement la quantité intracellulaire de di-GMPc (di-guanosyl-monophosphate cyclique) dont la diminution a pu être corrélée, *in vitro*, à une augmentation de la formation de biofilm (Hoffman *et al.* 2005⁸⁰). Ainsi, les aminosides, en agissant comme premiers messagers, pourraient induire la formation de biofilm en activant la phosphodiesterase de la protéine Arr, par liaison directe ou indirecte. Cette induction diminuerait la concentration cellulaire de di-GMPc, ce qui activerait la formation de biofilm (Hoffman *et al.* 2005⁸⁰).

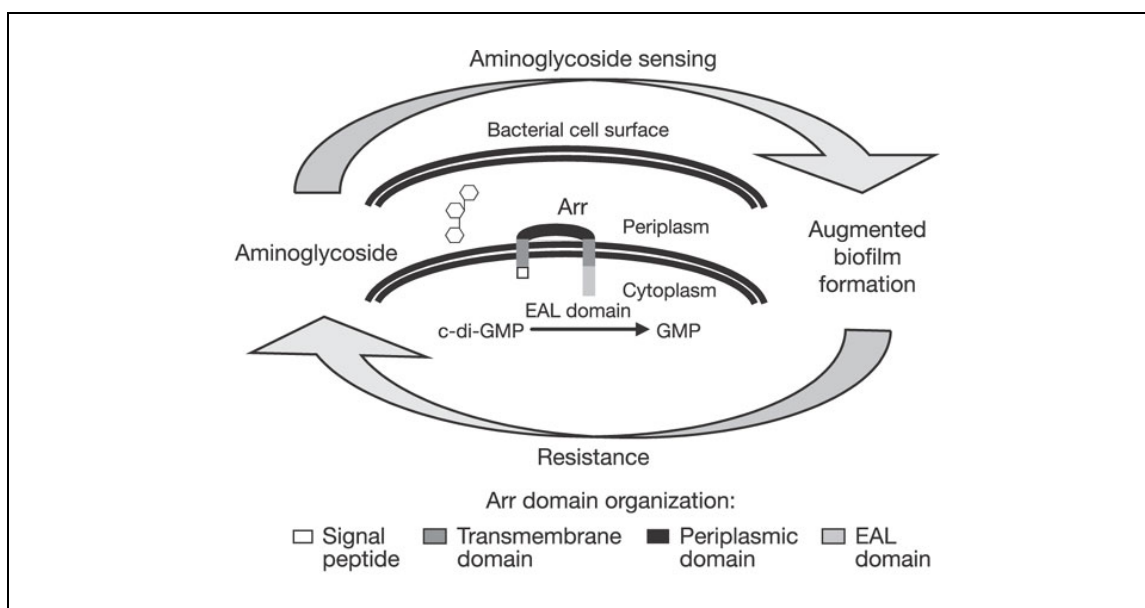


Figure 34. Modèle d'induction de la formation de biofilm par les aminosides (Hoffman *et al.* 2005⁸⁰)

Les aminosides (représentés par la structure à 3 cycles) activent la protéine Arr. Le domaine EAL cytoplasmique de cette protéine portant l'activité phosphodiesterase transforme le di-GMPc en GMP. La réduction du taux intracellulaire de di-GMPc entraîne la formation de biofilm.

4. Résistance aux antibiotiques inhérente au mode de vie en biofilm

Il est maintenant bien établi qu'un développement sous forme de biofilm entraîne la formation d'un micro-environnement protecteur conférant à la bactérie une résistance accrue aux cellules phagocytaires de l'hôte ainsi qu'à différentes classes d'antibiotiques tels que les aminosides, les β -lactamines et les fluoroquinolones (Nickel *et al.* 1985¹⁶⁵ ; Govan and Deretic 1996⁵⁸ ; Drenkard 2003⁴⁰). Par exemple, des niveaux de résistance à la tobramycine jusqu'à 1000 fois supérieurs ont été décrits chez des bactéries vivant en biofilm comparativement à d'autres vivant à l'état planctonique (Nickel *et al.* 1985¹⁶⁵). Les mécanismes impliqués dans cette résistance sont multiples ; ils peuvent être inhérents à la barrière physicochimique que constitue le biofilm mais peuvent également résulter des conditions physiologiques particulières qu'adoptent les bactéries en biofilm.

a. Micro-environnement protecteur conféré par le biofilm

La matrice exopolysaccharidique retrouvée dans la structure du biofilm constitue une véritable barrière limitant, à la fois, la diffusion de l'oxygène et des nutriments mais, également, la diffusion des antibiotiques (Walters *et al.* 2003²³⁰). La croissance sous forme de biofilm permet la création de micro-niches dans lesquelles *P. aeruginosa* s'adapte métaboliquement (Gillham *et al.* 2009⁵²). Lorsque le biofilm atteint la seconde phase de maturation, il forme des structures complexes au sein desquelles les quantités de nutriments et d'oxygène peuvent varier. Un modèle artificiel de biofilm, réalisé dans des tubes capillaires, a pu mettre en évidence que l'oxygène ne diffuse que dans la partie superficielle du biofilm (Werner *et al.* 2004²³²). Ainsi, il a été montré que l'oxygène ne pénètre qu'à une profondeur de 50 à 90 µm (pour une structure de 250 µm), créant alors un gradient d'oxygène. Les cellules situées en surface s'orienteront vers un métabolisme aérobie et seront dans une phase "active" de croissance alors que les bactéries situées en profondeur devront adopter un métabolisme anaérobie. Par ailleurs, la diffusion limitée des nutriments dans les zones plus profondes du biofilm entraîne un ralentissement de la croissance comme celui observé au cours de la phase stationnaire (Walters *et al.* 2003²³⁰).

Outre la diffusion limitée des nutriments et de l'oxygène, la matrice exopolysaccharidique s'oppose également à la pénétration des antibiotiques. La nature anionique de cette matrice séquestrerait les antibiotiques chargés positivement tels que les aminosides, limitant leur pénétration et leur diffusion et diminuant leur pouvoir bactéricide (Govan and Deretic 1996⁵⁸ ; Shigeta *et al.* 1997²⁰⁵ ; Walters *et al.* 2003²³⁰). Après pénétration, les antibiotiques n'exercent leur activité que sur une zone de 30 à 80 µm d'épaisseur, située en surface de la structure, et au niveau de laquelle il y a de l'oxygène (Walters *et al.* 2003²³⁰). La résistance aux antibiotiques pourrait donc s'expliquer par une diffusion limitée au sein de la biomasse et par le mode de vie qu'impose le biofilm, à savoir une croissance lente et un métabolisme microaérophile, voire anaérobie, notamment au centre de la structure où la tension en oxygène est très faible (Walters *et al.* 2003²³⁰ ; Borriello *et al.* 2004¹⁹).

La biodisponibilité restreinte des aminosides ne peut expliquer cependant à elle seule la résistance élevée associée à ce mode de vie (Drenkard 2003⁴⁰). Plus récemment, une

nouvelle explication a été avancée avec l'identification du gène *ndvB* (Mah *et al.* 2003¹²⁸). Ce gène, uniquement exprimé chez les bactéries vivant sous forme de biofilm, code une glycosyl-transférase impliquée dans la production de polymères cycliques de glucose (β -(1,3)-glucanes cycliques). Accumulés dans l'espace périplasmique ou libérés dans le milieu extracellulaire, ces glycanes cycliques limitent la pénétration intracellulaire des molécules d'antibiotiques en les séquestrant. A l'inverse, le biofilm formé par un mutant *ndvB*⁻ devient 8 à 16 fois plus sensible à la tobramycine et à la gentamicine que celui formé par la souche parentale (Mah *et al.* 2003¹²⁸). Enfin, des études comparatives entre les modes de « biofilm » et « planctonique » montrent que chez les bactéries adhérentes, la présence de la matrice exopolysaccharidique joue un rôle de barrière qui s'oppose non seulement à la pénétration de la tobramycine mais également à celle de la ciprofloxacine dont la diffusion est pourtant plus rapide dans le biofilm (Shigeta *et al.* 1997²⁰⁵).

b. Analyses transcriptionnelles globales

Les modifications physiologiques subies par les bactéries vivant en biofilm entraînent d'importantes variations de l'expression génique (Whiteley *et al.* 2001²³⁴ ; Mah *et al.* 2003¹²⁸). L'analyse transcriptomique révèle, tout d'abord, une modification de l'expression de certains gènes impliqués dans la résistance aux aminosides *via* des mécanismes d'imperméabilité membranaire comme, par exemple, celui médié par le gène *tolA*. La surexpression de *tolA* affecte la structure des LPS et provoque une diminution de l'affinité des aminosides pour la membrane externe [tableau 10] (Whiteley *et al.* 2001²³⁴). A l'inverse, un mutant *tolA*⁻ se révèle hypersensible à la gentamicine en raison d'une fixation accrue de l'antibiotique sur le LPS (Rivera *et al.* 1988¹⁸⁷). Par ailleurs, l'expression réduite des gènes codant les sous-unités de la cytochrome *c* oxydase, accepteur terminal d'électrons dans le métabolisme aérobie, tend à réduire le transport actif des aminosides à travers la membrane cytoplasmique (Taber *et al.* 1987²¹⁷ ; Whiteley *et al.* 2001²³⁴). Des mécanismes de régulation globale peuvent être activés ou réprimés lorsque la bactérie vit en biofilm. Ainsi, un mutant invalidé dans le gène *rpoS* produit d'avantage de biofilm et résiste d'avantage à l'effet bactéricide de la tobramycine comparativement à la souche sauvage parentale PAO1. Confirmant cette observation, l'analyse par microarray met en évidence que le gène *rpoS* est sous-exprimé lors de la croissance en biofilm (Whiteley *et al.* 2001²³⁴).

Enfin, Witheley *et al.* ont mis en évidence que l'expression de certains gènes chez des bactéries se développant sous forme de biofilm pouvait varier suite à une exposition à la tobramycine (Whiteley *et al.* 2001²³⁴). L'analyse transriptomique réalisée par cette équipe révèle que 14 gènes sont surexprimés et 6 réprimés chez les souches ayant subi un traitement avec cet antibiotique [**tableau 11**]. La plupart de ces gènes code des protéines dont les fonctions ne sont pas connues. On compte parmi les gènes connus induits par la tobramycine *PA4386* et *PA4761* (impliqués dans la réponse au stress) ainsi que *PA3920* et *PA1541* (systèmes d'efflux putatifs) (Whiteley *et al.* 2001²³⁴). Le gène *PA1541* code une protéine apparentée à la protéine EmrE de *E. coli*, appartenant à la famille des transporteurs SMR (*Small Multidrug Resistance*). Les membres de cette famille sont capables d'exporter vers le milieu extérieur les antibiotiques cationiques (Yerushalmi *et al.* 1995²⁴¹). Récemment identifié chez *P. aeruginosa*, le système RifAB, codé par l'opéron *PA1540-PA1541*, est capable d'exporter vers le milieu extracellulaire une large variété d'antibiotiques parmi lesquels figurent la ciprofloxacine et l'amikacine (Daigle *et al.* 2007³³). Le système d'efflux actif MexXY(OprM) ne semble pas, quant à lui, impliqué dans la résistance du biofilm aux aminosides (de Kievit and Lam 1997³⁶).

Tableau 10. Gènes de *P. aeruginosa* dont l'expression varie lorsque la bactérie est cultivée en biofilm (Whiteley et al. 2001²³⁴).

<i>P. aeruginosa</i> ORF	Number	Fold activation*
Motility and attachement		
Probable fimbrial protein	PA2128	-16.5 ±1.5
Pilin protein PilA	PA4525	-6.6 ±0.8
Flagellar basal-body rod modification protein FlgD	PA1079	-2.7 ±0.3
Probable pili assembly chaperonne	PA2129	-2.4 ±0.2
Flagellin type B	PA 1092	-2.3 ±0.3
Flagellar capping protein FliD	PA 1094	-2.1 ±0.3
Flagellar hook protein FlgE	PA1080	-2.0 ±0.1
Metabolism		
Urease β subunit	PA4867	63.1 ±8.1
Ferredoxin (4Fe-4S)	PA0362	2.9 ±0.3
Lipoate protein ligase B	PA3997	2.8 ±0.4
Glycerol-3-phosphate deshydrogenase	PA3584	-4.1 ±0.3
Cytochrome <i>c</i> oxidase, subunit III	PA0108	-2.9 ±0.3
Cytochrome <i>c</i> oxidase, subunit II	PA0105	-2.9 ±0.2
Cytochrome <i>c</i> oxidase, subunit I	PA0106	-2.7 ±0.2
Leucine dehydrogenase	PA3418	-2.5 ±0.2
Membrane protein or secretion		
Translocation protein TatB	PA5069	6.9 ±1.4
TolA protein	PA0971	3.9 ±0.4
Translocation protein Tata	PA5068	2.4 ±0.2
Outer membrane lipoprotein OmlA	PA4765	2.4 ±0.7
Probable porin	PA3038	-3.5 ±0.5
Type III secretion central regulator	PA1710	-2.5 ±0.3
Probable sodium solute transpoter	PA3234	-2.3 ±0.1
Regulation		
Probable transcriptional regulator	PA2547	3.1 ±0.1
σ-factor RpoH	PA0376	2.3 ±0.3
σ-factor RpoS	PA3622	-2.3 ±0.3
Probable two-component response regulator	PA4296	-2.2 ±0.2

* les valeurs positives représentent une expression accrue du gène dans le biofilm alors que les valeurs négatives correspondent aux gènes réprimés.

Tableau 11. Gènes de *P. aeruginosa* dont l'expression varie lorsque le biofilm est exposé à la tobramycine (Whiteley *et al.* 2001²³⁴).

<i>P. aeruginosa</i> ORF	Number	Fold activation*
Ribosome modulation factor	PA3049	24.7 ±11.4
Hypothetical protein	PA4326	23.2 ±7.5
Hypothetical protein	PA2703	19.3 ±3.7
Probable DNA-binding protein	PA5348	18.1 ±4.9
Hypothetical protein	PA1110	8.7 ±1.7
Conserved hypothetical protein	PA3463	8.3 ±3.2
GroES (heat choc protein)	PA4386	5.8 ±1.1
Conserved hypothetical protein	PA3785	5.0 ±1.3
Probable drug-efflux protein	PA1541	4.7 ±1.4
Probable metal-transporting P-Type ATPase	PA3920	3.6 ±1.1
Probable transcriptional regulator	PA3574	3.3 ±0.6
Conserved hypothetical protein	PA2498	2.9 ±0.6
DnaK (chaperon protein)	PA4761	2.7 ±0.4
Conserved hypothetical protein	PA3819	2.1 ±0.3
Hypothetical protein	PA1893	-2.4 ±0.3
Hypothetical protein of bacteriophage Pf1	PA0725	-3.1 ±0.5
Urease β subunit	PA4867	-3.7 ±1.1
Hypothetical protein of bacteriophage Pf1	PA0721	-3.9 ±1.0
Hypothetical protein	PA1870	-6.4 ±1.5
Hypothetical protein	PA3884	-14.7 ±5.7

* les valeurs positives représentent une expression accrue du gène après exposition à la tobramycine alors que les valeurs négatives correspondent aux gènes réprimés.

5. Small-colony variants (SCV)

Outre la transition d'un phénotype non-mucoïde à mucoïde et la capacité à se développer en biofilm, il apparaît que certaines souches CF de *P. aeruginosa* sont capables de former des colonies « naines » (Haussler *et al.* 1999⁷⁰). Une étude réalisée sur une cohorte de 84 patients atteints de mucoviscidose a révélé la faible prévalence de ce phénotype : moins de 10 % des patients étudiés étaient colonisés par ces variants à petites colonies, appelés SCV (*Small Colony Variant*) (Schneider *et al.* 2008¹⁹⁸). L'émergence de ces variants a pu être corrélée à l'administration de tobramycine par voie inhalée (Haussler *et al.* 1999⁷⁰ ; Drenkard and Ausubel 2002⁴¹) mais, à ce jour, il n'est pas établi si leur présence contribue ou non à l'aggravation de la fonction respiratoire (Schneider *et al.* 2008¹⁹⁸).

Les *Small Colony Variants* présentent des caractéristiques phénotypiques différentes de celles de la souche dont ils dérivent. Ainsi, les SCV apparaissent sous forme de petites colonies à bords lisses mesurant 1 mm de diamètre, opaques et convexes [figure 35] (Haussler *et al.* 1999⁷⁰). En revanche, leur petite taille ne résulte pas d'un mode de croissance ralenti car le temps de génération des SCV cultivés en milieu liquide ne diffère pas significativement de celui de la souche sauvage (Drenkard and Ausubel 2002⁴¹). Une étude portant sur des SCV dérivant de souches CF de *P. aeruginosa* a révélé que cette population présente la particularité d'être hyper-adhérente suite à la surproduction de pili de type IV (Haussler *et al.* 1999⁷⁰). Ces pili confèrent une mobilité particulière, à l'interface des surfaces solides, appelée twitching (Haussler *et al.* 1999⁷⁰). Les variants possèdent également la propriété de former un biofilm plus abondant et plus résistant à la tobramycine (200 mg/L) que le biofilm obtenu à partir de souches sauvages (Drenkard and Ausubel 2002⁴¹ ; Haussler *et al.* 2003⁶⁹). Enfin, les SCV présentent également une augmentation de la résistance aux aminosides (amikacine, gentamicine et tobramycine) (Drenkard and Ausubel 2002⁴¹ ; Haussler *et al.* 2003⁶⁹).

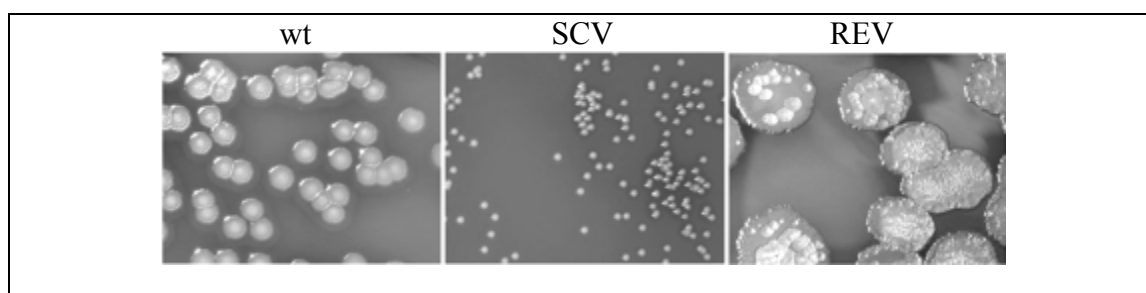


Figure 35. Aspect morphologique de colonies de *P. aeruginosa* CF sauvage (wt), d'un small-colony variant (SCV) dérivant de cette même souche et d'un révertant (REV) (Haussler *et al.* 1999⁷⁰).

Les colonies sauvages, à bords irréguliers, mesurent 3 mm de diamètre. Les SCVs forment de petites colonies circulaires (1 mm de diamètre), opaques et convexes. La souche révertante est obtenue après plusieurs repiquages.

Les SCV peuvent être isolés des expectorations de patients atteints de mucoviscidose ou atteints de bronchopathie pulmonaire chronique obstructive (BPCO) (Schneider *et al.* 2008¹⁹⁸). Ils peuvent également sélectionnée *in vitro* sur un milieu de culture artificiel reproduisant la composition du mucus bronchique (Sriramulu *et al.* 2005²¹²). *In vitro*, la formation de SCV est augmentée d'un facteur 40 lorsque les souches son cultivées en présence de 85 mM de NaCl par rapport au même milieu sans sel. Par ailleurs, la

fréquence d'obtention de ces variants augmente lorsque les cultures s'effectuent à 25°C (Drenkard and Ausubel 2002⁴¹). Après plusieurs repiquages sur milieu nutritif riche, les SCV résistants aux antibiotiques peuvent toutefois "réverter" et retrouver un phénotype sauvage (Haussler *et al.* 1999⁷⁰). Ces observations suggèrent que des signaux environnementaux peuvent réguler la formation des SCV. Un système à 2 composants appelé PvrR (*Phenotype variant Regulator*) dont le domaine régulateur est codé par le gène *PA3947* intervient dans la conversion du phénotype SCV (Drenkard and Ausubel 2002⁴¹). Une analyse de séquence de PvrR révèle la présence d'un domaine EAL capable d'hydrolyser le di-GMPc, molécule-signal impliquée dans de nombreux mécanismes de régulation cellulaire dont la formation de biofilm (Drenkard and Ausubel 2002⁴¹ ; Haussler *et al.* 2003⁶⁹ ; Hoffman *et al.* 2005⁸⁰).

Matériel et méthodes

I. Techniques microbiologiques

1. Souches et plasmides

Les souches et les plasmides utilisés dans cette étude sont répertoriés dans les **tableaux 12 et 13**.

Tableau 12. Liste des souches utilisées

	Description	Références
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1	souche sauvage sensible, prototrophe	(Stover <i>et al.</i> 2000 ²¹³)
PA14	isolat clinique, Rif ^R	(Rahme <i>et al.</i> 1995 ¹⁸¹)
PT629	mutant dérivé de PAO1 surproduisant le système d'efflux actif MexAB-OprM suite à une délétion de 6 pb dans <i>mexR</i>	T. Köhler
MutGr1	mutant dérivé de PAO1 surproduisant le système d'efflux actif MexXY(OprM) suite à une mutation non sens en position 307 dans le gène <i>mexZ</i> (CAG→TAG)	(Vogne <i>et al.</i> 2004 ²²⁷)
EryR	mutant dérivé de PAO1 surproduisant le système d'efflux actif MexCD-OprJ suite à une mutation non sens dans le gène <i>nfxB</i>	(Hamzehpour <i>et al.</i> 1995 ⁶⁴)
PAO7H	mutant dérivé de PAO1 surproduisant le système d'efflux actif MexEF-OprN suite à une mutation non sens dans le gène <i>nfxC</i>	(Köhler <i>et al.</i> 1997 ¹⁰⁶)
FB1	mutant dérivé de PAO1 inactivé dans le gène <i>mexB</i> (<i>mexB::FRT</i>)	Cette étude
FE60	mutant dérivé de PAO1 délété de l'opéron <i>mexXY</i> (Δ <i>mexXY</i>)	(El'Garch <i>et al.</i> 2007 ⁴⁴)
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>SupE44 endA1 hsdR17</i> (<i>r_K⁻ m_K⁺</i>) <i>thi-1 recA1</i> Δ (<i>argF-lacZYA</i>) U169 ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 <i>phoA gyrA96 relA1 deoR</i> λ^-	Invitrogen
S17.1	<i>recA thi pro hsdR^M</i> RP4-2-Tc::Mu, Km::Tn7 (Tp ^R , Sm ^R)	(SIMON <i>ET AL.</i> 1986 ²⁰⁷)
SM10	<i>thi-1, thr, leu, tonA, supE, recA::RP4-2 Tc ::Mu, Km^R</i>	(de Lorenzo and Timmis 1994 ³⁷)
VP517	souche contenant plusieurs plasmides utilisés comme marqueurs de taille (53,4 à 2,1 kb)	(Macrina <i>et al.</i> 1978 ¹²⁶)

Rif^R : souche résistance à la rifampicine, *Ap^R* : à l'ampicilline, *Gm^R* : à la gentamicine, *Tic^R* : à la ticarcilline, *Sm^R* : à la streptomycine, *Tp^R* : au triméthopime, *Km^R* : à la kanamycine ; *FRT* : Flipase Recognition Target.

Tableau 13. Liste des plasmides utilisés.

	Description	Références
pUC18	vecteur de clonage multicopies, Ap ^R	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> 1985 ²⁴⁰)
pAK1900	vecteur de clonage à large spectre d'hôtes, Tic ^R	(Poole <i>et al.</i> 1993 ¹⁷⁷)
pEX100Tlink	oriT ⁺ <i>sacB</i> ⁺ , vecteur de recombinaison homologue avec le site multiple de clonage de pUC18, Ap ^R	(Quenee <i>et al.</i> 2005 ¹⁸⁰)
pPS858	source des séquences FRT, du gène codant la GFP et de la cassette Gm ^R , Ap ^R	(Hoang <i>et al.</i> 1998 ⁷⁶)
pFLP2	plasmide codant pour la recombinase FLP, Ap ^R	(Hoang <i>et al.</i> 1998 ⁷⁶)
pEXB	fragment PCR (1 kb) du gène <i>mexB</i> cloné dans pEX100Tlink, Ap ^R	Cette étude
pEXBR	fragment <i>Sma</i> I (1,7 kb) de pPS858 cloné dans pEXB, Ap ^R , Gm ^R	Cette étude
pAZ17	gène <i>mexZ</i> cloné dans pAK1900, Tic ^R	(Vogne <i>et al.</i> 2004 ²²⁷)
pAGH97	opéron <i>mexXY</i> cloné dans pAK1900, Tic ^R	(Aires <i>et al.</i> 1999 ²)
pAGH29	dérivé de pAGH97, codant une protéine MexY substituée en F29S	Cette étude
PAGH29-KL	dérivé de pAGH29, codant une protéine MexX substituée en K329Q et L331V	Cette étude
pAGH1018	dérivé de pAGH97, codant une protéine MexY substituée en F1018L	Cette étude
PAGH1018-T	dérivé de pAGH1018, codant une protéine MexY substituée en T543A	Cette étude
PAGH1018-TK	dérivé de pAGH1018-T, codant une protéine MexX substituée en K329Q	Cette étude
PAGH1018-TKW	dérivé de pAGH1018-TK, codant une protéine MexX substituée en W358R	Cette étude
pAGH1018A	dérivé de pAGH97, codant une protéine MexY substituée en F1018A	Cette étude
pAGH542A	dérivé de pAGH1018A, codant une protéine MexY substituée en Y542A	Cette étude

Ap^R : gène de résistance à l'ampicilline, Gm^R : à la gentamicine, Tic^R : à la ticarcilline, ; FRT : Flipase Recognition Target

2. Milieux de culture

Les milieux de Mueller Hinton liquide ou solide (MH, Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), cœur-cervelle (Bio-Rad) et le milieu minimum M9 (Maniatis *et al.* 1982¹³⁰) sont utilisés pour les cultures bactériennes. Ces derniers sont rendus sélectifs par

l'addition d'antibiotiques : 150 à 300 mg/L de ticarcilline (Glaxo-Smith-Kline, Paris, France), 100 mg/L d'amoxicilline (GSK). Le milieu MH calibré en cations divalents Ca^{2+} et Mg^{2+} (Becton Dickinson, Cockeysville, USA) est utilisé pour la détermination des CMI (Concentrations Minimales Inhibitrices) des aminosides.

3. Antibiogrammes

Les antibiogrammes sont réalisés par la technique de diffusion en milieu gélosé selon les recommandations définies par le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) 2008 (CA-SFM 2008²²). La lecture des diamètres d'inhibition est effectuée après 24 h d'incubation à 37°C puis comparée aux valeurs critiques définies par le CA-SFM.

4. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La CMI correspond à la concentration minimale d'antibiotique capable d'inhiber toute culture visible après incubation. La souche sauvage sensible PAO1 et la souche PA14 sont utilisées comme références. Une gamme de concentrations croissantes d'antibiotique est réalisée et interprétée selon les critères du CA-SFM 2008 (CA-SFM 2008²²).

a. CMI par dilution en milieu gélosé

La détermination des CMI des aminosides : gentamicine (Panpharma, Trittau, Allemagne), amikacine (Merck, Darmstadt, Allemagne), tobramycine (Merck), fortimicine (Kyowa-Hakko-Kogyo, Tokyo, Japon), apramycine (Helm, Hambourg, Allemagne), nétilmicine (Bio-Rad) et streptomycine (Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA), des β -lactamines : céfépime (Bristol-Myers Squibb, New York, USA), ticarcilline (GSK) et d'autres antibiotiques : ciprofloxacine (Fluka, Milwaukee, USA), tétracycline (Sigma-Aldrich), érythromycine (Abbott, Abbott Park, Illinois, USA) est réalisée par la méthode de dilution en milieu MH gélosé. Des dépôts de 1 μL de suspensions bactériennes à 10^7 UFC/mL sont réalisés à la surface de boîtes contenant des concentrations croissantes d'antibiotique de raison 2 en MHA, grâce au multi-ensemencement de Steers. La lecture des CMI s'effectue après 24 h d'incubation à 37°C.

b. CMI en microplaque

La CMI de la ticarcilline est déterminée en milieu liquide par la méthode de dilution en microplaque. Une gamme de concentrations croissantes de raison 2 en antibiotique est réalisée en bouillon MH dans des volumes de 100 μ L. Un volume équivalent de suspension bactérienne (10^5 UFC/mL) est ajouté dans chaque puits. L'observation du développement microbien s'effectue après 24 h d'incubation à 37°C.

c. CMI par E-test

La détermination des CMI de l'association pipéracilline/tazobactam est réalisée, sur milieu gélosé, grâce à des bandelettes E-test® (AB Biodisk, Solna, Suède) pré-imprégnées d'un gradient d'antibiotique, conformément aux instructions du fabricant.

5. Bactéricidie

Une suspension bactérienne d'environ 10^5 UFC/mL est réalisée dans 20 mL de bouillon MH. Les bactéries sont ensuite exposées à une concentration finale égale à 8 fois la CMI de ticarcilline. Des fractions de culture sont prélevées immédiatement (t_0), après 6 h (t_6) et 20 h (t_{20}) d'incubation à 37°C sous agitation et ensemencées sur des géloses MH à l'aide d'un appareil Spiral Platter (dépôt de 49 μ L, AES Laboratoire). La bactéricidie est représentée par la différence de Log10 entre les bactéries survivantes (nombre par mL) avant et après l'exposition à l'antibiotique.

6. Facteurs de virulence

Le caractère hémolytique et la production de rhamnolipides des souches sont évalués respectivement sur gélose Columbia enrichie en sang de mouton (Bio-Rad) et sur milieu rhamnolipides (M8 1X, $MgSO_4$ 2mM, glucose 0,2 % (p/v), KNO_3 0,5 % (p/v), CTAB (cétrimide) 0,02 % (p/v), bleu de méthylène 0,005‰ (p/v), agar 1,6% (p/v)) (Siegmund and Wagner 1991²⁰⁶). Un dépôt de 5 μ L d'une suspension bactérienne d'opacité équivalente à 0,5 Mc Farland est réalisé à la surface de chaque gélose. La lecture de l'hémolyse s'effectue après 24 h d'incubation à 37°C alors que la production de rhamnolipides est évaluée après 48 h d'incubation (24 h à 37°C puis 24 h à température ambiante). L'hémolyse se traduit par un éclaircissement de la gélose caractéristique de

la lyse des globules rouges. La production de rhamnolipides est quant à elle caractérisée par l'apparition, autour du dépôt, d'un halo bleu foncé correspondant à un complexe insoluble formé par les rhamnolipides, le CTAB et le bleu de méthylène [figure 36].

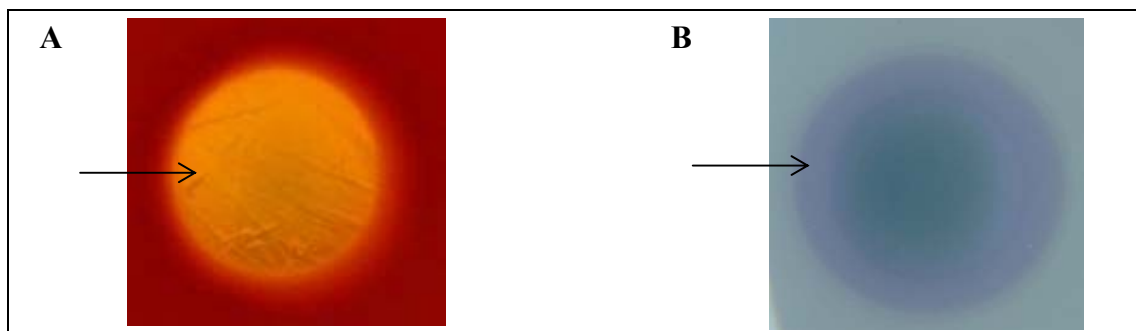


Figure 36. Evaluation qualitative du caractère hémolytique (A) des souches de *P. aeruginosa* et de leur production de rhamnolipides (B).

(A) Après écouvillonnage de la zone de croissance bactérienne, un éclaircissement de la gélose traduit la lyse des globules rouges.

(B) La production de rhamnolipides est caractérisée par l'apparition d'un halo bleu foncé autour de la zone de croissance bactérienne.

7. Cinétique de croissance

Afin de déterminer le temps de génération des isolats CF sélectionnés, la cinétique de croissance est étudiée par spectrophotométrie. Une culture bactérienne d'environ 10^7 UFC/mL est réalisée dans 25 mL de milieu MH liquide puis incubée à 37°C sous agitation. Toutes les 30 minutes, des échantillons de culture sont prélevés pour en mesurer l'absorbance à 600 nm. La construction de la courbe $A_{600} = f(\text{temps})$ permet dans un premier temps d'apprécier la cinétique de croissance ; la linéarisation $\ln(A_{600}) = f(\text{temps})$ permet quant à elle de déterminer le temps de génération (temps de génération = $\ln 2 / \text{pente}$).

8. Test de formation de biofilm

Ce test permet d'évaluer *in vitro* la capacité d'adhésion de cellules de *P. aeruginosa* sur les parois d'une cupule plastique ; il est réalisé en triplicat dans une plaque à 96 puits d'après la technique décrite par Vasseur *et al.* (Vasseur *et al.* 2007²²⁶). Dans chaque cupule sont déposés 180 μL de milieu MH additionnés de 20 μL de la suspension bactérienne ajustée à 0,3 Mac Farland ($\approx 9.10^7$ UFC/mL). Une cupule témoin, contenant 200 μL de MH, est réalisée en parallèle sur chaque plaque. Après 24 heures

d'incubation à 30°C, les bactéries n'ayant pas adhéré aux parois du puits sont éliminées par deux lavages successifs réalisés avec 200 µL d'eau distillée stérile. La coloration des bactéries adhérentes s'effectue par addition de 200 µL de cristal violet 1 %. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, deux lavages avec 200 µL d'eau distillée stérile sont effectués successivement afin d'éliminer l'excès de colorant [figure 37]. L'ajout de 400 µL d'alcool éthylique à 99° libère le cristal violet. La mesure de l'absorbance à 600 nm de la solution d'alcool éthylique ainsi obtenue et préalablement diluée 2,5 fois permet d'évaluer l'adhésion cellulaire après comparaison avec l'absorbance obtenue dans la cupule témoin.

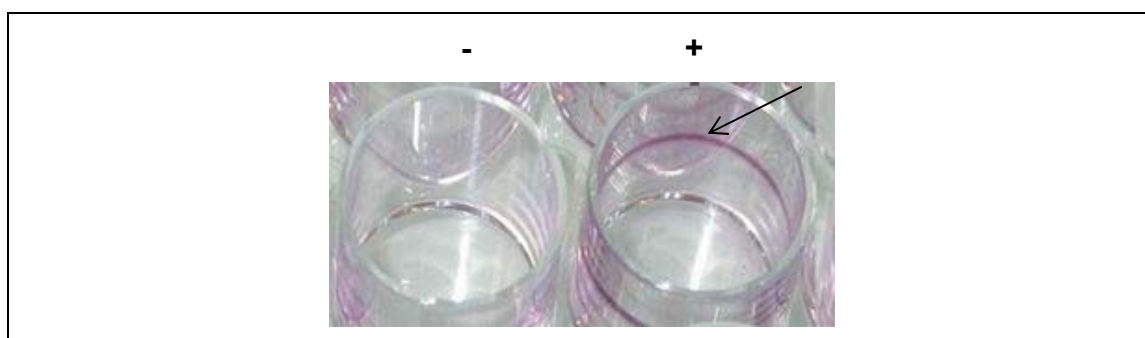


Figure 37. Test d'adhérence cellulaire.

Les cellules de *P. aeruginosa* adhérentes au puits au niveau de l'interface air/liquide sont colorées par le cristal violet (+).

II. Techniques de biologie moléculaire

1. Extraction de l'ADN

a. Extraction d'ADN génomique à l'aide d'un kit

Les kits « Wizard Genomic DNA purification kit » (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) et « QIAamp DNA Mini Kit » (Qiagen, Hilden, Allemagne) ont été utilisés pour l'extraction d'ADN génomique selon les conditions spécifiées par les fournisseurs.

b. Extraction d'ADN plasmidique selon la méthode de Kieser

L'extraction de l'ADN super-enroulé est réalisée selon la technique décrite par Kieser (Kieser 1984¹⁰⁴). Les bactéries obtenues par culture sur milieu solide sont mises en

suspension dans 500 μ L de tampon de Kieser (sucrose 300 mM, Tris 25 mM pH 8, EDTA 25 mM pH 8, vert de bromocrésol 0,02% (p/v)) puis lysées par ajout de 250 μ L de solution de lyse (SDS 2% (p/v), NaOH 200 mM). Après une incubation de 30 mn à 55°C, les protéines sont précipitées par l'ajout de 250 μ L de phénol-chloroforme 1:1 (v/v) saturé en eau. Après une centrifugation de 15 mn - 14000 g à 4°C, 30 μ L de la phase supérieure sont prélevés puis déposés dans un gel d'agarose à 0,8 % (p/v) afin de visualiser l'ADN plasmidique.

c. Extraction d'ADN plasmidique pour le clonage et le séquençage

L'ADN plasmidique est soit extrait à partir d'une culture de la nuit selon la technique de lyse alcaline décrite dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.* 2000⁸), soit purifié grâce aux kits « Wizard Plus SV miniprep » (Promega) et « QIAfilter Plasmid Midi kit » (Qiagen) qui comprennent chacun une étape de lyse alcaline suivie d'une purification par chromatographie échangeuse d'anions.

2. Amplification d'ADN par PCR et purification de son produit

Le mélange réactionnel (50 μ L) se compose de 200 μ M de dNTP, de 2 mM de $MgCl_2$, de tampon Taq 1X, de 0,5 U de BioTaqRed (Bioline, Londres, Angleterre), de 0,6 μ M de chaque amorce et de 10 ng d'ADN. Les réactions d'amplification sont réalisées dans un thermocycleur T3 (Biometra, Biolabo Scientific Instruments, Lausanne, Suisse) selon les conditions suivantes : 5 mn à 94°C puis 30 cycles (94°C – 30 s, T_m °C – 40 s, 72°C – 55 s) et une élongation finale de 7 mn à 72°C. Les amorces dessinées à l'aide du logiciel primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>) ainsi que leur T_m sont répertoriées dans les tableaux 14 et 15. En vue des réactions de séquençage et de clonage, les produits PCR sont purifiés grâce au Kit QIAquick PCR purification (Qiagen) ou par la méthode classique de précipitation à l'acétate de sodium (Ausubel *et al.* 2000⁸).

3. Dosage de l'ADN

La quantité d'ADN ou d'ARN extrait est évaluée par spectrophotométrie dans l'UV à 260 nm. A cette longueur d'onde, une unité d'absorbance correspond à une concentration de 50 µg/mL d'ADN double brin (ou de 40 µg/mL d'ARN). La pureté de l'ADN est confirmée par un rapport des absorbances à 260 et 280 nm compris entre 1,8 et 2.

4. Electrophorèse analytique d'ADN

La migration de l'ADN obtenu après extraction, restriction ou amplification s'effectue dans un gel horizontal d'agarose 1% (p/v) pendant 1 h sous une tension de 100 V. Le tampon de migration utilisé est le TAE 1X (Tris acétate 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8). La révélation s'effectue par transillumination avec une lumière UV ($\lambda=320$ nm) après immersion du gel dans une solution de BET (0,5 µg/mL) durant 30 mn. Le traitement d'image est réalisé grâce au système Chemidoc XRS (Bio-Rad).

5. Séquençage d'ADN

Le séquençage d'ADN est réalisé par la plateforme technique « séquençage, analyse de fragments » de l'IFR 133, à l'aide de l'appareil 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Les réactions de séquençage sont effectuées par la méthode des didéoxynucléotides de Sanger (Sanger *et al.* 1977¹⁹⁴) à l'aide du kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) à partir de 4 ng de produit PCR précédemment purifié. Les résultats obtenus sont analysés grâce au logiciel SeqScape Software v2.5 (Applied Biosystems).

Tableau 14. Couples d'amorces utilisés pour le séquençage des gènes codant les systèmes d'efflux et leurs régulateurs.

Amorces	Séquences nucléotidiques (5'→ 3')							Tm*	Taille (pb)
mexR									
SéqR1	GCG	GAT	ACC	TGA	AAC	GAA	AA	60°C	921
SéqR2	CGC	TTC	CAG	GGT	CAC	GAT		62°C	
mexA									
SéqA1	TTT	TGC	CTG	CCT	TCT	TCG		54°C	1129
SéqA2	GGC	CTT	CGG	TAA	TGA	TCT	TC	60°C	
SéqA3	GGA	AGG	CGT	CAA	GCA	GAA		56°C	600
SéqA4	AAG	GTC	ACG	GTG	ATG	GTC	A	58°C	
mexB									
SéqA4	AAG	GTC	ACG	GTG	ATG	GTC	A	58°C	1507
SéqB2	GTC	GTC	CAC	CAG	CAA	GCC	G	64°C	
SéqB3	ATC	CTC	CTC	GTG	TTC	CTG	GTG	66°C	763
SéqB4	CCT	TCT	CCA	GCA	GGT	ATT	CG	62°C	
SéqB5	CCT	GCT	GAT	CTA	CGT	GGT	GA	62°C	1570
porM2	GCT	GGT	AGT	CGG	GGA	TCA		58°C	
promoteur d'oprM									
poprM1	GCC	GAT	CGT	GAT	GAC	CTC		58°C	206
poprM2	GCT	GGT	AGT	CGG	GGA	TCA		58°C	
oprM									
oprM1	CAC	GCT	GTT	CAA	GGA	CGA	G	60°C	889
oprM2	ACT	TCG	GTC	AGC	AGG	GTC	T	60°C	
oprM3	AGT	ACA	CCC	GCC	TGG	TAG	C	60°C	738
oprM4	CCT	GGG	GAT	CTT	CCT	TCT	TC	60°C	
oprM5	ATC	AAC	CTG	CCG	ATC	TTC	AC	60°C	485
oprM6	GAC	TTC	CGC	GAG	GAT	AAA	AA	59°C	
mexZ									
SéqZ1	GCA	GCC	CAG	CAG	GAA	TAG		58°C	990
SéqZ2	GCC	TGT	CGG	TGC	TCT	ACA	T	60°C	
SéqZ3	CCC	TTG	TGA	GGA	CGT	TCA	GT	62°C	519
SéqZ4	CCA	GAG	CGA	TTG	CAG	ATA	GA	60°C	
mexX									
SéqX1	GGA	CGT	CCT	CAC	AAG	GGA	AA	62°C	1376
SéqX2	GAG	CCA	TTC	GTA	GCG	TTC	TC	62°C	
SéqX3	AAG	GCC	GAA	CTG	GAG	CAG		58°C	750
SéqX4	CCG	GTC	AAT	GAA	GAA	ACG	AG	60°C	
mexY									
SéqY1	GAG	TGG	GTG	ATC	GTC	GAG	AA	62°C	1114
SéqY2	AGG	GGA	TGT	TGT	AGC	TCA	CG	62°C	
SéqY3	GCG	GGT	TCA	CCA	AAT	GAC		56°C	1157
SéqY4	GCG	AGT	TCA	TCG	CAT	ACA	CC	62°C	
SéqY5	GAC	GTC	GAG	CGC	TAC	CTG		60°C	970
SéqY6	GGA	TCG	ACC	AGC	TTT	CGT	AG	62°C	
SéqY7	TCC	TTC	GAA	GAA	CGC	CTG	T	58°C	1000
SéqY8	GGG	TGG	TCA	TCG	AAC	TGG		58°C	
SéqY9	GCT	TCT	TCG	GCT	GGT	TCA		56°C	468
SéqY10	GCG	AGT	TCA	TCG	CAT	ACA	CC	62°C	
SéqY11	CTA	CGA	GGC	CCT	GGT	CAA	G	62°C	716
SéqY12	GGC	CGA	CCT	TGA	AGT	AGA	TG	62°C	

* $T_m = 4*(G+C) + 2*(A+T)$. Ces amorces ont été choisies à l'aide du logiciel Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>).

Tableau 15. Couples d'amorces utilisés pour le séquençage des QRDR (Akasaka et al. 2001⁶).

Amorces	Séquences nucléotidiques (5'→ 3')											Tm*	Taille (pb)
<i>gyrA</i>													
gyrA1	TTA	TGC	CAT	GAG	CGA	GCT	GGG	CAA	CGA	CT	90°C	365	
gyrA2	AAC	CGT	TGA	CCA	GCA	GGT	TGG	GAA	TCT	T	84°C		
<i>gyrB</i>													
gyrB1	GCG	CGT	GAG	ATG	ACC	CGC	CGT				72°C	390	
gyrB2	CTG	GCG	GTA	GAA	GAA	GGT	CAG				66°C		
<i>parC</i>													
parC1	ATG	AGC	GAA	CTG	GGG	CTG	GAT				66°C	209	
parC2	ATG	GCG	GCG	AAG	GAC	TTG	GGA				68°C		
<i>parE</i>													
parE1	CGG	CGT	TCG	TCT	CGG	GCG	TGG	TGA	AGG	A	94°C	590	
parE2	TCG	AGG	GCG	TAG	TAG	ATG	TCC	TTG	CCG	A	88°C		

* $T_m = 4*(G+C) + 2*(A+T)$.

6. Techniques de clonage

a. Restriction enzymatique

L'hydrolyse de l'ADN plasmidique ou des amplicons obtenus par PCR est réalisée par les enzymes de restriction *Bam*HI, *Hind*III, *Xba*I, *Eco*RI, *Eco*RV (Roche, Meylan, France), *Sma*I (Proméga) et *Sp*II (MBI-Fermentas, Glen Burnie, USA) selon les protocoles décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al. 2000⁸).

b. Ligature

Les réactions de ligature entre un insert et un vecteur (rapport 1:3) sont réalisées grâce à la T4 ligase (Invitrogen, Carlsbad, USA) et d'après les protocoles décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al. 2000⁸).

c. Transformation bactérienne

Transformation par choc thermique

Les bactéries compétentes (50 µL de *E. coli* DH5α, Invitrogen) et 200 ng d'ADN sont laissés en contact 30 mn dans la glace, placés 40 s à 42°C, puis remis dans la glace

2 mn. Après addition d'1 mL de milieu MH, les bactéries sont incubées 1 h à 37°C sous agitation. Cette culture est étalée sur milieu sélectif à raison de 100 µL par boîte. Un témoin négatif, sans ADN, permet de vérifier l'absence de développement sur le milieu sélectif.

Transformation par électroporation

Les souches de *E. coli* et de *P. aeruginosa* sont transformées grâce à l'électroporateur Gene Pulser (Bio-Rad) qui, en appliquant un champ électrique de forte intensité à une culture bactérienne, déstabilise les membranes cellulaires et permet la pénétration d'ADN exogène dans les cellules. L'obtention de bactéries compétentes à partir d'une culture de la nuit dans un bouillon MH ainsi que les conditions d'électroporation sont identiques à celles décrites dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.* 2000⁸), par Diver *et al.* (Diver *et al.* 1990³⁹) et par Smith et Iglewski (Smith and Iglewski 1989²⁰⁸) [tableau 16].

Tableau 16. Protocoles utilisés pour l'électroporation des souches de *E. coli* et de *P. aeruginosa*

	<i>E. coli</i> (Ausubel <i>et al.</i> 2000 ⁸)	<i>P. aeruginosa</i>	
		« SMEB » (Diver <i>et al.</i> 1990 ³⁹)	« Sucrose » (Smith and Iglewski 1989 ²⁰⁸)
Lavage 1	EDS 1 vol.	Sucrose 300 mM HEPES, pH7, 1 mM MgCl ₂ 1 mM 1 vol.	Sucrose 300 mM 1 vol.
Lavage 2	EDS 1 vol.	Sucrose 300 mM HEPES, pH7, 1 mM MgCl ₂ 1 mM 1 vol.	Sucrose 300 mM 1 vol.
Tampon d'électroporation	Glycérol 15 % (v/v) 0,005 vol.	Sucrose 300 mM HEPES, pH7, 1 mM MgCl ₂ 1 mM 0,01 vol.	Sucrose 300 mM 0,01 vol.
Conditions d'électroporation	25 µF, 1,6 kV/cm, 200 Ω, 5ms	25 µF, 1,6 ou 2,5 kV/cm, 200 Ω, 5ms	
Volume de milieu Cœur Cervele	200 µL	200 µL	
Temps d'incubation avant étalement sur milieu sélectif	1h sous agitation à 37 °C	2 h sous agitation à 37 °C	

Conjugaison bactérienne

La souche "donneuse" de *E. coli* S17.1 et la souche "receveuse" de *P. aeruginosa* sont cultivées séparément et sous agitation, respectivement à 37°C et à 42°C, jusqu'à A₆₅₀ =

0,9 puis mélangées dans un rapport 1:4 (v/v). Après incubation 2 h à 37°C sans agitation, 200 µl du mélange sont déposés, sous forme d'une goutte, à la surface d'une gélose MH puis incubés 18 h à 37°C. Les colonies obtenues sont remises en suspension dans 1 mL d'EDS et les transconjugants sont sélectionnés sur milieu approprié.

7. Inactivation du gène *mexB* par recombinaison homologue

La **figure 38** représente la stratégie utilisée pour l'inactivation de *mexB*. Un fragment de 1052 pb du gène *mexB* (513-1565) est amplifié par PCR à l'aide des amorces mexBrec1 (5'-CTC GGA TCC GTC GGT TTC CAG GTG TT-3') et mexBrec2 (5'-CTC AAG CTT GAA AGG AAC ATC CGG TTG AA-3') à partir de l'ADN chromosomique de la souche PAO1 en créant les sites de restriction *Bam*HI et *Hind*III (soulignés dans les séquences des amorces), respectivement, en amont et en aval du fragment de *mexB*. Après restriction enzymatique, le fragment est cloné dans le plasmide pEX100Tlink pour donner lieu au plasmide recombinant pEXΔB. Une restriction à l'aide de l'enzyme *Sp*II permet d'introduire au centre de l'insert une cassette portant un gène de résistance à la gentamicine et un gène codant la *GFP* (*Green Fluorescent Protein*). Le plasmide obtenu, nommé pEXΔBRec-Gm^R, est introduit dans la souche de *E. coli* S17.1 puis transféré par conjugaison dans la souche PAO1 et dans les souches cliniques (615 R, 3020 S, 3020 R, 2715, 2716, 2721, 2933 et 2998). Le vecteur suicide n'ayant pas la capacité de se répliquer chez *P. aeruginosa*, seule son intégration dans le génome des souches receveuses est possible. Après sélection des mutants sur milieu minimum contenant 200 mg/L de gentamicine, une amplification par PCR d'une région de *mexB* est réalisée pour vérifier l'inactivation du gène. Les amorces utilisées pour cette vérification sont mexBrec1 et mexBrec2. Afin d'éliminer la cassette portant le gène de résistance à la gentamicine, le plasmide pFLP2 est transféré par conjugaison entre la souche de *E. coli* SM10 et le mutant inactivé de *P. aeruginosa* (Hoang *et al.* 1998⁷⁶). Ce plasmide porte un gène codant une recombinase (flippase) qui permet l'excision de la cassette comprise entre les deux séquences FRT. Une première sélection sur milieu minimum contenant 200 mg/L de ticarcilline permet de s'assurer du transfert du plasmide, puis une seconde sélection sur milieu MH supplémenté par 5 % de sucrose permet l'élimination du plasmide pFLP2. En effet, comme le plasmide pEX100Tlink, le vecteur pFLP2 contient le gène *sacB* codant une lévane sucrase catalysant l'hydrolyse du sucrose en produits toxiques pour la cellule. Au final, le

mutant de *P. aeruginosa* inactivé contient un gène dont le cadre de lecture est rompu par une séquence nucléotidique d'environ 30 pb. Cette insertion a été contrôlée par séquençage de l'ADN.

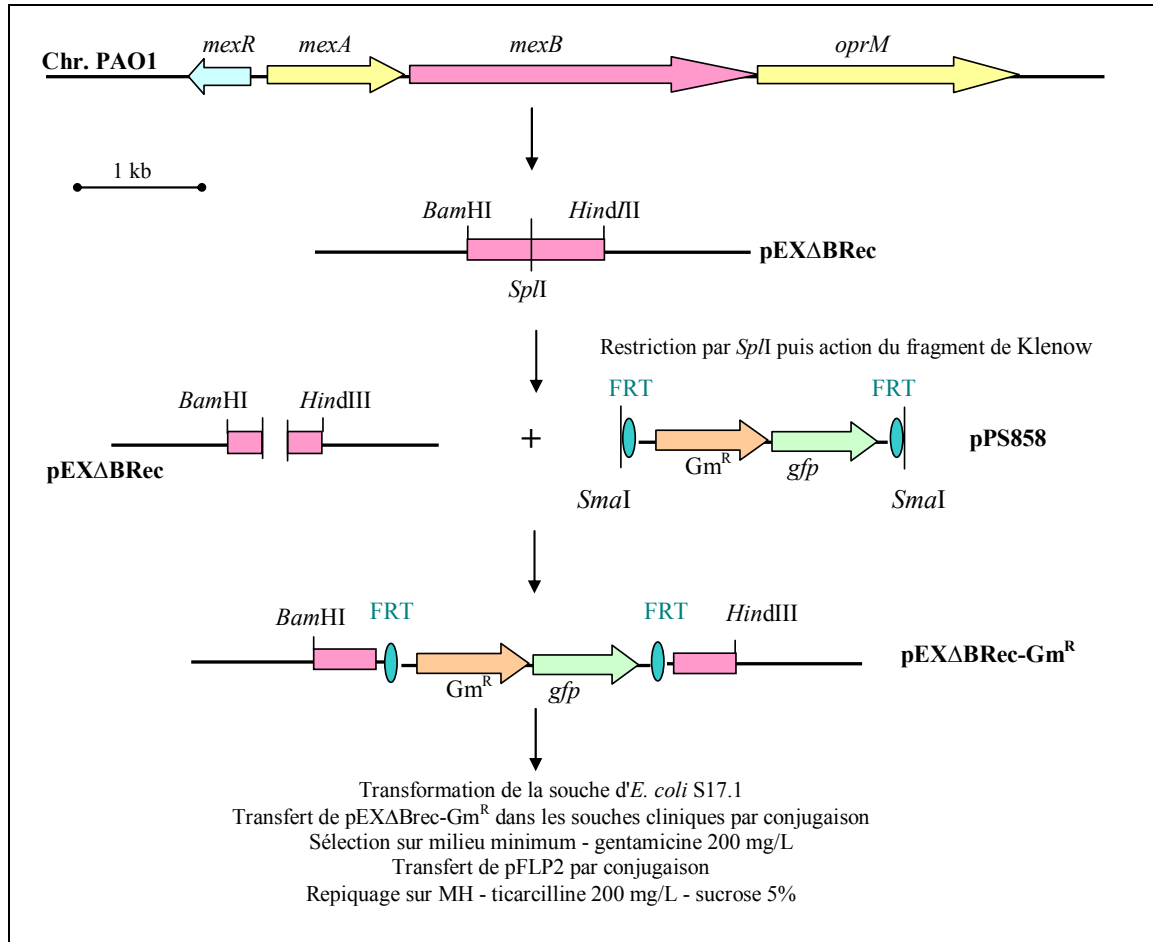


Figure 38. Stratégie utilisée pour inactiver le gène *mexB* chez PAO1 et chez les isolats cliniques.

Un fragment de 1052 pb du gène *mexB* est amplifié par PCR puis cloné dans le plasmide pEX100Tlink pour obtenir le plasmide recombinant pEXΔB. Une restriction par l'enzyme *Sp*II permet d'introduire au centre de l'insert une cassette portant un gène de résistance à la gentamicine et un gène codant la *GFP*. Le plasmide obtenu, nommé pEXΔBRec-Gm^R, est introduit dans la souche de *E. coli* S17.1 puis transféré par conjugaison dans la souche PAO1 et dans les souches cliniques. La sélection des mutants s'effectue sur milieu minimum contenant 200 mg/L de gentamicine.

La cassette portant le gène de résistance à la gentamicine peut être éliminée en transférant dans les souches précédemment inactivées le plasmide pFLP2 puis en sélectionnant successivement les mutants sur milieu minimum contenant 200 mg/L de ticarcilline et sur milieu MH supplémenté par 5 % de sucrose.

8. Mutagenèse dirigée

Afin de substituer spécifiquement des acides aminés dans les protéines MexX et MexY, des réactions de mutagenèse dirigée sont réalisées à l'aide du kit QuickChange® XL II Site-Directed Mutagenesis (Stratagene, La Jolla, USA). Ce kit permet de synthétiser un plasmide muté à partir d'un plasmide matrice, le plasmide pAGH97 contenant l'opéron *mexXY*, et de deux amorces complémentaires dans lesquelles la mutation souhaitée est introduite. Par exemple, chez un isolat clinique le séquençage du gène *mexY* a mis en évidence le remplacement de la thymine en position 3052 par une cytosine (T₃₀₅₂C) conduisant à la substitution F1018L dans la protéine MexY. Afin de reproduire cette substitution *in vitro*, nous avons dessiné deux amorces dans lesquelles nous avons reproduit cette substitution nucléotidique [figure 39].

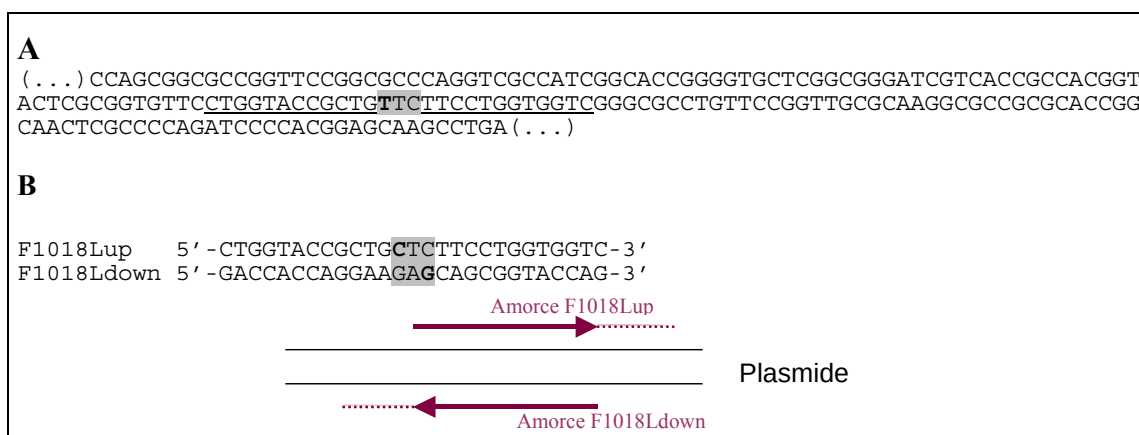


Figure 39. Stratégie utilisée pour obtenir la substitution F1018L dans MexY.

(A) Séquence partielle de *mexY*, la thymine en position 3052 est en gras, le codon codant la phénylalanine en position 1018 grisé.

(B) Séquence des amorces utilisées pour introduire la substitution F1018L dans la protéine MexY

La synthèse du plasmide muté s'effectue par PCR [figure 40]. Dans un premier temps, le plasmide matrice est dénaturé, les amorces contenant la mutation [tableau 17] s'hybrident puis la Taq polymérase *PfuUltra* assure la synthèse d'un nouveau plasmide. Par la suite, le plasmide ayant servi de matrice est dégradé grâce à l'action spécifique de l'enzyme *DpnI*. En effet, cette enzyme reconnaissant l'ADN méthylé du plasmide matrice n'a aucune activité sur le plasmide synthétisé lors de la PCR. Le plasmide

néosynthétisé est introduit dans une souche de *E. coli* par choc thermique, extrait, puis vérifié par séquençage. Afin de déterminer l'impact des différentes substitutions dans MexX et MexY sur la résistance aux aminosides, les plasmides mutés sont introduits dans la souche FE60 (délétée en *mexXY*), puis les niveaux de résistance conférés par ces plasmides sont mesurés pour différents substrats du système MexXY(OprM).

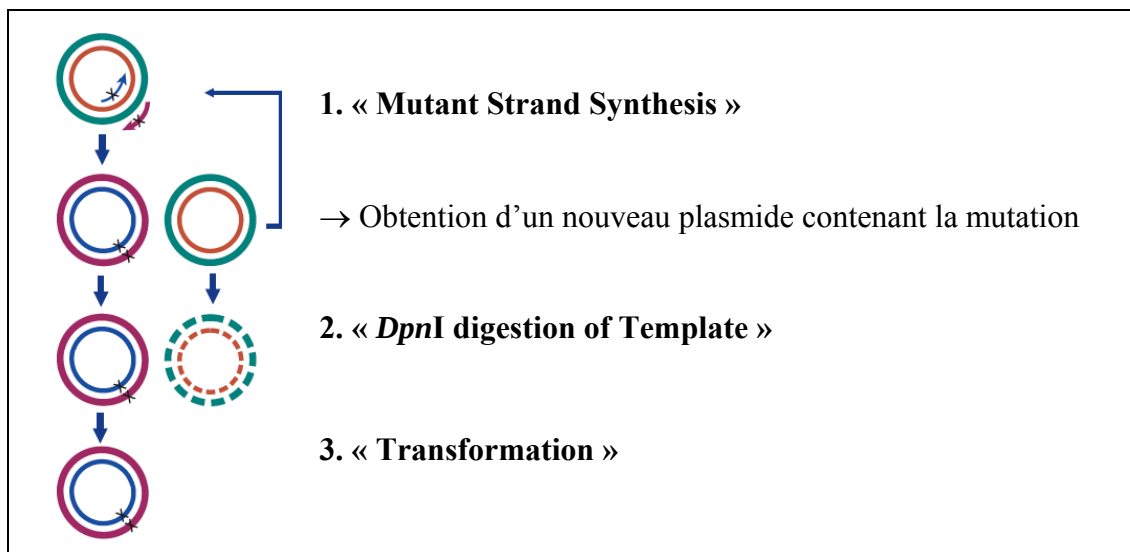


Figure 40. Principe de la méthode de mutagenèse dirigée (Kit QuickChange® XL II Site-Directed Mutagenesis, Stratagene).

- (1) Dénaturation du plasmide matrice, hybridation des amorces mutées et élongation grâce à la *Pfu* Ultra polymérase.
- (2) Reconnaissance du plasmide matrice (ADN méthylé) et digestion par *DpnI*.
- (3) Transformation de *E. coli* par le plasmide muté, vérification du plasmide par séquençage.

Tableau 17. Liste des amorces utilisées pour la mutagenèse dirigée.

Amorces	Séquences nucléotidiques (5' → 3')									GC %	T°Hyb*
Substitutions dans MexX											
K329Q Up	GTG	GTC	AAC	CCA	<u>CAG</u>	GGC	TTG	GTG	GAA	59	59,2
K329Q Down	TTC	CAC	CAA	GCC	<u>CTG</u>	TGG	GTT	GAC	CAC		
K329Q + L331V Up	GTC	AAC	CCA	<u>CAG</u>	GGC	<u>GTG</u>	GTG	GAA	GAC	66	63,5
K329Q + L331V Down	GTC	TTC	CAC	<u>CAC</u>	GCC	<u>CTG</u>	TGG	GTT	GAC		
W358R Up	AAG	GGC	GGC	GAG	<u>CGG</u>	GTG	ATC	GTC	GAG	70	63,8
W358R down	CTC	GAC	GAT	CAC	<u>CCG</u>	CTC	GCC	GCC	CTT		
Substitutions dans MexY											
F29S Up	GCG	ATC	CGC	<u>TCC</u>	CTG	CCG	GTC			76	59
F29S Down	GAC	CGG	CAG	<u>GGA</u>	GCG	GAT	CGC				
Y542A Up	GAT	GCT	GGT	<u>CGC</u>	<u>CAC</u>	CCT	GGT	CA		76	57,3
Y542A Down	TGA	CCA	GGG	<u>TGG</u>	<u>CGA</u>	CCA	GCA	TC			
T543A Up	GAT	GCT	GGT	CTA	<u>CGC</u>	<u>CCT</u>	GGT	CAT	CGG	63	60,7
T543A Down	CCG	ATG	ACC	AGG	<u>GCG</u>	TAG	ACC	AGC	ATC		
F1018A Up	TGG	TAC	CGC	<u>TGG</u>	<u>CCT</u>	TCC	TGG	TGG	T	64	59,1
F1018A Down	ACC	ACC	AGG	AAG	<u>GCC</u>	AGC	GGT	ACC	A		
F1018L Up	CTG	GTA	CCG	CTG	<u>CTC</u>	TTC	CTG	GTG	GTC	63	60,7
F1018L Down	GAC	CAC	CAG	GAA	<u>GAG</u>	CAG	CGG	TAC	CAG		

*température d'hybridation tenant compte d'une concentration en ions divalents de 50mM et calculée avec la formule suivante : $T_m = 59,90 + 0,41(\%C + \%G) - (675/N)$ avec N longueur de l'amorce (pb). Les substitutions nucléotidiques figurent en gras dans la séquence de l'amorce, les codons sont soulignés.

III. Génotypage

1. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Le génotypage des souches cliniques peut être effectué par la technique d'amplification aléatoire de l'ADN génomique (RAPD) en utilisant l'amorce unique 272 : 5' -AGC GGC CCA A-3' (Mahenthiralingam *et al.* 1996¹²⁹) ou AP3 : 5'-TCA CGA TGC A-3' ou AP5 : 5'-TCA CGC TGC G-3' (Talon *et al.* 1998²²⁰) en suivant les conditions d'amplification publiées. Le produit d'amplification est analysé par électrophorèse dans un gel d'agarose 2% (p/v) dans du tampon TBE 0,5X (Tris Borate 40 mM, EDTA 1 mM pH 8). Cette technique est utilisée pour identifier les isolats redondants issus d'un même clone transmissible (profils de migration présentant moins de trois bandes de différence).

2. Puces Clondiag®

Les « Array Tubes » (AT) *P. aeruginosa*, commercialisés par la société Clondiag®, permettent un génotypage et un pathotypage rapide et fiable grâce à une technique de micro-array. Ce test est basé sur une hybridation spécifique entre un produit marqué à la biotine et de courtes sondes nucléotidiques (15-20 nucléotides) greffées sur la puce. En une seule manipulation, on peut ainsi vérifier l'hybridation de l'ADN des souches étudiées avec 77 sondes nucléotidiques, et ainsi détecter 32 « *Single Nucleotides Polymorphisms* (SNPs) » et la présence potentielle de 45 « facteurs » de virulence [figure 41] (Wiehlmann *et al.* 2007²³⁵) (cf tableau, annexe 1).

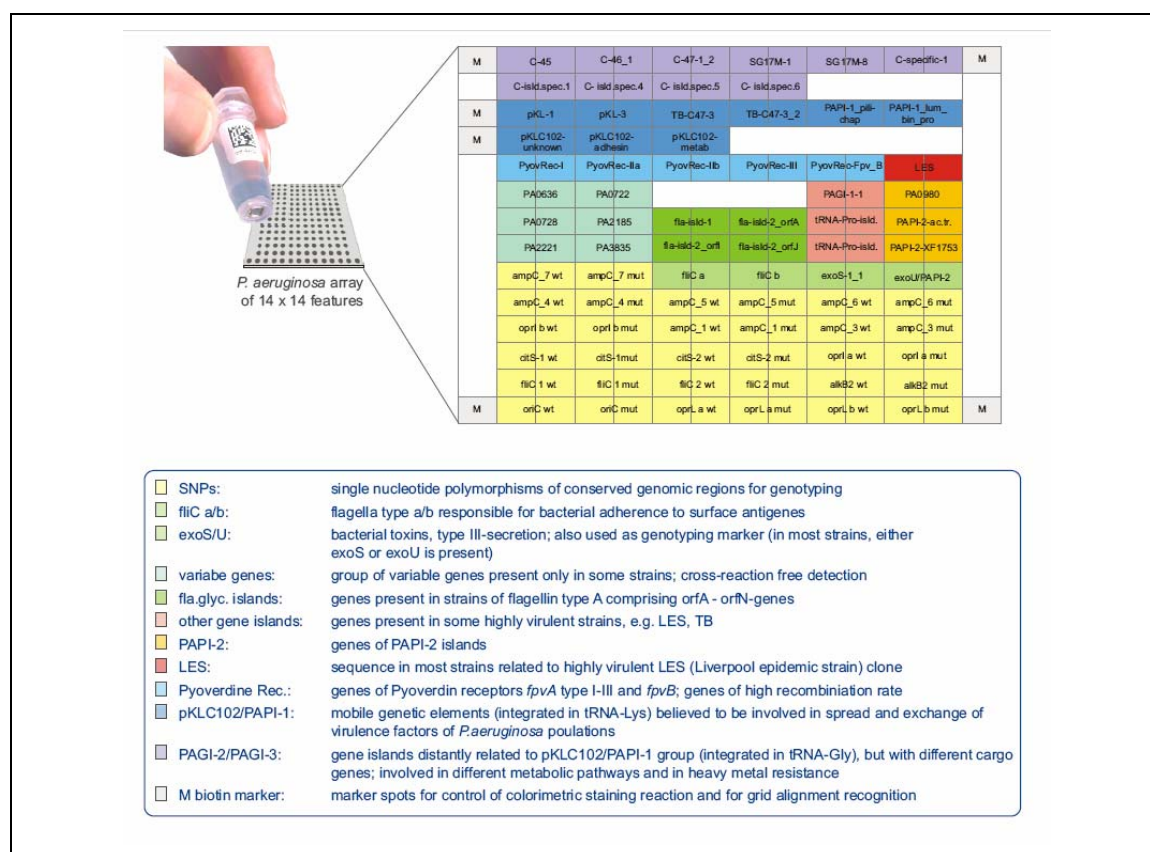


Figure 41. Disposition, identification des sondes et des témoins positifs greffés sur la matrice de l'array tube *P. aeruginosa* (Clondiag®).

La partie basse de la puce (en jaune) permet la détection des 32 SNPs alors que la partie supérieure correspond aux 45 facteurs sondes assurant la détection de différents facteurs de virulence comme, par exemple, les gènes *exoS/U* (en vert clair), des gènes codant les îlots de pathogénicité PAPI-1 et PAPI-2 (en violet et en orange).

Le protocole utilisé pour la réalisation des puces est conforme aux instructions du fournisseur (www.clondia.com). La réaction d'amplification est effectuée à partir de colonies fraîches de *P. aeruginosa* obtenues après culture sur milieu gélosé. Le produit PCR, correspondant aux différentes séquences cibles marquées à la biotine, est ensuite déposé dans l'Array Tube. L'hybridation du produit PCR sur la puce s'effectue à 60°C sous agitation durant 45 mn. Après différents lavages et une étape de saturation, l'anticorps dirigé contre la biotine et portant une fonction peroxydase (HRP) est déposé à la surface de la puce. La révélation s'effectue par ajout d'un substrat chromogénique de la peroxydase, le TMB (3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine) [figure 42]. Le profil SNPs de chaque souche est déterminé conformément au guide de recommandations fourni par la fabriquant [figure 43].

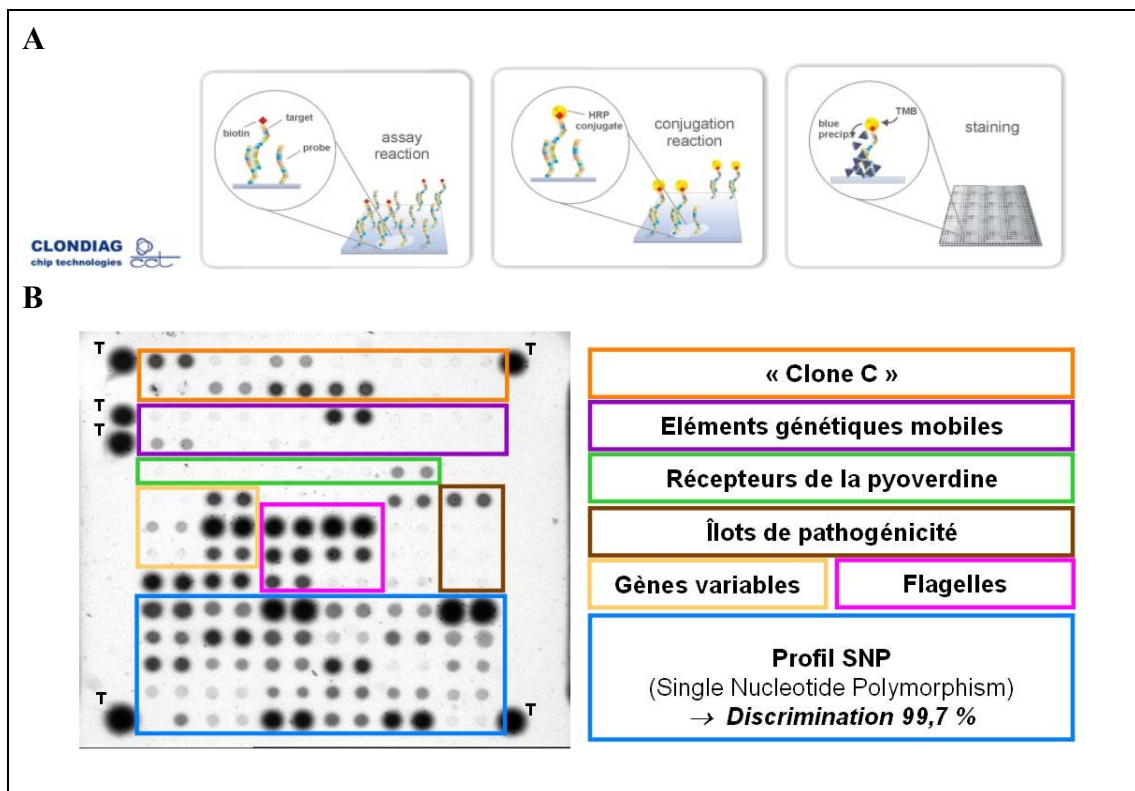


Figure 42. Révélation d'une puce Clondia®.

(A) Principe de la révélation : l'anticorps HRP reconnaît le produit PCR hybridé sur la sonde ; l'ajout d'un substrat chromogène (TMB) permet la visualisation de l'hybridation sous forme d'un spot noir.

(B) Photo d'une puce après révélation ; T : témoins de révélation.

3. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

L'électrophorèse en champ pulsé après macrorestriction de l'ADN génomique permet d'attribuer à chaque souche une empreinte génétique spécifique appelée pulsotype. Le génotypage à l'aide de cette méthode est effectué par le Laboratoire d'Hygiène Hospitalière du CHU de Besançon selon une technique mise au point par l'équipe (Talon *et al.* 1995²¹⁹). Afin d'éviter les forces de cisaillement, la préparation de l'ADN se fait par lyse *in situ* des cellules bactériennes dans une matrice semi-solide d'agarose. Après restriction par l'enzyme *DraI*, les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse en champ pulsé (CHEF-DRIII, Bio-Rad) dans un gel d'agarose à 1 % et sous les conditions suivantes : 5,5 V/cm à 14°C, avec des impulsions de 20 secondes pendant 12 heures puis de 5 secondes pendant 17 heures. La révélation s'effectue par transillumination avec une lumière UV après immersion du gel dans une solution de BET (0,5 µg/mL) durant 30 mn. La souche de *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 est incluse dans chaque gel après restriction par l'enzyme *SmaI* ; cette souche utilisée comme référence assure la normalisation des gels et permet de comparer les différents pulsotypes entre eux.

Les pulsotypes ainsi obtenus sont interprétés conformément aux critères publiés par Tenover *et al.* : (i) souches clonales semblables si leurs profils sont identiques, (ii) souches clonales très proches si leurs profils présentent 1 à 3 bande(s) différentes, (iii) souches clonales proches si les profils présentent 4 à 6 bandes de différence et (iv) au delà de 6 bandes de différence les souches sont considérées comme différentes (Tenover *et al.* 1995²²¹). Cette technique, reconnue comme méthode de référence, permettra d'établir une comparaison avec d'autres techniques de typage telles que la MLVA ou les puces Clondiag[®].

4. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA)

Cette technique d'analyse génétique par PCR décrite par Vu-Thien *et al.* exploite comme source de polymorphisme la variation du nombre de motifs dans des répétitions en tandem (VNTR : *Variable Number of Tandem Repeats*) (Vu-Thien *et al.* 2007²²⁸) [figure 44]. Les souches de référence PAO1 et PA14 sont utilisées comme contrôles de la stabilité des marqueurs. Treize des 15 couples d'amorces décrits par Vu-Thien *et al.* ont été utilisés dans ce travail [tableau 18]. Le mélange réactionnel utilisé pour les amplifications est identique à celui décrit dans le paragraphe II.2. Les fragments amplifiés sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose 2% (p/v). La révélation s'effectue sous lumière UV après immersion du gel dans une solution de BET (0,2 µg/mL) durant 30 mn. L'analyse du gel est réalisée grâce au système Chemidoc XRS (Bio-Rad). La taille de chaque amplicon est établie à l'aide du logiciel Quantity One (version 4.6.5 – Bio-Rad) et le nombre de répétitions de chaque motif est déterminé en utilisant la souche PAO1 en référence. Les souches présentant plus de 80% d'identité pour les treize marqueurs étudiés sont considérées comme génétiquement proches.

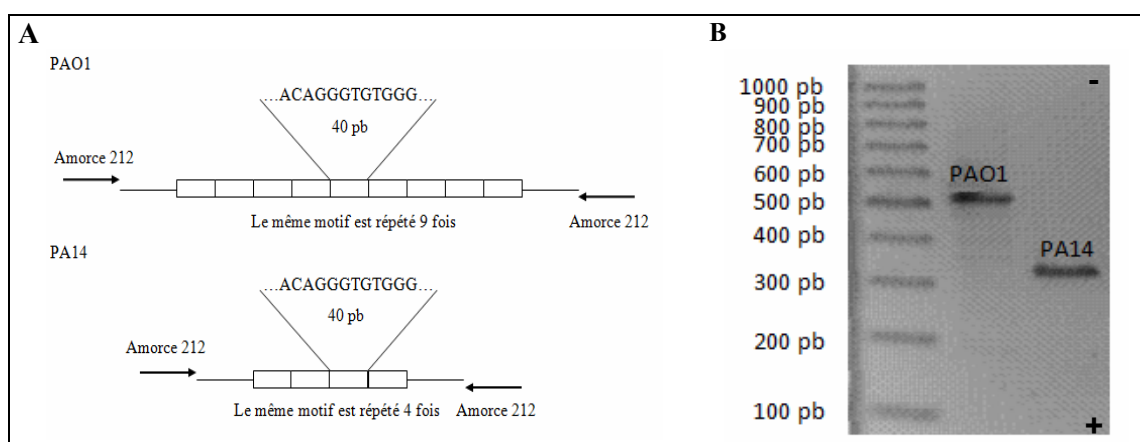


Figure 44. Exemple d'amplification du locus 212 chez les souches de *P. aeruginosa* PAO1 et PA14.

(A) Structure du VNTR sur le locus ms212 : séquence répétée 9 fois chez PAO1 et 4 fois chez PA14.

(B) Profils de migration des fragments amplifiés chez les souches PAO1 et PA14 pour le locus ms212. Pour la souche PAO1, le produit PCR présente une taille de 522 pb alors que pour la souche PA14, ne contenant que 4 répétitions du motif, le fragment amplifié n'est que de 324 pb.

Tableau 18. Liste des amorces utilisées pour le génotypage (Vu-Thien *et al.* 2007²²⁸)

Locus	Taille de la répétition (pb)	Taille (pb)*		Amorces	Séquences nucléotidiques (5'→ 3')									
		PAO1	PA14											
ms77	39	442 (4)	364 (2)	ms77L	GCG	TCA	TGG	TCT	GCA	TGT	C			
				ms77R	TAT	ACC	CTC	TTC	GCC	CAG	TC			
ms127	15	210 (8)	225 (9)	ms127L	CTC	GGA	GTC	TCT	GCC	AAC	TC			
				ms127R	GGC	AGG	ACA	GGA	TCT	CGA	C			
ms142	115	890 (7)	201 (1)	ms142L	AGC	AGT	GCC	AGT	TGA	TGT	TG			
				ms142R	GTG	GGG	CGA	AGG	AGT	GAG				
ms172	54	789 (12)	789 (12)	ms172L	GGA	TTC	TCT	CGC	ACG	AGG	T			
				ms172R	TAC	GTG	ACC	TGA	CGT	TGG	TG			
ms211	101	663 (5)	360 (2)	ms211L	ACA	AGC	GCC	AGC	CGA	ACC	TGT			
				ms211R	CTT	CGA	ACA	GGT	GCT	GAC	CGC			
ms212	40	522 (9)	324 (4)	ms212L	TGC	TGG	TCG	ACT	ACT	TCG	GCA	A		
				ms212R	ACT	ACG	AGA	ACG	ACC	CGG	TGT	T		
ms213	103	640 (5)	221 (1)	ms213L	CTG	GGC	AAG	TGT	TGG	TGG	ATC			
				ms213R	TGG	CGT	ACT	CCG	AGC	TGA	TG			
ms214	115	426 (3)	655 (5)	ms214L	AAA	CGC	TGT	TCG	CCA	ACC	TCT	A		
				ms214R	CCA	TCA	TCC	TCC	TAC	TGG	GTT			
ms215	129	765 (4)	507 (2)	ms215L	GAC	GAA	ACC	CGT	CGC	GAA	CA			
				ms215R	CTG	TAC	AAC	GCC	GAG	CCG	TA			
ms216	113	543 (3)	315 (1)	ms216L	ACT	ACT	ACG	TCG	AAC	ACG	CCA			
				ms216R	GAT	CGA	AGA	CAA	GAA	CCT	CG			
ms217	109	606 (2)	933 (5)	ms217L	TTC	TGG	CTG	TCG	CGA	CTG	AT			
				ms217R	GAA	CAG	CGT	CTT	TTC	CTC	GC			
ms222	101	390 (2)	391 (2)	ms222L	AGA	GGT	GCT	TAA	CGA	CGG	AT			
				ms222R	TGC	AGT	TCT	GCG	AGG	AAG	GCG			
ms223	106	454 (4)	453 (4)	ms223L	TTG	GCA	ATA	TGC	CGG	TTC	GC			
				ms223R	TGA	GCT	GAT	CGC	CTA	CTG	G			

* taille du produit amplifié par PCR, les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de répétitions du microsatellite.

IV. Quantification des ARNm par RT-PCR en temps réel

1. Extraction des ARN totaux et synthèse d'ADNc

Une culture de la nuit est diluée au 1/100 dans du bouillon MH puis incubée sous agitation à 37°C jusqu'à une A_{650} de 1 environ. Les ARN totaux sont alors extraits à l'aide du kit Qiagen Rneasy (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. Après traitement à l'ADNase (RQ1 Dnase, Proméga) durant 30 mn à 37°C, les protéines sont extraites par un mélange phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1 ; v/v/v). L'ARN est ensuite précipité en présence d'éthanol pur (2 vol.) et d'acétate de sodium 3M, pH 5,2 (1/10 vol.). Le culot obtenu est ensuite lavé avec 300 µL d'éthanol à 70°, solubilisé dans 30 µL d'eau dépourvue d'ARNase (Qiagen) puis dosé par spectrophotométrie à 260 nm. La synthèse d'ADNc est réalisée à partir de 2 µg d'ARN total à l'aide des réactifs de transcription inverse (Improm-IITm reaction buffer, ImProm-IITm reverse transcriptase, $MgCl_2$, Promega) et d'hexamères aléatoires utilisés comme amorces (random primers, Promega). Après une incubation de 50 mn à 42°C, l'enzyme est inactivée par 15 mn de chauffage à 70°C. Un contrôle sans transcription inverse est également réalisé sur chaque extrait, nous permettant ainsi de vérifier l'absence de contamination par de l'ADN génomique.

2. Amplification de l'ADNc

Les réactions d'amplification et de quantification de l'expression génique sont réalisées dans l'appareil Rotor-Gene RG3000 (Cobertt Research, Sydney, Australie). La réaction d'amplification en temps réel est effectuée avec 2 µL d'ADNc, 5 µL de SYBR green master mix (QuantiTect SYBR green PCR kit, Qiagen) et 0,6 µM de chaque amorce [tableau 19]. Le volume total du mélange réactionnel est ajusté à 10 µL avec de l'eau dépourvue d'ARNase (Qiagen). Les conditions d'amplification sont les suivantes : 95°C pendant 15 mn suivi de 40 cycles à 95°C – 20 s, 60°C – 20 s, et 72°C – 30 s. L'acquisition des informations s'effectue à chaque cycle au cours de la phase d'hybridation. Par ailleurs, chaque série comporte un témoin sans transcription inverse, un contrôle négatif (eau) et une gamme de dilution (1/10, 1/100 et 1/1000) de la souche de référence PAO1. Celle-ci permet de tracer une droite standard à partir de laquelle l'expression des gènes peut être quantifiée. Après la réaction d'amplification, une

courbe de fusion est établie afin de vérifier la spécificité des produits amplifiés, la formation d'éventuels dimères d'amorces et/ou de contaminations.

3. Quantification de l'expression génique

L'expression des gènes chez les souches étudiées est exprimée selon la méthode décrite par Pfaffl *et al.* (Pfaffl *et al.* 2002¹⁷²). Les niveaux de transcrits chez les souches étudiées sont estimés par comparaison avec un standard interne, le gène de ménage *uvrD* codant une hélicase de type II dont l'expression est supposée constante pendant la phase exponentielle de croissance (Jo *et al.* 2003⁹⁷). Cette méthode de quantification tient compte de l'efficacité (E) des réactions d'amplification du gène étudié ($E_{\text{gène intérêt}}$) et du gène standard *uvrD* (E_{uvrD}), ainsi que des valeurs de CT (*Cycle Threshold*) obtenues pour la souche étudiée ($CT_{\text{uvrD de l'échantillon}}$ et $CT_{\text{gène d'intérêt de l'échantillon}}$) et pour la souche de référence PAO1 ($CT_{\text{uvrD de PAO1}}$ et $CT_{\text{gène d'intérêt de PAO1}}$). La constante CT correspond à un seuil défini comme le premier cycle où une augmentation significative de l'intensité de fluorescence correspondant à la quantité de produit amplifié est observée. Le niveau d'expression génique est calculé grâce à la formule suivante :

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{gène intérêt}})^{\Delta CT_{\text{gène d'intérêt (PAO1-échantillon)}}}}{(E_{\text{uvrD}})^{\Delta CT_{\text{uvrD (PAO1-échantillon)}}}}$$

$$\text{Efficacité (E)} = 10^{-1/\text{pente}}$$

La pente est calculée grâce à une droite étalon construite à partir de la souche PAO1 pour les valeurs de dilution suivantes : 1/10, 1/100 et 1/1000.

Ainsi, les résultats obtenus pour les souches étudiées sont comparés à ceux de la souche de référence PAO1. Les valeurs d'expression géniques présentées dans la partie « Résultats » correspondent à des valeurs moyennes obtenues à partir d'au moins deux extractions d'ARNm indépendantes, à raison de deux mesures par extraction.

Tableau 19. Amorces utilisées pour la quantification de l'expression génique par RT-PCR en temps réel.

Amorces		Séquences nucléotidiques (5'→ 3')								Références
uvrD	uvrD1	CAC	GCC	TCG	CCC	TAC	AGC	A		(Jo <i>et al.</i> 2003 ⁹⁷)
	uvrD2	GGA	TCT	GGA	AGT	TCT	GCT	CAG	C	
mexB	mexB1	ATG	ACC	ATC	ACC	GTG	ACC	TT		Ce travail*
	mexB2	AGA	GTG	GGT	CCT	GGA	TGT	TG		
oprM	oprM1	GAT	CCC	CGA	CTA	CCA	GCG	CCC	CG	(Dumas <i>et al.</i> 2006 ⁴³)
	oprM2	ATG	CGG	TAC	TGC	GCC	CGG	AAG	GC	
mexY	mexY1a	TTA	CCT	CCT	CCA	GCG	GC			(Jeannot <i>et al.</i> 2005 ⁹⁵)
	mexY1b	GTG	AGG	CGG	GCG	TTG	TG			
mexC	mexC3	GTA	CCG	GCG	TCA	TGC	AGG	GTT		(Dumas <i>et al.</i> 2006 ⁴³)
	mexC4	TTA	CTG	TTG	CGC	CGC	AGG	TGA	CT	
mexD	mexD1	GAG	TTC	GCC	AAG	GAA	CTG	TG		(Dumas <i>et al.</i> 2006 ⁴³)
	mexD2	AGC	AGC	CAG	ACG	AAA	CAG	AT		
mexE	mexE1	CCA	GGA	CCA	GCA	CGA	ACT	TCT	TGC	(Dumas <i>et al.</i> 2006 ⁴³)
	mexE2	CGA	CAA	CGC	CAA	GGG	CGA	GTT	CAC C	
mexG	mexG3	GCA	ACT	GGC	TCT	GGC	TGA	CC		(Hocquet <i>et al.</i> 2006 ⁷⁷)
	mexG4	ACG	GCG	GTG	GCG	ATG	TTG	AA		
mexJ	mexJ1	GCT	GTC	CCT	GTT	TTC	CTC	CC		(Hocquet <i>et al.</i> 2006 ⁷⁷)
	mexJ2	CGT	TCT	TTA	CCC	GCT	CGC	CG		
mexV	mexV1	CGT	CAG	CAG	ATC	GCC	CTT	TTC	AGC	(Li <i>et al.</i> 2003 ¹¹⁹)
	mexV2	CGC	TTT	TCG	AGA	TGG	CCT	TGC	TGC	
mexQ	mexQ1	GCA	GGT	GAC	TAC	CGC	CTA	TC		Ce travail*
	MexQ2	ATG	TAC	AGC	ATC	CCC	TCG	AC		
mexZ	mexZ1	CGG	TCT	ACG	GCC	ACT	ACA	AG		Ce travail*
	mexZ2	CGT	TCG	CAC	TTG	AGG	TAG	AG		
mexR	mexR1	CGC	GAG	CTG	GAG	GGA	AGA	AAC	C	(Dumas <i>et al.</i> 2006 ⁴³)
	mexR2	CGG	GGC	AAA	CAA	CTC	GTC	ATG	C	
nalC	nalC1	ATG	GAC	GAG	GAA	ACG	CTC	TA		Ce travail*
	nalC2	AGG	TAG	CAG	GCG	ATG	ATG	TC		
nalD	nalD1	TCA	ACG	AGA	TGC	TCA	ACC	AG		Ce travail*
	nalD2	TCC	AGG	CAG	AGG	TCG	TAG	AG		
PA3719	PA3719-1	CAA	CAA	ACC	GTC	CCG	CAC	CGA		Ce travail*
	PA3719-2	TCA	GTA	GAA	GTG	CTC	GCC	GTA	GAG G	
oprD	oprD1	ATC	TAC	CGC	ACA	AAC	GAT	GAA	GG	(Dumas <i>et al.</i> 2006 ⁴³)
	oprD2	GCC	GAA	GCC	GAT	ATA	ATC	AAA	CG	
PA1129	1129S	ACC	GGT	CTC	AAT	CAC	CTG	AC		Ce travail*
	1129RS	GGG	TCG	AGG	AAG	TAG	AAC	GA		

*Ces amorces ont été choisies à l'aide du logiciel Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>).

V. Analyse protéique

1. Modélisation 3D

La modélisation est effectuée à l'aide du logiciel *Modeller* d'après le modèle AcrB décrit chez *E. coli*. En effet, AcrB est le seul représentant des transporteurs de la famille RND pour lequel 24 structures à haute résolution ont été publiées. L'homologie forte entre AcrB et MexY (50%) a donc permis à l'UMR CNRS 8015 d'obtenir un bon modèle structural de MexY. Ce modèle tridimensionnel nous permet de localiser les substitutions d'acides aminés, préalablement mise en évidence par séquençage, afin de prédire leur impact sur la structure du transporteur.

2. Préparation des membranes totales de *P. aeruginosa*

Le protocole suivi pour l'extraction des membranes totales, externe et interne de *P. aeruginosa* est adapté de celui décrit par Michéa Hamzehpour *et al.* (Hamzehpour *et al.* 1995⁶⁴). Une culture de 200 mL ($A_{650} \sim 1$) est centrifugée 20 mn - 7000 g à 4°C. Le culot obtenu est lavé avec 40 mL de tampon HEPES (10 mM ; pH 7,2), centrifugé 30 mn - 5000 g à 4°C, puis remis en suspension dans 20 mL du même tampon. Les bactéries sont lysées par deux passages successifs dans la presse de French (Bioritech, SLM Amico, Spectronic Instrument, Rochester, USA) à 1500 *psi*. Le lysat obtenu est ensuite centrifugé 30 mn - 5000 g à 4°C afin d'écarter les débris cellulaires. Le surnageant est alors centrifugé 60 mn - 35000 g à 4°C. Le surnageant résultant de cette centrifugation est conservé pour le dosage de l'activité céphalosporinase AmpC. Le culot contenant les membranes totales est, quant à lui, lavé dans du tampon MOPS-NaCl (MOPS 15 mM, NaCl 100 mM ; pH 8) et à nouveau centrifugé (60 mn - 35000 g à 4°C). Le culot est remis en suspension dans 200 μ L de tampon MOPS-NaCl. La concentration en membranes totales est déterminée puis ajustée à 4 mg/mL avec du tampon MOPS 15 mM, pH 8.

3. Préparation des membranes externes de *P. aeruginosa*

L'extraction s'effectue à partir des membranes totales obtenues précédemment. Une solution de Sarkosyl 20% (p/v) est ajoutée pour une concentration finale de 2% (v/v).

Après une incubation de 20 mn à température ambiante, les tubes sont centrifugés 20 mn - 20000 g à 10°C. Le culot contenant les membranes externes est repris dans 50 µL d'EDS. La concentration protéique est déterminée par spectrophotométrie puis ajustée à 2 mg/mL avec du tampon MOPS 15 mM, pH 8.

4. Dosage des protéines - méthode à l'acide bicinchoninique

La réaction de dosage protéique s'effectue par spectrophotométrie à l'aide du kit BCA protein assay® (Interchim, Montluçon, France) avec l'albumine bovine (BSA) comme standard. 50 µL d'échantillon (dilué au 1/10 ou au 1/20) ou 50 µL de solution étalon de BSA sont ajoutés à 1 mL de réactif de travail. Les tubes sont incubés 30 mn au bain-marie à 60°C puis refroidis quelques minutes à température ambiante. La mesure d'absorbance s'effectue à 562 nm. La construction d'une courbe étalon permet de déterminer la concentration protéique de l'échantillon.

5. Dosage de l'activité céphalosporinase AmpC

Le dosage de l'activité céphalosporinase est effectué sur 10 µL et 20 µL de lysat bactérien dilués dans 1 mL d'une solution à 50 µg/mL d'un substrat chromogène (la nitrocéfine), en tampon phosphate (50 mM, pH 7). L'activité céphalosporinase, exprimée en nmoles de substrat hydrolysées par mn et par mg de protéine, est une moyenne réalisée à partir de deux mesures indépendantes de l'absorbance à 482 nm durant 5 mn (cinétique d'hydrolyse de la nitrocéfine).

6. Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les protéines sont dénaturées par chauffage à 100°C durant 3 mn après l'addition d'un tiers de volume de tampon d'échantillon : Tris-HCl 250 mM pH 6,8, glycérol 40% (p/v), SDS 8% (v/v), β-mercaptoéthanol 20% (v/v), bleu de bromophénol 0,08% (p/v). La migration de 10 ou 20 µg de protéines s'effectue dans un gel de concentration puis de séparation renfermant respectivement 5% et 15% d'acrylamide/bis acrylamide 29/1 ou 99/1 selon la méthode de Laemmli (Ausubel *et al.* 2000⁸). L'électrophorèse est réalisée dans un tampon de migration (Tris-HCl 25 mM, glycine 192 mM, SDS 0,1% (p/v), pH 8,3) durant 2 à 4 h (20 mA). Deux migrations sont effectuées en parallèle,

l'une destinée à une coloration au bleu de Coomassie permettant de contrôler la qualité de la préparation et l'uniformité des dépôts et l'autre servant au transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose.

7. Coloration au bleu de Coomassie

Le gel de séparation est fixé dans la solution de lavage 1 (méthanol 50% (v/v), acide acétique 10% (v/v)) durant 5 mn, lavé à l'eau distillée puis coloré durant 2 h sous agitation dans la solution de coloration (bleu de Coomassie 0,2% (p/v), méthanol 50% (v/v), acide acétique 10% (v/v)). Le gel est ensuite décoloré 2 fois durant 1h, puis une nuit dans la solution de lavage 1 et rincé 2 fois durant 1 h dans la solution de lavage 2 (méthanol 10% (v/v), acide acétique 10% (v/v)). Le gel est finalement lavé 2 fois durant 30 mn dans la solution de lavage 3 (glycérol 5% (p/v)) avant d'être séché sous vide à 80°C pendant 1 h.

8. Immuno-détection

Après électrophorèse, le gel de séparation est transféré sous l'influence d'un champ électrique de 100 V pendant 1 h dans un tampon de transfert (Tris base 25 mM, glycine 192 mM, méthanol 20% (v/v)). La membrane est rincée avec du tampon TBS 1X pH 7,5 puis saturée durant 1 h avec une solution de blocage (gélatine 3% (p/v), TBS 1X). La membrane est lavée (TBS 1X, Tween 0,05% (v/v)) durant 10 mn, puis incubée 1 h sous agitation avec une solution d'anticorps de lapin anti-MexY (Hocquet *et al.* 2003⁷⁹), anti-MexB (K. Poole) ou anti-OprM (Ziha-Zarifi *et al.* 1999²⁵²) respectivement diluée au 1/20 000, 1/10 000 et 1/5 000 dans du tampon TBS 1X, Tween 0,05% (v/v), gélatine 1% (p/v). La membrane est à nouveau rincée 3 fois 5 mn (TBS 1X, Tween 0,05% (v/v)), puis incubée avec un anticorps secondaire anti-IgG de lapin marqué à la phosphatase alcaline (Sigma) dilué au 1/20 000 dans une solution identique à la précédente. Les bandes immunoréactives sont révélées à l'obscurité après incubation avec le mélange colorimétrique Tris HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, NBT 0,33 mg/mL (Roche), BCIP 0,165 mg/mL (Roche).

Résultats (1)

Caractérisation de souches de *P. aeruginosa* isolées de patients atteints de mucoviscidose présentant à l'antibiogramme une hypersensibilité aux β -lactamines associée à une résistance aux aminosides.

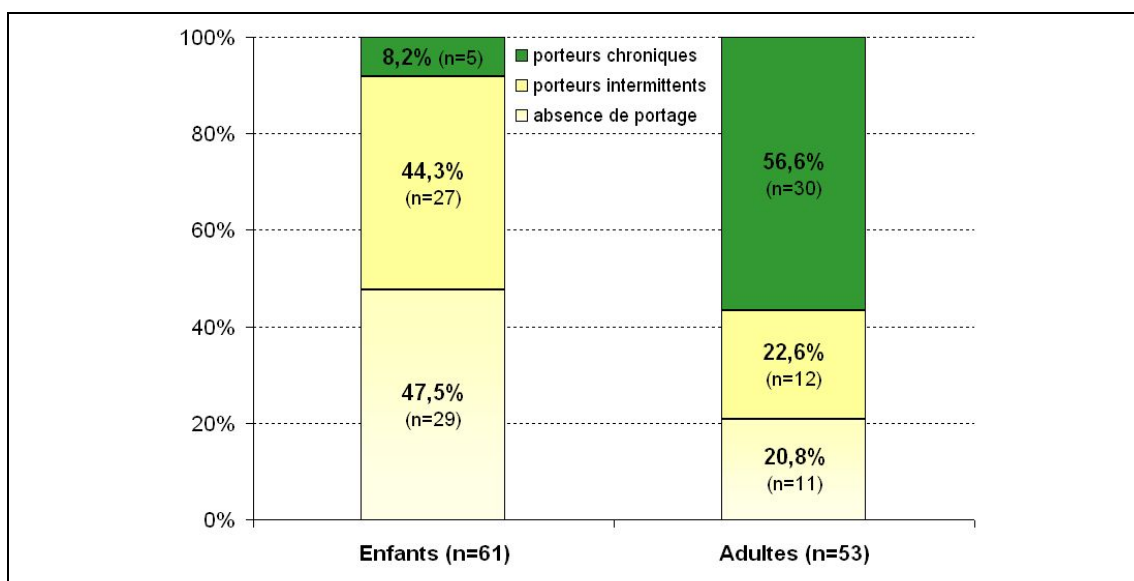


Figure 45. Statut bactériologique des 114 patients atteints de mucoviscidose suivis par le Centre de Ressource et de Compétence de la Mucoviscidose de Besançon (données au 1er mars 2008).

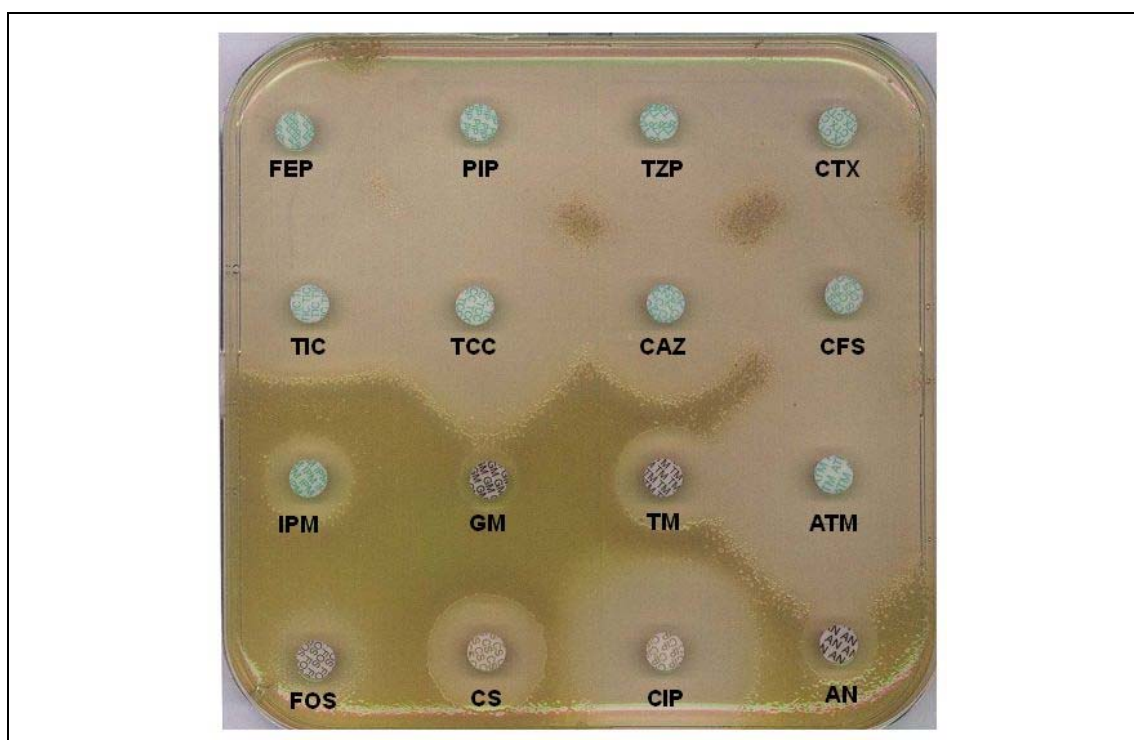


Figure 46. Antibiogramme d'une souche CF de *P. aeruginosa* présentant le phénotype particulier d'hypersensibilité aux β -lactamines et de résistance aux aminosides.

Liste des antibiotiques testés par la technique de diffusion en milieu gélosé : FEP, Céfépime ; PIP, Pipéracilline ; TZP, Pipéracilline/Tazobactam ; CTX, Céfotaxime ; TIC, Ticarcilline ; TCC, Ticarcilline/acide clavulanique ; CAZ, Ceftazidime ; CFS, Cefsulodin ; IPM, Imipénème ; GM, Gentamicine ; TM, Tobramycine ; ATM, Aztréonam ; FOS, Fosfomycine, CS, Colistine ; CIP, Ciprofloxacine ; AN, Amikacine.

I. Contexte clinique de l'étude - Problématique

Le Centre de Ressource et de Compétence de la Mucoviscidose (CRCM) de Besançon assure le suivi régulier de 61 enfants et 53 adultes atteints par cette maladie. Parmi ces 114 patients, 39 sont colonisés de façon intermittente par *P. aeruginosa* alors que 35 se révèlent être porteurs chroniques [figure 45]. L'analyse régulière des populations bactériennes présentes dans les expectorations des malades suivis par le laboratoire de Bactériologie du CHU de Besançon a mis en évidence que les isolats de *P. aeruginosa* pouvaient présenter, de façon conjointe, un phénotype d'hypersensibilité à certaines β -lactamines et de résistance aux aminosides [figure 46]. Comme cela a déjà été démontré, la résistance aux aminosides des souches de *P. aeruginosa* isolées dans le contexte de la mucoviscidose résulte souvent de la surproduction du système d'efflux actif MexXY(OprM) (Islam *et al.* 2004⁸⁹ ; Vogne *et al.* 2004²²⁷). L'observation selon laquelle les souches surproduisant MexXY(OprM) apparaissent hypersensibles à des β -lactamines telles que la ticarcilline permet d'émettre plusieurs hypothèses :

- L'absence de production de la céphalosporinase AmpC pourrait rendre compte de la sensibilité anormale de ces souches vis-à-vis des β -lactamines, soit par un défaut de synthèse de l'enzyme sous forme active, soit par la perte de l'inductibilité de son expression.
- La ticarcilline étant un substrat du système d'efflux actif MexAB-oprM, l'hypersensibilité pourrait également résulter d'un déficit quantitatif en protéines MexA et/ou MexB dû à une baisse de l'expression de l'opéron *mexAB*. Cette sous-expression pourrait, éventuellement, être couplée à la surexpression de *mexXY* par le biais d'un mécanisme de co-régulation transcriptionnelle.
- Le phénotype d'hypersensibilité observé pourrait provenir d'une altération d'origine mutationnelle des protéines de structure MexA et/ou MexB empêchant alors l'assemblage ou le fonctionnement du système MexAB-OprM.

Dans ce travail, nous avons caractérisé les mécanismes conduisant à ce phénotype particulier observé chez des souches isolées CF.

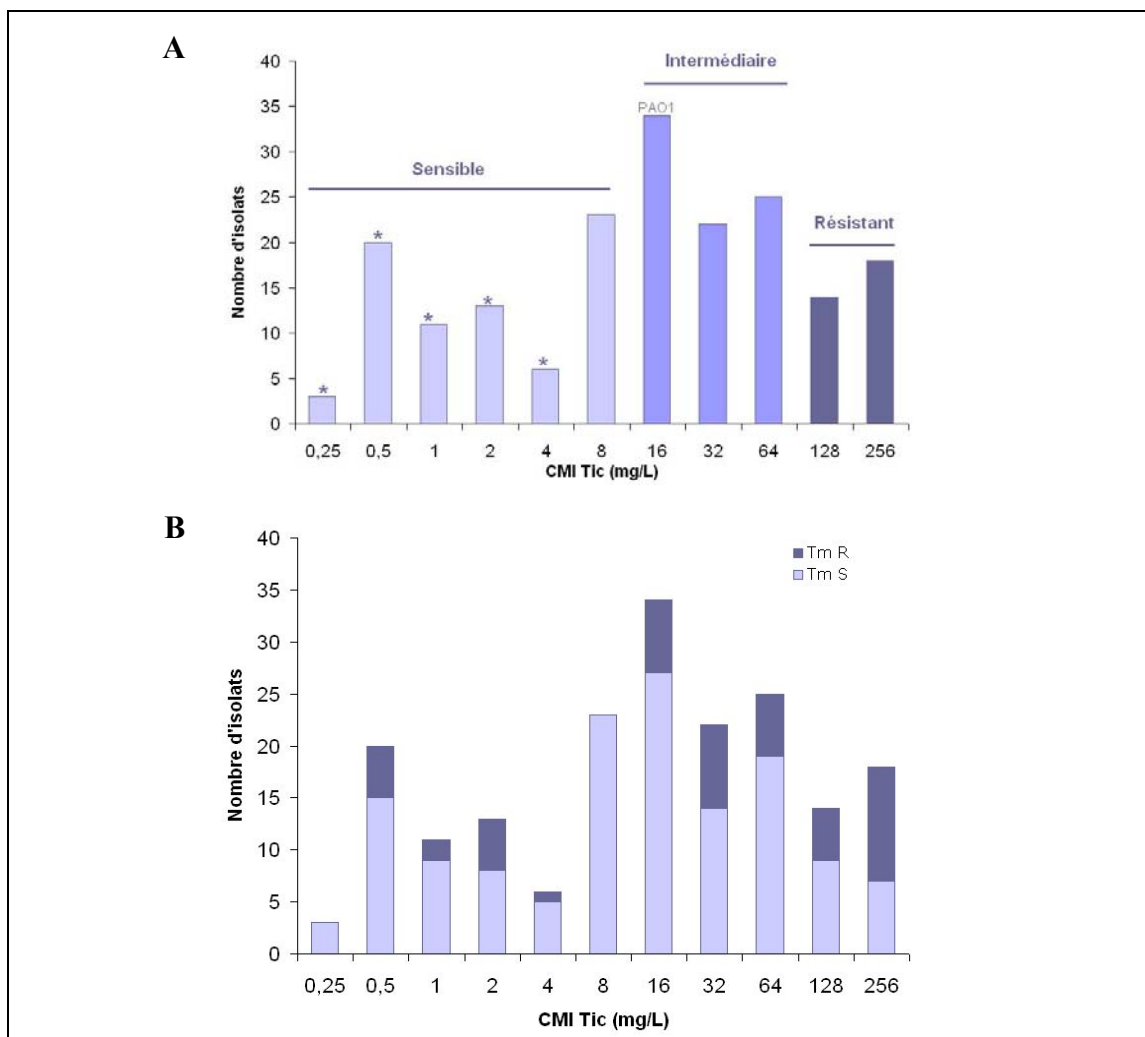


Figure 47. Sensibilité à la ticarcilline et à la tobramycine de 189 souches CF collectées chez 46 patients entre 1998 et 2007.

(A) Distribution des isolats en fonction de leur sensibilité à la ticarcilline d'après les critères du CA-SFM. La CMI de la ticarcilline chez la souche PAO1 est de 16 mg/L ; les isolats 4 fois plus sensibles à la ticarcilline que PAO1 ($\text{CMI} \leq 4 \text{ mg/L}$) sont marqués d'une étoile.

(B) Distribution des isolats en fonction de leur sensibilité à la ticarcilline et à la tobramycine. Le nombre d'isolats résistants à la tobramycine est sensiblement le même (32/53) chez les souches sensibles à la ticarcilline ($\text{CMI} \leq 16 \text{ mg/L}$) que chez les souches intermédiaires ($\text{CMI} \leq 32 \text{ mg/L}$) ou résistantes ($\text{CMI} > 64 \text{ mg/L}$) (98/132).

II. Prévalence des souches hypersensibles à la ticarcilline.

Entre 1998 et 2007, quarante-six patients CF colonisés au niveau bronchique de façon chronique par *P. aeruginosa* (n=31) ou de manière intermittente (n=15), ont été régulièrement suivis par le laboratoire de Bactériologie du CHU de Besançon. L'analyse de 189 isolats, collectés durant cette période, a révélé que 28,04 % (25/46) des patients étaient colonisés par des souches beaucoup plus sensibles à la ticarcilline ($\text{CMI} \leq 4 \text{ mg/L}$) que la souche sauvage sensible de référence PAO1 ($\text{CMI} = 16 \text{ mg/L}$) [figure 47 A]. Ces souches hypersensibles, nommées Tic^{HS}, présentent parallèlement des niveaux variables de résistance aux aminosides actuellement utilisés en thérapeutique tels que la gentamicine, l'amikacine ou encore la tobramycine. Ainsi, 60,4% des souches Tic^{HS} (32/53) sont au minimum 4 fois plus résistantes à la tobramycine que la souche PAO1. Ces 2 phénomènes ne semblent pas être liés puisque la prévalence de la résistance aux aminosides chez les souches présentant des CMI à la ticarcilline supérieures à 8 mg/L est de 72% (98/136) [figure 47 B].

Pour étudier ce phénotype particulier, nous avons sélectionné 11 souches provenant de patients différents et présentant toutes, à l'antibiogramme, une hypersensibilité aux β -lactamines associée à des niveaux variables de résistance aux aminosides. Un génotypage par amplification aléatoire de l'ADN génomique (RAPD) de l'ensemble de ces souches a révélé des profils différents indiquant qu'elles ne sont pas issues d'un même clone transmissible [figure 48].

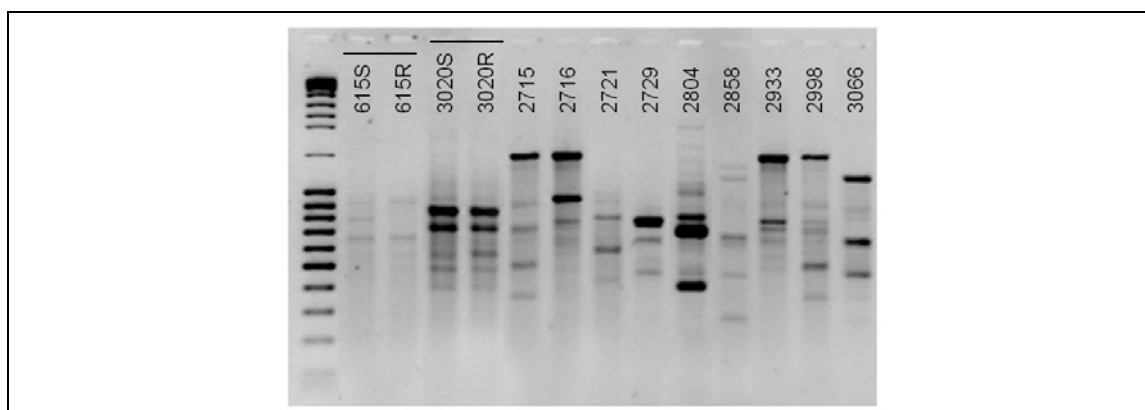


Figure 48. Profils de migration des souches sélectionnées après amplification aléatoire de l'ADN génomique (RAPD) avec l'amorce unique 272.

Les profils d'amplification aléatoire étant différents, les 11 souches sélectionnées ne sont pas issues d'un même clone transmissible, excepté pour les couples isogéniques S/R (615 et 3020).

Tableau 20. Valeurs des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) de différents antibiotiques chez les souches CF de *P. aeruginosa*

CMI (mg/L)													
	Gn	Amk	Tm	Apr	For	Net	Tic	Atm	Tzp	Caz	Fep	Cip	Nov
PAO1	1	2	0,5	8	16	4	32	4	3	1	2	0,25	512
615 S	1	2	0,25	4	8	2	<u>1</u>	<u>0,12</u>	<u>0,5</u>	1	2	4	<u>64</u>
615 R	8	16	2	16	64	16	<u>2</u>	<u>0,25</u>	<u>0,12</u>	1	4	1	<u>4</u>
3020 S	2	2	0,5	8	32	8	16	2	1	1	2	0,25	512
3020 R	16	32	4	128	128	64	<u>2</u>	<u>0,25</u>	<u>0,5</u>	1	4	0,5	<u>16</u>
2715	4	8	2	16	32	8	<u>2</u>	<u>0,5</u>	<u>0,75</u>	1	16	1	<u>16</u>
2716	2	8	1	16	64	8	<u>2</u>	<u>0,25</u>	<u>0,75</u>	1	8	2	<u>32</u>
2721	16	32	4	128	128	64	<u>2</u>	<u>0,25</u>	<u>0,75</u>	0,5	8	1	<u>32</u>
2729	8	16	2	32	128	32	<u>0,5</u>	<u>0,25</u>	1	1	8	1	<u>32</u>
2804	64	128	64	≥ 256	≥ 256	128	<u>0,5</u>	<u>0,25</u>	<u>0,75</u>	2	32	16	<u>8</u>
2858	4	8	1	16	64	8	<u>2</u>	<u>0,25</u>	<u>0,5</u>	4	4	0,5	<u>64</u>
2933	16	32	4	64	256	32	<u>0,5</u>	<u>0,25</u>	<u>0,5</u>	0,5	16	0,5	<u>8</u>
2998	8	16	4	32	128	16	<u>0,5</u>	<u>0,12</u>	<u>0,5</u>	0,5	8	1	<u>32</u>
3066	64	128	16	256	≥ 256	≥ 128	<u>2</u>	<u>0,25</u>	<u>0,38</u>	> 8	32	16	<u>32</u>

Les CMI 4 fois supérieures ou inférieures à celles de la souche PAO1 sont respectivement en gras ou soulignées.

Gn, Gentamicine ; Amk, Amikacine ; Tm, Tobramycine ; Apr, Apramycine ; For, Fortimicine ; Net, Nétilmicine ; Tic, Ticarcilline ; Atm, Aztréonam ; Tzp, Pipéracilline/Tazobactam ; Caz, Ceftazidime ; Fep, Céfépime ; Cip, Ciprofloxacine ; Nov, Novobiocine

Certains patients étant colonisés depuis plusieurs années, le sérotypage de seulement 2/11 souches (2716 et 2729) a pu être obtenu (O:3 et O:11, respectivement). Par ailleurs, 3/11 souches (2715, 2858, 2933) présentaient un aspect mucoïde caractéristique dû à la production d'alginate. Chez 4 patients, le phénotype Tic^{HS} constituait le seul phénotype retrouvé dans la population de *P. aeruginosa* isolée à partir des crachats alors que, chez 7 autres patients, le phénotype Tic^{HS} était associé à d'autres phénotypes de résistance à la ticarcilline (CMI $\geq$ 8 mg/L). Chez un patient, le phénotype Tic^{HS}, modérément résistant aux aminosides (615R), était présent en culture mixte avec une souche génotypiquement identique ayant une sensibilité sauvage vis-à-vis des aminosides (615S). Enfin, chez un autre patient, l'isolat Tic^{HS} (3020R) possédait un parent isogénique (3020S) isolé à partir du même prélèvement et présentant une sensibilité de type sauvage à la ticarcilline et aux aminosides.

Les profils de sensibilité de ces souches aux aminosides (gentamicine, amikacine, tobramycine, apramycine, fortimicine, netilmicine), aux β -lactamines (ticarcilline, aztréonam, pipéracilline/tazobactam, ceftazidime, céfépime) et à d'autres antibiotiques (ciprofloxacine, novobiocine) figurent dans le **tableau 20**. Avec des CMI en moyenne 4 à 64 fois supérieures à celles observées chez la souche sensible de référence PAO1, la majorité des isolats cliniques présentait un niveau de résistance relativement élevé aux aminosides (de 8 à $\geq$ 256 mg/L). L'ensemble des souches montrait également une résistance accrue au céfépime et à la ciprofloxacine. En revanche, ces isolats apparaissaient hypersensibles, non seulement à la ticarcilline, mais également à l'aztréonam et à l'association pipéracilline/tazobactam (CMI en moyenne 8 à 64 fois inférieures à celles observée chez la souche PAO1). Leurs niveaux de sensibilité à la ceftazidime ne présentaient que peu de variation par rapport à celui de PAO1.

III. Etude de l'activité céphalosporinase AmpC

La céphalosporinase AmpC, exprimée à un niveau basal en l'absence d'inducteur chez *P. aeruginosa*, contribue à la résistance naturelle de l'espèce à différentes β -lactamines (Masuda *et al.* 1999¹³⁶). La perte de l'inductibilité de l'expression du gène *ampC* ou la synthèse d'une enzyme inactive pourrait expliquer l'hypersensibilité aux β -lactamines observée chez les isolats sélectionnés. Pour le vérifier, nous avons étudié l'activité et l'inductibilité de cette enzyme par dosage spectrophotométrique de l'hydrolyse d'un substrat chromogène : la nitrocéfine. Les résultats montrent que toutes les souches produisent la céphalosporine AmpC à un niveau basal comparable à celui de la souche PAO1 ($46 \text{ nmol.mn}^{-1}.\text{mg}^{-1}$). La culture en présence de céfoxitine à 50 mg/L a révélé une inductibilité variable selon les isolats cliniques avec toutefois des valeurs relativement proches de celle observée chez PAO1 ($3\ 500 \text{ nmol.mn}^{-1}.\text{mg}^{-1}$) [tableau 21]. A l'exception de la souche 2721, pour laquelle l'activité céphalosporinase après induction par la céfoxitine est faible ($252 \text{ nmol.mn}^{-1}.\text{mg}^{-1}$), l'hypersensibilité observée chez les isolats CF ne semblait pas résulter d'un déficit en β -lactamase AmpC [tableau21, figure 49].

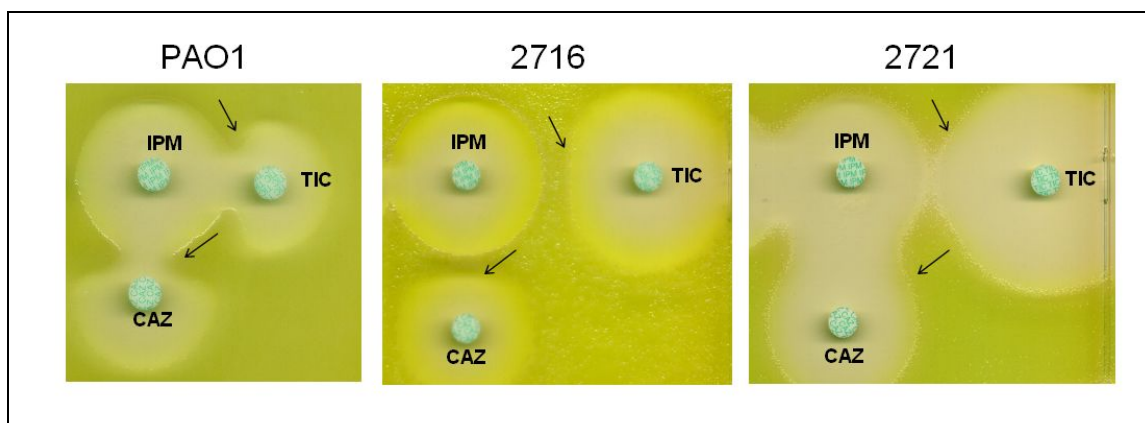


Figure 49. Test d'inductibilité de la céphalosporinase AmpC chez la souche sauvage PAO1 et chez 2 isolats cliniques (2716 et 2721).

Chez PAO1 et 2716, l'inductibilité de la production de la céphalosporinase AmpC se traduit par un antagonisme de l'antibiotique inducteur (imipénème) sur les antibiotiques substrats de AmpC (ticarcilline et ceftazidime). Chez l'isolat 2721 la production de l'enzyme n'est plus inductible.

CAZ, Ceftazidime ; IPM, Imipénème ; TIC, Ticarcilline.

Tableau 21. Dosage spectrophotométrique (A_{482}) de l'activité céphalosporinase AmpC.

Souches	Activité céphalosporinase (nmol.mn ⁻¹ .mg ⁻¹)	
	Sans induction	Avec induction (céfoxitine 50 mg/L – 2 h)
PAO1	46	3 500
615 S	24	945
615 R	14	2 057
3020 S	29	3 686
3020 R	19	9 145
2715	19	5 589
2716	56	4 927
2721	44	252
2729	40	4 322
2804	49	3 717
2858	24	2 808
2933	53	4 967
2998	10	2 883
3066	37	1 637

Le dosage enzymatique a été réalisé à partir d'un lysat bactérien obtenu après culture en présence ou non d'antibiotique inducteur. L'activité céphalosporinase est une moyenne réalisée à partir de 2 mesures.

IV. Implication du système d'efflux actif MexAB-OprM dans le phénotype Tic^{HS}

Comme l'indique le **tableau 20**, l'hypersensibilité à la ticarcilline des 11 souches sélectionnées est également étendue à deux autres β -lactamines antipyocyanique : l'aztréonam et la pipéracilline. En revanche, les souches ne présentaient pas de résistance diminuée à la ceftazidime. Or, le système d'efflux actif MexAB-OprM confère à la bactérie une résistance naturelle modérée à la ticarcilline, aux carbénicillines, à l'aztréonam et à la pipéracilline, mais n'est que très peu impliqué dans la résistance intrinsèque à la ceftazidime (Li *et al.* 1995¹¹⁶ ; Nakae *et al.* 1999¹⁶²). Nous avons donc émis l'hypothèse selon laquelle l'inactivation de ce système pourrait être à l'origine de l'hypersensibilité observée chez les isolats sélectionnés.

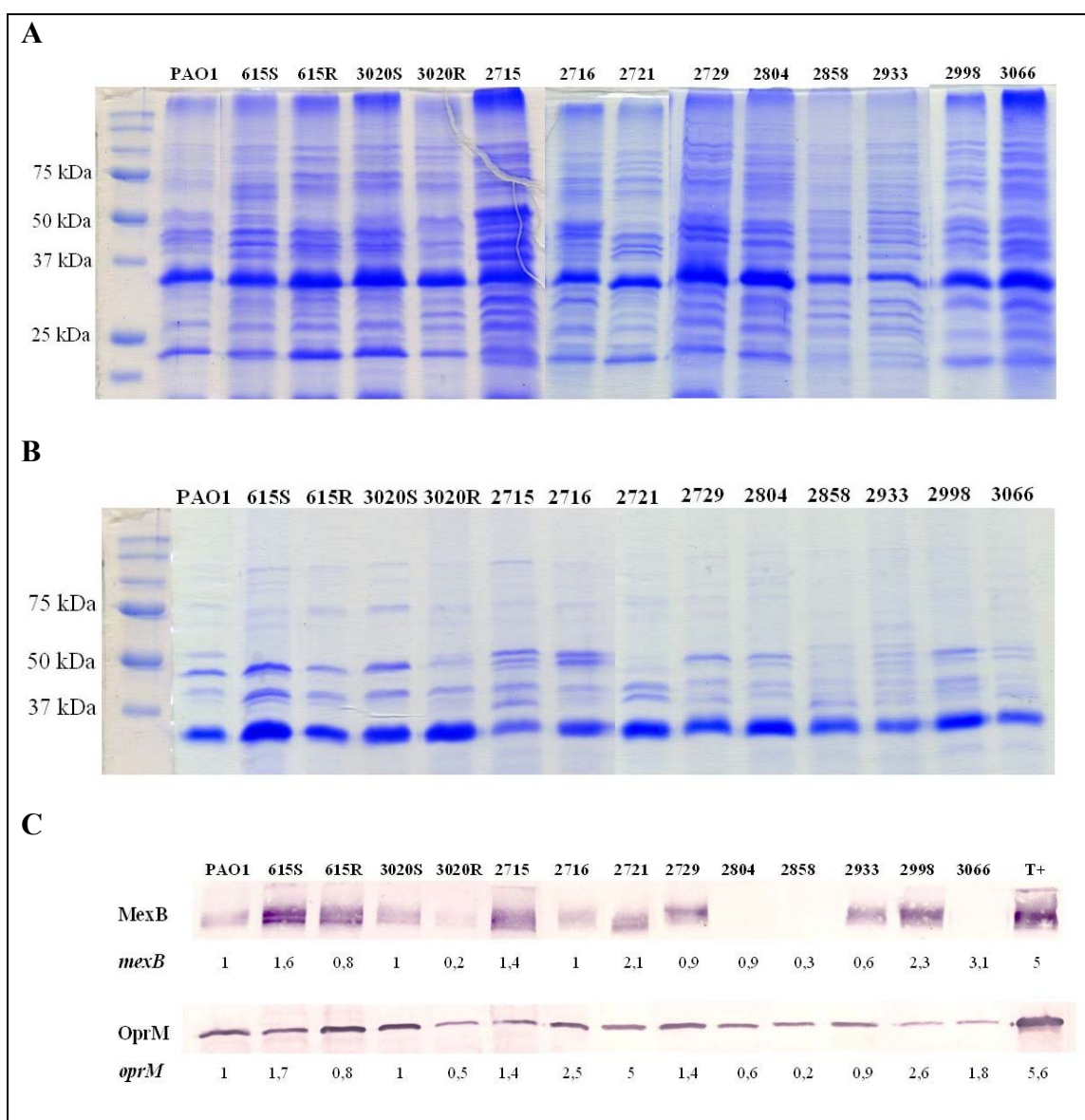


Figure 50. Analyse des protéines membranaires chez les isolats CF Tic^{HS}

(A) Analyse qualitative des protéines de membranes totales après coloration au bleu de Coomassie. La migration de 20 µg de protéines s'effectue dans un gel de concentration puis de séparation renfermant respectivement 5% et 15% d'acrylamide/bis acrylamide 29/1.

(B) Analyse qualitative des protéines de membrane externe après coloration au bleu de Coomassie. La migration de 10 µg de protéines s'effectue dans un gel de concentration puis de séparation renfermant respectivement 5% et 15% d'acrylamide/bis acrylamide 99/1.

(C) Quantification de l'expression des gènes *mexB* et *oprM* par RT-PCR en temps réel et immuno-détection des protéines dans des extraits membranaires. Les valeurs d'expression correspondent à des moyennes obtenues à partir de 4 valeurs de quantification. L'immuno-détection des protéines MexB et OprM est réalisée à partir de 20 µg de protéines de membranes totales (MexB) ou 10 µg de protéines de membrane externe (OprM) après électrophorèse en conditions dénaturantes. La souche PT629 est utilisée comme témoin positif (T⁺).

1. Production du système MexAB-OprM

a. Expression de l'opéron, production des protéines

Afin de préciser le rôle du système MexAB-OprM dans le phénotype Tic^{HS}, nous avons choisi de quantifier par RT-PCR en temps réel l'expression des gènes *mexB* et *oprM*, codant respectivement le transporteur et la protéine de membrane externe et de rechercher les protéines correspondantes dans des extraits de membranes totales ou externes. Le mutant PT629, qui surexprime l'opéron d'efflux *mexAB-oprM* suite à une mutation dans le gène régulateur *mexR* a été utilisé comme témoin positif. Les résultats montrent que l'expression relative (par rapport à PAO1) du gène *mexB* varie assez fortement d'une souche à l'autre (de 0,2 à 3,1) [figure 50 C]. Ainsi, le transcrit correspondant n'est que très peu détecté chez les souches 2858 et 3020R. Les 9 souches restantes présentent, quant à elles, des niveaux d'expression de *mexB* voisins de celui observé chez PAO1. Afin de confirmer le couplage entre l'expression génique et la production protéique, nous avons analysé les protéines de membranes membranaires par électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS PAGE) puis immuno-détection [figure 50 A, B, C]. Dans un premier temps, l'analyse qualitative des gels SDS PAGE colorés au bleu de Coomassie a révélé des variations dans la composition en protéines des membranes totales et des membranes externes entre les isolats résistants (615R et 3020R) et leurs parents isogéniques sensibles (615S et 3020S). Cette observation suggère la survenue de remaniements membranaires chez les souches CF. Par la suite, le marquage des protéines MexB et OprM à l'aide d'anticorps spécifiques a confirmé les résultats obtenus par RT-PCR. Ainsi, nous avons pu constater (i) des quantités de protéines MexB et OprM plus faibles chez la souche 3020R que chez son parent isogénique 3020S et (ii) une absence de production de la protéine MexB chez la souche 2858. L'immunodétection a également mis en évidence que la protéine MexB n'est pas produite chez les souches 2804 et 3066 pour lesquelles les niveaux d'expression de *mexB* sont pourtant significatifs (0,9 et 3,1).

b. Etude des gènes régulateurs de *mexAB-oprM*

La régulation de l'expression de l'opéron *mexAB-oprM* implique au moins deux répresseurs (MexR et PA3574) (Evans *et al.* 2001⁴⁷ ; Morita *et al.* 2006¹⁵⁴) et une protéine activatrice capable de neutraliser l'action de MexR (PA3719) (Daigle *et al.*

2007³²) [Figure 51]. Nous avons donc recherché si la sous-expression de *mexAB-oprM* chez les souches 2858 et 3020R résultait de la surproduction d'un des deux répresseurs ou d'un déficit dans l'activateur PA3719. L'expression des gènes *mexR* et *PA3574* chez les souches 2858 et 3020R ne s'est pas avérée supérieure à celle de la souche PAO1 [Figure 51]. De la même façon, aucune différence significative dans l'expression du gène *PA3719*, ou du gène *PA3720* (qui régule négativement l'expression de *PA3719*) n'a été observée entre les souches 2858, 3020S, 3020R et PAO1 [Figure 51]. Aucune mutation significative n'a été détectée dans le gène *PA3719* chez les isolats 2858 et 3020R.

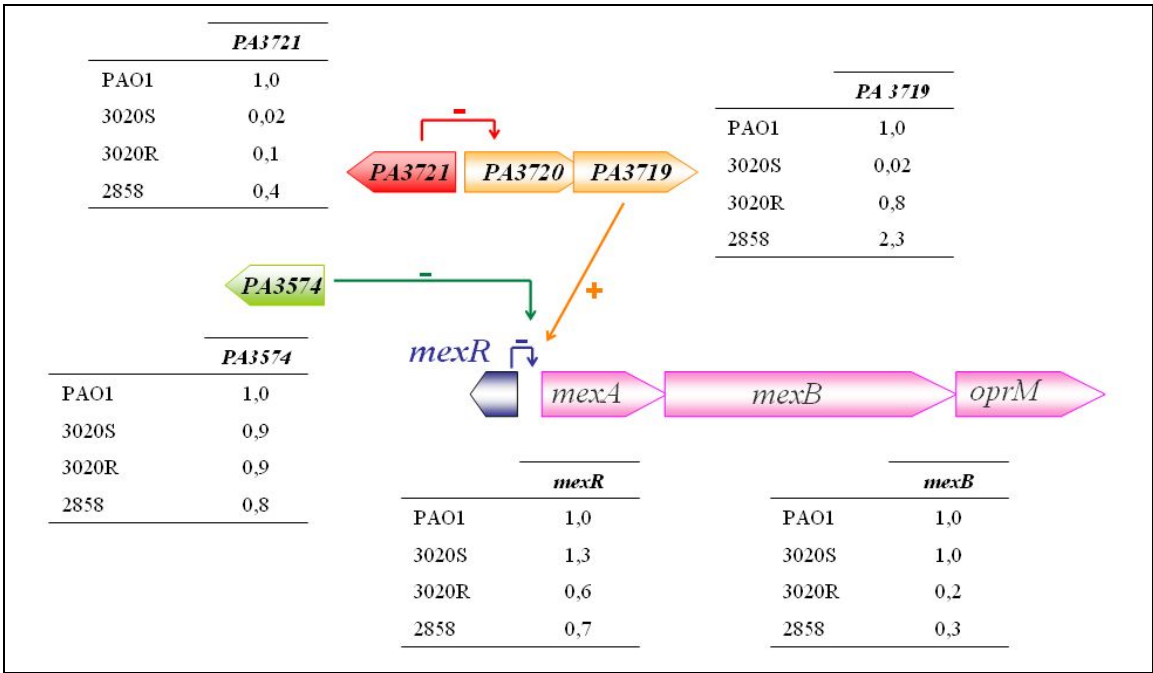


Figure 51. Quantification des transcrits des gènes codant les protéines régulatrices de *mexAB-oprM* chez 2 souches sauvages (PAO1, 3020S) et 2 souches *Tic^{HS}* (3020R, 2858) sous-exprimant l'opéron.

L'expression de l'opéron *mexAB-oprM* est réprimée par les protéines codées par les gènes *mexR* et *PA3574*. En revanche, on observe une surexpression de *mexAB-oprM* lorsque le polypeptide codé par le gène *PA3719* se lie au répresseur MexR. Les niveaux des transcrits détectés chez les souches 2858 et 3020R ne peuvent expliquer la sous-expression de *mexAB-oprM*.

c. Etude de la co-régulation de MexAB-OprM avec d'autres systèmes d'efflux

Différentes études ont mis en évidence une réduction de l'activité du système MexAB-OprM lorsque d'autres systèmes d'efflux actif étaient surproduits tels que MexCD-OprJ ou MexEF-OprN (Li *et al.* 2000¹¹⁴). Nous avons donc quantifié l'expression des gènes

mexC et *mexE* par RT-PCR en temps réel chez ces souches cliniques sans pour autant détecter de surexpression comparativement aux mutants EryR et PAO7H [tableau 22].

Par ailleurs, nous avons mesuré les transcrits des transporteurs des systèmes MexJK/OprM, MexGHI-OmpD et MexVW/OprM avec des résultats similaires aux précédents, à savoir une expression proche de celle observée chez la souche de référence PAO1 sauf pour *mexG* chez l'isolat 615S (322 fois la valeur de PAO1) [tableau 22]. Cependant aucune co-régulation n'a été rapportée entre MexGHI-OmpD et MexAB-OprM.

2. Intégrité du système d'efflux MexAB-OprM

Une des hypothèses que nous avons émises pour expliquer le phénotype Tic^{HS} était la survenue de modifications délétères empêchant le fonctionnement normal du système MexAB-OprM. De fait, la protéine MexB n'a pu être mise en évidence par immunodétection chez les souches 2804 et 3066 malgré des niveaux d'expression significatifs du gène *mexB* et une production normale de la protéine OprM. Le séquençage du gène *mexB* a alors révélé la délétion G₂₁₄₇ chez la souche 2804 et la substitution G₂₃₆₄A chez la souche 3066. Ces deux mutations conduisent à la création de codons stop prématurés ; les protéines qui en résultent, constituées respectivement de 720 et 788 acides aminés, sont donc tronquées en partie C-terminal et dépourvues de leurs 5 derniers segments transmembranaires (TMS) [figure 52].

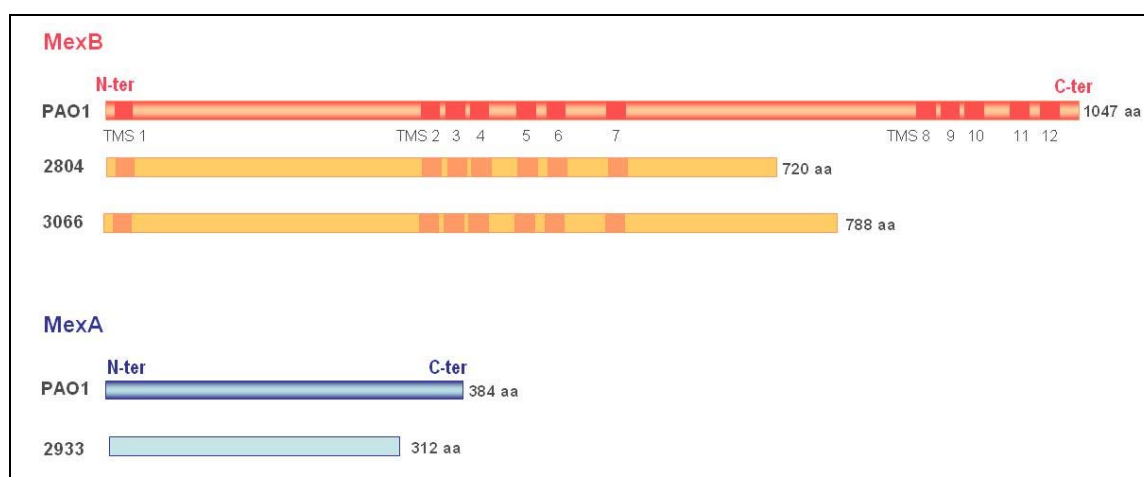


Figure 52. Représentation schématique des protéines MexB et MexA produites par les souches 2804, 3066 et 2993.

Les souches 2804 et 3066 produisent des protéines MexB tronquées de 720 et 788 acides aminés (au lieu de 1047) chez lesquelles les 5 derniers segments transmembranaires (TMS) sont absents. La souche 2993 produit quant à elle une protéine MexA tronquée (312 acides aminés au lieu de 384).

Les travaux portant sur la fonctionnalité du système d'efflux MexAB-*oprM* ont montré que les substitutions d'acides aminés dans des zones spécifiques de la protéine MexB n'étaient pas les seules à affecter l'assemblage ou le fonctionnement de la pompe mais que des mutations dans MexA pouvaient également être délétères pour le système d'efflux (Nehme and Poole 2007¹⁶⁴). C'est ainsi que le séquençage de l'opéron *mexAB-oprM* a été étendu à l'ensemble des isolats CF Tic^{HS}. En dehors de 2804 et 3066 (*cf ci-dessus*), seule une autre mutation correspondant à la délétion d'une base (C₈₇₀) dans le gène *mexA*, a pu être identifiée chez la souche 2933. La rupture du cadre de lecture qui en résulte aboutit à la production d'une protéine tronquée inactive [**figure 52**].

Chez les souches restantes, le séquençage n'a révélé aucune autre mutation et a mis en évidence que l'opéron *mexAB-oprM* est très conservé chez les souches clinique par rapport à la séquence de souches de référence PAO1, PA14 et PAO7H (www.pseudomonas.com).

Tableau 22. Quantification de l'expression des gènes codant les protéines de différents systèmes d'efflux actif

Quantification de l'expression génique									
	mexB	oprM	mexY	mexC	mexD	mexE	mexJ	mexG	mexV
PAO1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
615S	1,6 (0,37)	1,7 (0,33)	0,4 (0,23)	6,3 (0,85)	7,9 (0,62)	4,5 (0,28)	5,4 (0,30)	322 (18)	0,6 (0,08)
615R	0,8 (0,11)	0,8 (0,01)	36,5 (5,77)	11,1 (0,82)	13,0 (2,19)	56,3 (5,97)	7,1 (0,40)	3,8 (0,02)	1,7 (0,03)
3020S	1,0 (0,25)	1 (0,31)	1,6 (0,19)	4,0 (0,09)	4,3 (0,56)	28,6 (7,67)	1,9 (0,23)	2,6 (0,34)	0,7 (0,01)
3020R	0,2 (0,05)	0,5 (0,25)	11,4 (0,56)	53,6 (4,50)	51,8 (5,17)	3,8 (1,80)	10,2 (1,09)	2,0 (0,39)	0,5 (0,03)
2715	1,4 (0,25)	1,4 (0,36)	17,2 (2,20)	16,4 (1,56)	17,7 (1,13)	29,7 (11,13)	0,7 (0,04)	1,8 (0,14)	0,4 (0,06)
2716	1,0 (0,21)	2,5 (0,50)	45,7 (7,55)	9,4 (0,88)	7,0 (0,29)	7,9 (1,98)	8,6 (0,29)	3,2 (0,23)	1,0 (0,02)
2721	2,1 (0,20)	5,0 (0,32)	58,8 (8,73)	14,9 (0,24)	14,5 (1,71)	19,3 (1,26)	1,8 (0,08)	2,7 (0,07)	0,6 (0,22)
2729	0,9 (0,09)	1,4 (0,13)	26,9 (2,63)	5,2 (1,10)	2,7 (0,89)	12,7 (3,31)	3,8 (0,60)	1,0 (0,22)	0,5 (0,08)
2804	0,9 (0,09)	0,6 (0,09)	41,6 (5,66)	0,2 (0,05)	7,9 (2,67)	17,4 (2,81)	2,3 (0,36)	3,8 (0,14)	0,9 (0,13)
2858	0,3 (0,03)	0,2 (0,03)	26,4 (4,68)	4,8 (0,58)	5,2 (0,50)	23,4 (9,01)	9,6 (1,97)	2,1 (0,25)	0,6 (0,12)
2933	0,6 (0,19)	0,9 (0,15)	36,2 (2,55)	14,1 (1,34)	54,2 (9,08)	5,5 (0,67)	5,8 (0,26)	2,9 (0,06)	0,4 (0,02)
2998	2,3 (0,29)	2,6 (0,63)	26,4 (1,62)	35,0 (0,56)	25,4 (0,33)	78,9 (18,10)	6,0 (0,22)	1,3 (0,14)	1,1 (0,05)
3066	3,1 (0,32)	1,8 (0,03)	48,9 (6,51)	15,8 (0,64)	10,8 (1,12)	14,6 (0,50)	3,2 (0,06)	2,9 (0,01)	1,1 (0,09)
Témoin*	5,0 (0,14)	5,6 (0,23)	62,4 (3,94)	1075 (174)	857 (21)	1561 (123)	ND	ND	ND

Les valeurs figurant dans ce tableau correspondent à des moyennes calculées à partir de 4 mesures. L'écart moyen est indiqué entre parenthèses à côté de la valeur de quantification. Cette dernière est en italique lorsque l'expression du gène est inférieure à la valeur de 1 observée chez PAO1.

*Le mutant PT629 est utilisé comme témoin positif pour la quantification de *mexB* et *d'oprM*, le mutant EryR pour la quantification de *mexC* et *mexD*, le mutant *MutGr1* pour *mexY* et le mutant PAO7H pour la quantification de *mexE*.

ND : non déterminé.

3. Fonctionnalité du système MexAB-OprM

Certains isolats (615R, 2715, 2716, 2721, 2729 et 2998), bien que produisant une protéine MexB normale, apparaissent hypersensibles aux β -lactamines comme si le système d'efflux était non fonctionnel. Afin de vérifier la fonctionnalité de MexAB-OprM, nous avons choisi d'inactiver par recombinaison homologue le gène *mexB* codant le transporteur du système [figure 53] et de vérifier l'impact de cette inactivation sur le niveau de résistance à différentes β -lactamines substrats du système.

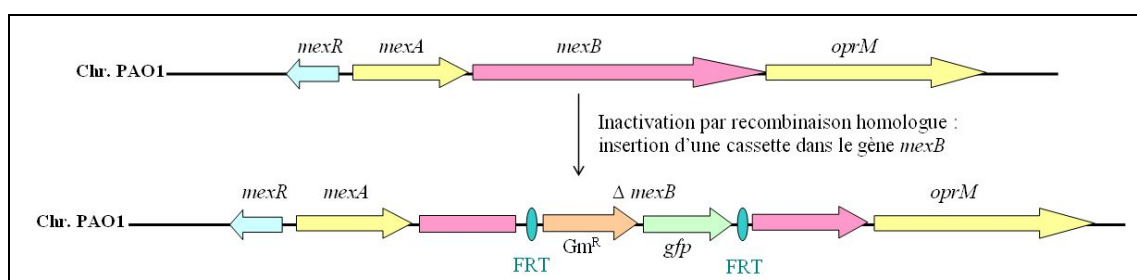


Figure 53. Stratégie utilisée pour inactiver le gène *mexB* par recombinaison homologue.

FRT : Flipase recombinase target, *Gm^R* : gène de résistance à la gentamicine, *gfp* : gène codant la Green Fluorescent Protein (cf Matériel et Méthodes).

L'inactivation du gène *mexB*, par insertion d'une cassette comportant un gène de résistance à la gentamicine et le gène codant la GFP, a été réalisée avec succès chez 9 des 11 isolats Tic^{HS}. Après inactivation, les niveaux de résistance de la ticarcilline, l'aztréonam et la novobiocine, 3 substrats de MexAB-OprM, ont été déterminés [tableau 23]. L'analyse des CMI montre que l'inactivation de *mexB* chez la souche de référence PAO1 entraîne une diminution des niveaux de résistance d'un facteur 16 pour la novobiocine, d'un facteur 32 pour l'aztréonam et d'un facteur 64 pour la ticarcilline. En revanche, l'inactivation de *mexB* n'a que très peu, voire pas d'effet chez les isolats cliniques puisque seules les souches 2715 et 2933 voient leur résistance aux 3 agents diminuer d'un facteur 2. Ce résultat renforce l'idée que le système MexAB-OprM, bien que produit, n'est pas fonctionnel chez les souches Tic^{HS}. Cette hypothèse est confortée par le fait que l'ensemble des isolats Tic^{HS} présente une sensibilité accrue à la novobiocine, antibiotique connu pour être spécifiquement exporté par MexAB-OprM (Li *et al.* 2000¹¹⁸ ; Maseda *et al.* 2000¹³⁵).

Tableau 23. CMI de 3 substrats du système MexAB-OprM, avant et après inactivation du gène *mexB*.

	CMI (mg/L)					
	Tic		Atm		Nov	
	<i>mexB</i> ^a	<i>MexB::FRT</i> ^b	<i>mexB</i>	<i>MexB::FRT</i>	<i>mexB</i>	<i>MexB::FRT</i>
PAO1	32	0,5	4	0,12	512	32
615S	1	- ^c	0,12	- ^c	64	- ^c
615R	2	2	0,25	0,25	4	4
3020S	16	2	2	0,25	512	8
3020R ^d	2	2	0,25	0,25	16	16
2715	2	1	0,5	0,25	16	8
2716	2	1	0,25	0,25	32	32
2721	2	1	0,25	0,12	32	32
2729	0,5	0,5	0,25	0,25	32	32
2804 ^e	0,5	- ^c	0,25	- ^c	8	- ^c
2858 ^d	2	- ^c	0,25	- ^c	64	- ^c
2933 ^e	0,5	0,25	0,25	0,12	8	4
2998	0,5	0,5	0,12	0,12	32	32
3066 ^d	2	2	0,25	0,25	32	32

Tic, Ticarcilline ; Atm, Aztréonam ; Nov, Novobiocine.

^a *mexB* : souches CF sauvages ;

^b *mexB::FRT* : souches CF avec *mexB* inactivé ;

^c pas de recombinaison obtenue,

^d souches présentant une expression réduite de *mexB*,

^d souches produisant des protéines *MexB* tronquées,

^e souche produisant une protéine *MexA* tronquée.

Tableau 24. Mécanismes défaillants impliquant l'hypersensibilité aux β -lactamines chez les isolats CF.

	CMI Tic (mg/L)	AmpC non inductible	Efficacité du système d'efflux MexAB-OprM			
			RT-PCR	Δ MexA	Δ MexB	?
			<i>mexB</i>			
615R ^b	2	- ^a	-	-	-	X
3020R	2	-	0,2	-	-	
2715 ^b	2	-	-	-	-	X
2716 ^b	2	-	-	-	-	X
2721	2	X	-	-	-	
2729 ^b	0,5	-	-	-	-	X
2804	0,5	-	-	-	Δ 1nt (2147)	
2858	2	-	0,3	-	-	
2933	0,5	-	-	Δ 1nt (870)	-	
2998 ^b	0,5	-	-	-	-	X
3066	2	-	-	-	G2364A (stop)	

Tic, Ticarcilline ; nt, nucléotide.

^a pas de différence significative par rapport à PAO1 ;

^b souches produisant un système MexAB-OprM a priori non fonctionnel, sans mutation dans l'opéron *mexAB-oprM*.

4. Conclusion : MexAB-OprM et phénotype Tic^{HS}

Le phénotype d'hypersensibilité a ainsi pu être élucidé chez 5 isolats. Il reposait soit sur la sous-expression du gène *mexB* (n=2), soit sur la production de protéines MexB (n=2) ou MexA (n=1) altérées. Les autres isolats (n=6), produisent un système MexAB-OprM *a priori* intact, mais non fonctionnel [tableau 24].

V. Implication du système MexXY(OprM) dans la résistance aux aminosides

Comme l'indique le **tableau 20**, les isolats Tic^{HS} sélectionnés pour l'étude présentaient des niveaux de résistance variables à la gentamicine (CMI de 2 à 64 mg/L), la tobramycine (CMI de 1 à 64 mg/L) et l'amikacine (CMI de 8 à 128 mg/L). Cette résistance, parfois élevée, s'étendait à des aminosides peu sensibles à l'action des enzymes modificatrices tels que la fortimicine (CMI de 32 à 256 mg/L) et l'apramycine (CMI de 16 à 256 mg/L). De plus, l'ensemble des souches affichait une résistance accrue au céfépime (CMI de 4 à 32 mg/L) et à la ciprofloxacine (CMI de 0,5 à 16 mg/L), compatible avec la surproduction du système d'efflux actif MexXY(OprM) (Aires *et al.* 1999²).

1. Surproduction du système MexXY(OprM)

L'implication du système d'efflux actif MexXY(OprM) dans la résistance aux aminosides a déjà été décrite chez des souches de *P. aeruginosa* isolées de patients atteints de mucoviscidose (Islam *et al.* 2004⁸⁹ ; Vogne *et al.* 2004²²⁷). En conséquence, nous avons étudié l'expression du gène *mexY*, codant la pompe du système, par RT-PCR en temps réel chez les 11 souches isolées. Le mutant MutGr1 surexprimant l'opéron d'efflux suite à une mutation dans le gène régulateur *mexZ* a été utilisé comme témoin positif. La quantification révèle une faible expression du gène *mexY* chez les souches sensibles PAO1, 615S et 3020S et une expression nettement augmentée (de 11,4 à 58,8 fois) chez les souches résistantes aux aminosides [figure 54]. Afin de confirmer ces résultats nous avons analysé la production de la protéine MexY par

western blot dans des extraits de membranes totales. Comme le montre la **figure 54**, les souches sensibles ne produisent pas ou peu MexY. En revanche, la protéine est détectée chez l'ensemble des souches résistantes aux aminosides ainsi que chez le mutant MutGr1, confirmant ainsi les données de RT-PCR.

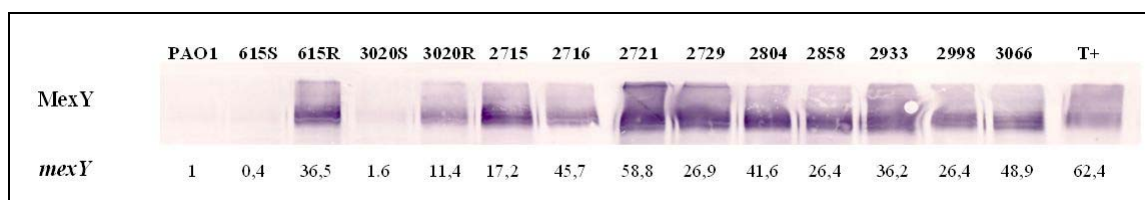


Figure 54. Quantification de l'expression du gène *mexY* par RT-PCR en temps réel et immuno-détection de la protéine dans des extraits membranaires.

Les valeurs d'expression du gène *mexY* correspondent à des moyennes obtenues à partir de 4 valeurs de quantification. L'immuno-détection de la protéine MexY est réalisée sur des préparations de membranes totales après électrophorèse en conditions dénaturantes ; chaque piste contient 20 µg de protéines. Le mutant MutGr1 est utilisé comme témoin positif (T⁺).

Partant du fait que l'expression de l'opéron *mexXY* peut être augmentée de façon stable chez les isolats CF présentant des mutations dans le gène répresseur *mexZ* (Islam *et al.* 2004⁸⁹ ; Vogne *et al.* 2004²²⁷), nous avons entrepris le séquençage de ce gène. L'analyse de la séquence a révélé des mutations significatives chez 5/11 souches (mutants *agrZ*) mais pas chez les 6 autres, ce qui indique que d'autres loci peuvent être impliqués dans le contrôle de *mexXY* (mutants *agrW*) [tableau 25].

Tableau 25. Mutations mises en évidence dans le gène *mexZ* chez les isolats étudiés.

Souches	Mutations dans <i>mexZ</i> *	Type de mutant
PAO1	-	-
615S	-	-
615R	Δ386 nt (A ₂₄₈ → A ₆₃₃)	<i>agrZ</i>
3020S	-	-
3020R	-	<i>agrW</i>
2715	-	<i>agrW</i>
2716	-	<i>agrW</i>
2721	-	<i>agrW</i>
2729	Δ15 nt (C ₅₉₅ → C ₆₀₉)	<i>agrZ</i>
2804	Δ81 nt (C ₂₁₇ → C ₂₉₇) + IS <i>Pa1635</i>	<i>agrZ</i>
2858	-	<i>agrW</i>
2933	-	<i>agrW</i>
2998	+ 1 nt en position 27	<i>agrZ</i>
3066	Δ25 nt (C ₂₁₇ → G ₂₄₁)	<i>agrZ</i>

* positionnement des mutations par rapport à la séquence de PAO1

2. Contribution de MexXY(OprM) à la résistance aux aminosides

Chez le mutant MutGr1 qui dérive de la souche de référence PAO1 et surexprime le système MexXY(OprM) les CMI de la gentamicine sont habituellement comprises entre 2 et 4 mg/L (Vogne *et al.* 2004²²⁷), valeurs proches des niveaux de résistance observés chez MutGr1 ou chez des souches cliniques *agrZ* ou *agrW* (Llanes *et al.* 2004¹²³) mais bien inférieures à celles de certaines souches CF de cette étude (CMI de 16 à 64 mg/L) [figure 55]. Dans des études antérieures nous n'avons pas retrouvé de relation proportionnelle entre (i) le niveau d'expression de l'opéron *mexXY*, (ii) le niveau de production de la protéine MexY et (iii) les CMI des aminosides (Llanes *et al.* 2004¹²³). Par exemple, chez les isolats 2804 et 3066, hautement résistants aux aminosides, le niveau d'expression de *mexY* et la production de la protéine MexY apparaissent plus faibles que ceux observés chez la souche 2721, pourtant moins résistante [figure 54].

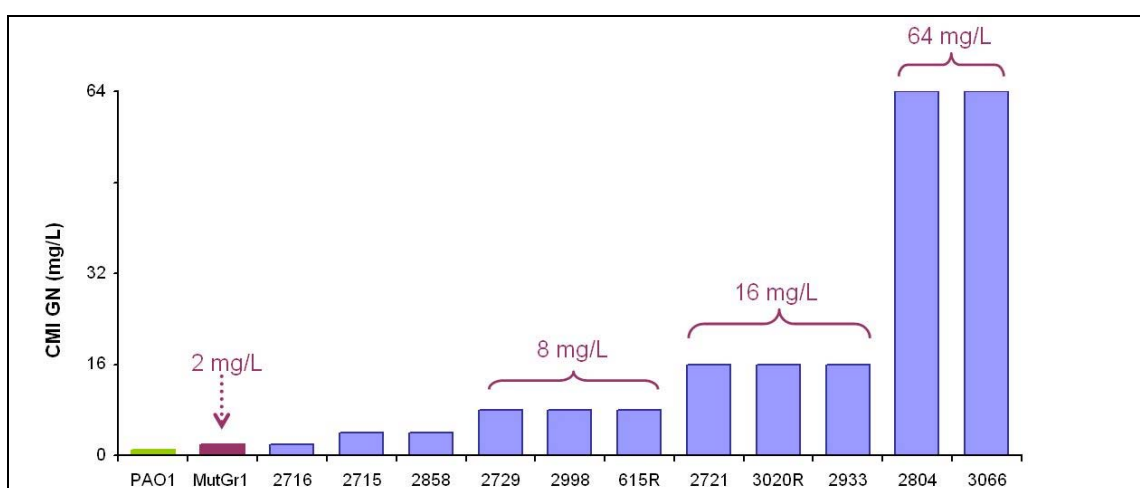


Figure 55. Niveaux de résistance à la gentamicine (GN) des 11 souches cliniques.

PAO1, souche sauvage de référence ; MutGr1, mutant MexXY⁺ dérivant de PAO1.

Les hauts niveaux de résistance observés chez les isolats 2804 et 3066 suggèrent l'existence de mécanismes en plus de l'efflux actif, comme par exemple des mutations dans les constituants ribosomaux ou la modification de la structure des LPS (El'Garch *et al.* 2007⁴⁴). Pour préciser la contribution de l'efflux actif dans le phénotype étudié, nous avons choisi de compléter nos souches CF par le gène *mexZ* cloné dans un vecteur plasmidique (pAZ17) pour réprimer fortement l'expression de l'opéron *mexXY*.

Ce travail a été réalisé avec succès pour toutes les souches à l'exception de l'isolat 2933. Pour les autres souches la répression de *mexXY* s'est accompagnée d'une forte diminution des niveaux de résistance aux aminosides. Avec des CMI de la gentamicine comprises entre 0,125 et 0,5 mg/L, la résistance résiduelle observée chez les isolats CF après complémentation était comparable à celle de la souche PAO1(pAZ17) (CMI de 0,125mg/L) [tableau 26].

Cette faible résistance résiduelle traduit un rôle majeur du système d'efflux actif MexXY(OprM) dans le développement de hauts niveaux de résistance chez les isolats CF étudiés (2721, 2804, 3066). Afin de vérifier si la surproduction du répresseur MexZ à partir du plasmide pAZ17 n'induit pas des effets sur la cellule bactérienne autres que la répression de *mexXY*, nous avons inactivé *mexY* chez quelques isolats grâce au plasmide suicide pUCΔY qui renferme un fragment du gène *mexY* et dont l'intégration dans le génome inactive l'opéron *mexXY* [figure 56]. Les niveaux de résistance sont apparus similaires à ceux observés après complémentation par le plasmide pAZ17 invalidant l'hypothèse que d'autres mécanismes contribuent de façon indépendante de MexXY(OprM) à la résistance aux aminosides chez les isolats CF étudiés [tableau 26].

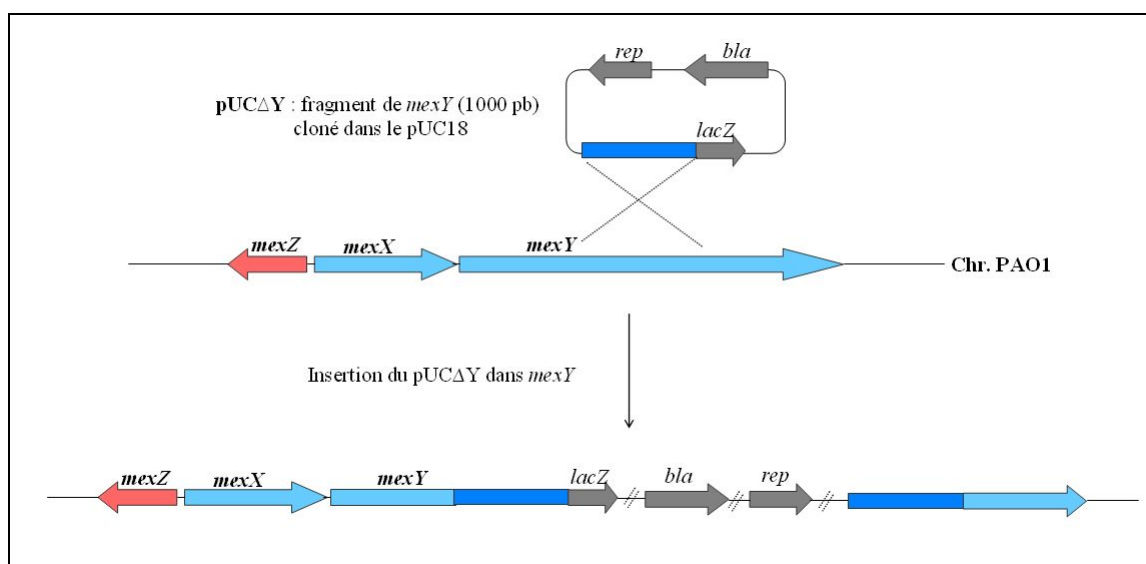


Figure 56. Stratégie utilisée pour inactiver le gène *mexY* par intégration d'un plasmide suicide.

Un fragment du gène *mexY* est amplifié par PCR puis cloné dans le vecteur pUC18. Ce plasmide suicide, incapable de se répliquer chez *P. aeruginosa*, s'intègre par recombinaison homologue dans le gène *mexY* ; cette intégration entraîne alors l'inactivation génique.

Tableau 26. Résistance à la gentamicine après la répression de *mexXY* (pAZ17) ou l'inactivation de *mexY* (pUCΔY).

Souches	CMI Gentamicine (mg/L)			
	Wt ^a	pAK1900 ^b	pAZ17 ^b	pUCΔY
PAO1	1	1	0,125	0,125
615S	1	0,5	0,125	- ^c
615R	8	4	0,125	- ^c
3020S	2	2	0,125	0,125
3020R	16	16	0,25	0,25
2715	4	2	0,125	- ^c
2716	2	- ^c	0,125	- ^c
2721	16	16	0,125	- ^c
2729	8	8	0,25	- ^c
2804	64	64	0,5	0,5
2858	4	4	0,125	- ^c
2933	16	16	- ^c	- ^c
2998	8	4	0,125	- ^c
3066	64	- ^c	0,125	- ^c

^a CMI de la gentamicine avant la répression de *mexXY* ;

^b pour déterminer les CMI de la gentamicine, 50mg/L de ticarcilline sont ajoutés dans le milieu afin de maintenir les plasmides pAK1900 ou pAZ17(codant le répresseur MexZ) ;

^c non déterminé.

3. Fonctionnalité du système MexXY(OprM)

De travaux récents réalisés chez *P. aeruginosa* et *E. coli* indiquent que des substitutions d'acides aminés dans les protéines constituant les systèmes d'efflux RND peuvent modifier : (i) l'affinité de la pompe pour ses substrats (Lomovskaya and Totrov 2005¹²⁴ ; Yu *et al.* 2005²⁴⁶), (ii) la trimérisation de la pompe (Mao *et al.* 2002¹³¹) (iii) l'assemblage de la structure tripartite (Yoneyama *et al.* 2002²⁴³ ; Nehme *et al.* 2004¹⁶³) ou (iv) l'activité de la pompe en perturbant le gradient de protons nécessaire à son fonctionnement (Su *et al.* 2006²¹⁴ ; Takatsuka and Nikaido 2006²¹⁸). Ces mutations qui entraînent une diminution de l'efflux des antibiotiques substrats provoquent une sensibilité accrue de la bactérie. A l'inverse, très peu de travaux relatent une augmentation de la résistance suite à des substitutions d'acides aminés dans les protéines d'efflux. A ce jour, seules deux études ont mis en évidence, dans un cas, un accroissement de l'efflux pour les substrats habituels de la pompe (Bohnert *et al.* 2007¹⁸) et, dans l'autre cas, un élargissement du spectre des substrats (Mao *et al.* 2002¹³¹). En effet, les travaux réalisés par Bohnert *et al.* sur la pompe RND YhiV de *E. coli* ont révélé que la substitution V610F, localisée dans la seconde boucle périplasmique, entraîne, au minimum, une augmentation de la résistance d'un facteur 2

à différents antibiotiques substrats de la pompe (linézolide, tétracycline, clindamycine, chloramphénicol et ciprofloxacine) (Bohnert *et al.* 2007¹⁸). Par ailleurs, l'étude de mutants spontanés de *P. aeruginosa*, menée par Mao *et al.*, a mis en évidence que des substitutions d'acides aminés dans le transporteur MexD, au niveau de la 1^{ère} boucle périplasmique (Q34K, E89K, A292V, P328L) ou dans la seconde boucle (F608S, N673K), ont un impact sur la spécificité de la pompe et permettent au système MexCD-OprJ d'élargir sa gamme de substrats (céfépime, ceftazidime, tétracycline, érythromycine, chloramphénicol et fluoroquinolones) aux β -lactamines du groupe des carbénicillines (Mao *et al.* 2002¹³¹).

Afin de déterminer si des mutations dans les gènes codant le système d'efflux MexXY sont à l'origine de la forte résistance aux aminosides de certains isolats CF, nous avons séquencé l'intégralité de l'opéron *mexXY* chez l'ensemble des souches ainsi que chez les souches 615S et 3020S. A titre de comparaison, ce travail a également été réalisé sur deux souches cliniques non-CF (72.1 et 100.1), sur une souche environnementale sensible (E1) ainsi que sur la souche PA14.

Le séquençage a révélé de nombreuses variations nucléotidiques et d'acides aminés par rapport à PAO1 suggérant, qu'à l'inverse du système MexAB-OprM, les protéines MexX et MexY peuvent évoluer au cours de la colonisation chronique [tableau 27]. Ce travail de comparaison de séquences a montré que certaines des substitutions localisées dans la protéine MexX (A30T, K329Q, L331V et W358R) ou dans MexY (I536V, T543A, G589A, Q840E et N1036T) ne présentent que peu d'intérêt car elles sont retrouvées chez PA14, souche sensible dont le génome a entièrement été séquencé, ainsi que chez des souches d'origine environnementale (E1) ou hospitalière (72.1, 100.1), sensibles ou résistantes aux aminosides. Par ailleurs, des substitutions spécifiques ont été détectées chez 4 souches (615R, 2716, 2721, 2858) dont la résistance à la gentamicine est modérée (CMI comprises entre 2 et 16 mg/L). Ainsi, les substitutions S46G, A596V et K692M sont localisées au niveau des boucles périplasmiques (LPLs) de MexY, supposées intervenir dans la liaison des substrats à la pompe [figure 57]. Toutefois, la résistance modérée observée chez ces souches ne permet pas d'établir une corrélation claire entre ces variations de séquences et une meilleure efficacité de transport du système MexXY(OprM).

Tableau 27. Substitutions d'acides aminés détectées dans les protéines MexX et MexY.

Souches	CMI Gn (mg/L)	mexY ^a	Substitutions d'acides aminés ^b	
			MexX	MexY
<i>Souches témoins</i>				
PAO1	1	1	- ^c	- ^c
E1	1	nd	1, 2, 3, 4	5, 6, 7, 8
72.1	8	24,8	-	5
100.1	8	3,9	2, 3, 4	5, 6, 7
<i>Souches CF</i>				
615S	1	0,4	2, 3, 4	6
615R	8	36,5	2, 3, 4	A254G, Q282R ⁶
3020S	2	1,6	2, 3, 4	6
3020R	16	11,4	2, 3, 4	6
2715	4	17,2	2, 3, 4	6
2716	2	45,7	R351S ^{2,4}	E152D ⁶
2721	16	58,8	L22M, D135Y ^{2,3,4}	S46G, Q282R, A596V, K692M ⁹
2729	8	26,9	2, 3, 4	I536P ⁶
2804	64	41,6	2, 4	F1018L ⁶
2858	4	26,4	1, 2, 3, 4	G1002A ^{6,8}
2933	16	36,2	1, 2, 3, 4	6
2998	8	26,4	2, 3, 4	6
3066	64	48,9	2, 3, 4	F29S

^a expression relative par rapport à PAO1,

^b numérotation de l'acide aminé par rapport à la souche PAO1,

^c séquence identique à celle de PAO1,

¹⁻⁴ substitutions d'acides aminés dans MexX retrouvées chez PA14 : ¹A30T, ²K329Q, ³L331V, ⁴W358R,

⁵⁻⁹ substitutions d'acides aminés dans MexY retrouvées chez PA14 : ⁵I536V, ⁶T543A, ⁷G589A, ⁸Q840E, ⁹N1036T, nd, non déterminé.

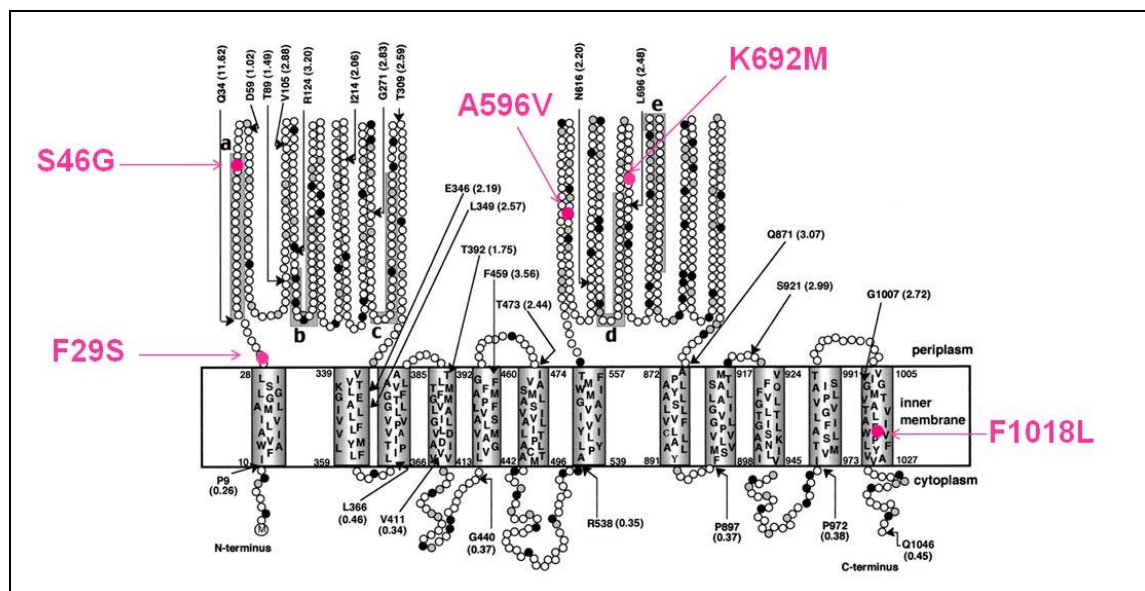


Figure 57. Localisation des substitutions détectées dans la protéine MexY sur un modèle 2D de la pompe MexB décrit par Yonéyama et al. 2002²⁴³

Les substitutions F29S, S46G sont localisées dans la 1^{ère} boucle périplasmique ; les substitutions A596V et K692M dans la seconde et F1018L dans le 12^{ème} segment transmembranaire (TMS12).

Au contraire, chez les souches 2804 et 3066, les substitutions F29S et F1018L mises en évidence dans MexY sont associées à un haut niveau de résistance aux aminosides (CMI gentamicine : 64 mg/L). Nous avons donc envisagé qu'elles pourraient affecter l'activité du système d'efflux actif. En effet, la substitution F29S se situe dans une zone appelée « vestibule », par laquelle les substrats pénètrent dans la pompe à partir du périplasma. Le remplacement d'une phénylalanine, acide aminé aromatique apolaire, par une sérine diminue l'encombrement stérique au niveau du vestibule. Par ailleurs, la fonction hydroxyle de la sérine pourrait favoriser la pénétration des molécules hydrophiles tels que les aminosides [figure 58]. La substitution F1018L est, quant à elle, localisée dans le TMS 12 de la protéine MexY. Ce segment transmembranaire ne semble pas être impliqué dans le flux de protons nécessaire au fonctionnement de la pompe. En effet, la modélisation 3D indique, conformément aux données de la littérature, que les acides aminés intervenant dans le transfert de protons sont situés dans le TMS 4 (D406 et D407) et dans le TMS 10 (K934) (Takatsuka and Nikaido 2006²¹⁸).

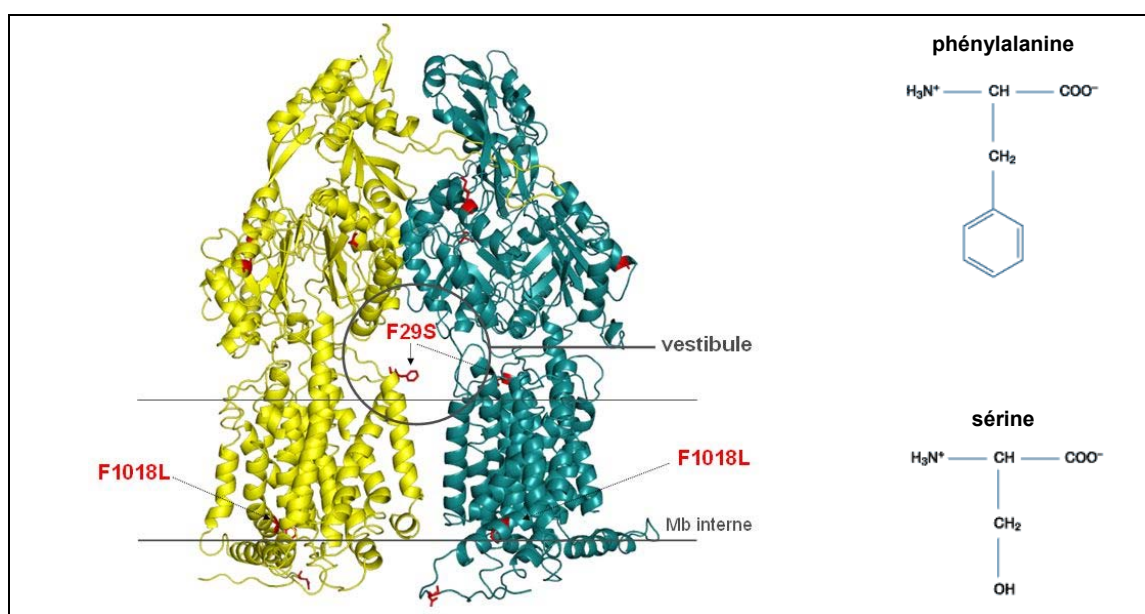


Figure 58. Modélisation 3D d'un dimère de MexY et localisation des substitutions F29S et F1018L.

Modélisation effectuée en collaboration avec Gilles Phan (UMR CNRS 8015, Faculté de Pharmacie, Paris V) d'après le modèle d'AcrB décrit chez *E. coli*.

La substitution F29S (1^{ère} boucle périplasmique) est localisée dans une zone appelée « vestibule » par laquelle les substrats entrent dans la pompe; la présence d'une fonction hydroxyle supplémentaire au niveau du vestibule pourrait favoriser la pénétration des molécules hydrophiles tels que les aminosides.

La substitution F1018L se localise, quant à elle, dans le 12^{ème} segment transmembranaire (TMS12) qui n'est pas impliqué dans le flux de protons de l'antiport.

Afin de vérifier l'impact des substitutions F29S et F1018L sur la résistance aux aminosides, des expériences de mutagenèse dirigée ont été réalisées sur le plasmide pAGH97, qui renferme l'opéron *mexXY* sauvage. Ce travail a pu être réalisé suite à une collaboration avec le laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés du CEA de Grenoble. Ainsi, nous avons pu reconstituer *in vitro* les substitutions mises en évidence dans les protéines MexX et MexY des deux souches hautement résistantes à la gentamicine (CMI : 64 mg/L) et étudier leurs effets. Pour cela, les plasmides mutés ont été introduits dans le mutant FE60 ($\Delta mexXY$) puis, les niveaux de résistance conférés vis-à-vis de différents substrats du système MexXY(OprM) ont été mesurés [tableau 28]. Contrairement à notre hypothèse de départ, la substitution F29S supposée favoriser l'entrée de molécules hydrophiles ne semble pas conférer une résistance supérieure par rapport à son allèle sauvage (FE60(pAGH97)). En revanche, la substitution F1018L qui affecte un résidu conservé chez de nombreux transporteurs RND dans le TMS 12 augmente l'efficacité du système MexXY(OprM) et les CMI de l'ensemble des substrats (gentamicine, tobramycine, amikacine, ciprofloxacine et céfépime) d'un facteur 2 par rapport à l'allèle sauvage.

Tableau 28. Niveaux de résistance de la souche FE60 après complémentation avec des variants mutés dans les gènes *mexX* et *mexY*.

	Substitutions d'acides aminés ^a		CMI (mg/L) ^b				
	MexX	MexY	Gn	Tm	Amk	Cip	Fep
PAO1	-	-	2	0,5	4	0,125	2
MutGr1	-	-	4	1	16	0,5	4
2804	K329Q, W359R	T543A, F1018L	64	64	128	16	32
3066	K329Q, L331V, W358R	F29S	64	16	128	16	32
FE60	$\Delta MexXY$		0,06	$\leq 0,25$	0,5	0,125	2
FE60 pAK1900	$\Delta MexXY$		0,06	$\leq 0,25$	0,5	0,125	2
FE60 pAGH97	MexXY ⁺⁺		4	0,5	8	0,5	8
Reconstitution des mutations observées chez 2804							
FE60 pAGH1018	-	F1018L	8	1	16	1	16
FE60 pAGH1018-T	-	T543A, F1018L	8	1	16	1	16
FE60 pAGH1018-TK	K329Q	T543A, F1018L	8	1	16	1	16
FE60 pAGH1018-TKW	K329Q, W359R	T543A, F1018L	8	1	16	1	16
Reconstitution des mutations observées chez 3066							
FE60 pAGH29	-	F29S	4	0,5	8	0,5	8
FE60 pAGH29-KL	K329Q, L331V	F29S	4	0,5	8	0,5	8
FE60 pAGH29-KLW	K329Q, L331V, W358R	F29S	8	0,5	8	0,5	8
Autres modélisation							
FE60 pAGH542	-	Y542A	4	0,25	4	0,25	4
FE60 pAGH542-A	-	YR42A, F1018A	4	0,25	4	0,25	4

Gn, Gentamicine ; Amk, Amikacine ; Tm, Tobramycine ; Cip, Ciprofloxacine ; Fep, Céfépime.

^a les mutations retrouvées uniquement chez les souches hautement résistantes aux aminosides (CMI Gn = 64 mg/L) sont en gras,

^b pour la détermination des CMI, 50mg/L de ticarcilline sont ajoutés dans le milieu afin de maintenir les plasmides.

Les modélisations réalisées par Gilles Phan (UMR CNRS 8015, Paris V) à partir du modèle structural d'AcrB ont montré que, lors du repliement de MexY, le résidu phénylalanine (F1018) du TMS12 interagit avec un autre résidu aromatique également très conservé (la tyrosine 542 (Y542)), situé dans une cavité délimitée par les TMS 7, TMS 8, TMS9 et TMS12 [figure 59]. Cette cavité est supposée être une voie d'entrée pour les substrats issus du cytosol ou de la membrane lipidique (Sennhauser *et al.* 2007²⁰²). Au niveau fonctionnel, la structure asymétrique du trimère d'AcrB a permis de proposer un mécanisme d'efflux « rotatif » dans lequel chacun des trois protomères constituant la pompe adopte alternativement trois conformations différentes (Murakami *et al.* 2006¹⁶¹ ; Seeger *et al.* 2006²⁰⁰ ; Sennhauser *et al.* 2007²⁰²) [figure 60] :

- la conformation « rigide » (T pour tight) pendant laquelle l'entrée des substrats est restreinte ;
- la conformation « relachée » (L pour loose), où les substrats issus du périplasma ou du cytosol sont pris en charge ;
- la conformation « ouverte » (O pour open) pendant laquelle le pore central s'ouvre afin d'évacuer les substrats vers l'extérieur de la pompe.

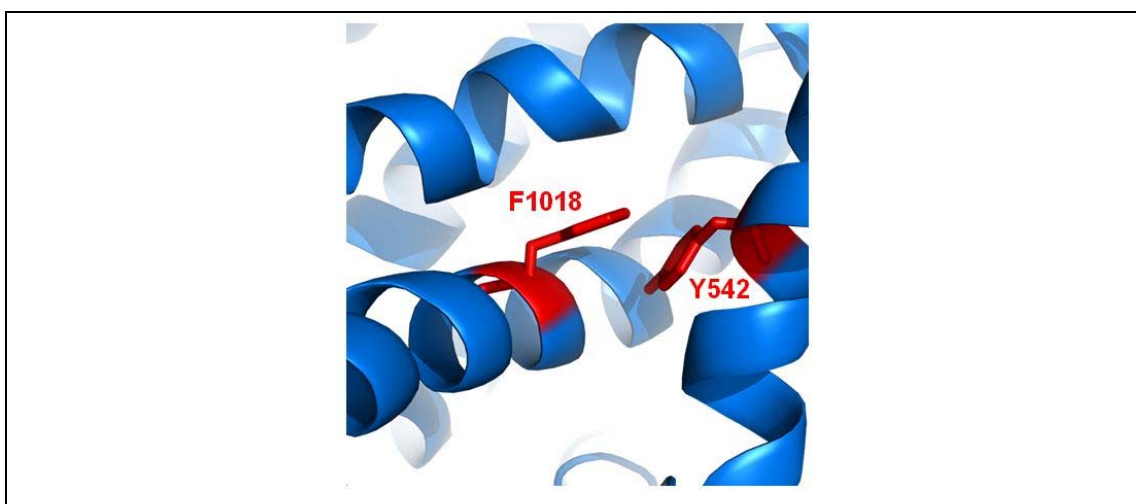


Figure 59. Interaction entre F1018 et Y542 sur un modèle structural de MexY.

Modélisation effectuée d'après le modèle d'AcrB décrit chez *E. coli*. La phénylalanine 1018 du TMS12 et la tyrosine 542 du TMS 7 montrent, dans un modèle sauvage, une conformation de type T.

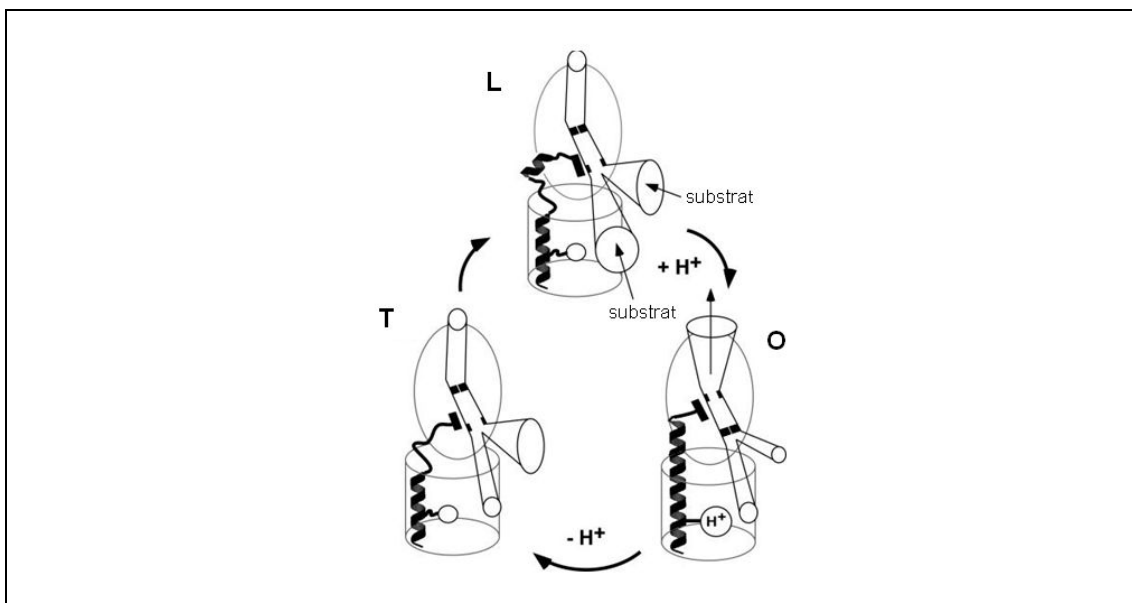


Figure 60. Modèle rotatif d'efflux d'AcrB proposé par Sennhauser et al.

Chacun des trois protomères du transporteur adopte la conformation T (*tight*), L (*loose*) ou O (*open*). Chaque conformation est schématisée sur un protomère avec les voies d'entrée et de sortie, ouvertes ou non. Le TMS 8, impliqué dans le flux de proton apparaît en noir sur le schéma (Sennhauser *et al.* 2007²⁰²).

Chez la souche 2804, la substitution F1018L supprimerait les interactions entre les deux cycles F1018 et Y542 et défavoriserait la conformation T. Dans ce cas, seules les conformations L et O seraient adoptées avec pour conséquence la « suractivation » du transporteur et donc une résistance accrue aux aminosides. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons choisi de remplacer par mutagenèse dirigée la phénylalanine et la tyrosine par des alanines afin de supprimer totalement cette interaction. Les mutants (F1018A, Y542A) obtenus n'ont toutefois pas présenté une résistance aux substrats du système MexXY(OprM) supérieure à celle de la souche sauvage. La substitution Y542A a même entraîné, lorsqu'elle est seule, une augmentation de la sensibilité de la souche à l'ensemble des substrats (facteur 2) signe d'un dysfonctionnement de la pompe [tableau 28].

Malgré tout, les substitutions F29S et F1018L ne peuvent expliquer en totalité la résistance de haut niveau des isolats cliniques 2804 et 3066 (16 fois supérieure à celle du mutant MexXY(OprM)⁺ MutGr1). Il est intéressant de noter que les variants F29S et F1018L ont été retrouvés chez des souches (2804 et 3066) dont l'opéron *mexXY* présente une séquence se rapprochant plus de celle de la souche PA14 que de PAO1.

En effet, les substitutions K329Q, L331V, W358R dans la protéine MexX et la substitution T543A dans MexY sont retrouvées chez PA14 mais pas chez PAO1. Nous avons donc envisagé que ces substitutions pouvaient favoriser l'assemblage du système d'efflux actif et le rendre plus performant. Etant donné que le plasmide pAGH97 contient l'opéron sauvage de PAO1, nous avons donc reconstitué *in vitro* par mutagenèse dirigée l'environnement génétique de l'opéron *mexXY* des souches 2804 (pAGH1018-TKW) et 3066 (pAGH29-KLW) [tableau 28]. Ces nouvelles constructions se sont montrées sans effet sur la résistance comparativement à celle conférée par les plasmides pAGH1018 et pAGH29.

4. Conclusion : MexXY et résistance aux aminosides

Ce travail montre, pour la première fois, que des bactéries peuvent s'adapter à la pression de l'environnement CF en modifiant, non plus la quantité de système d'efflux produite, mais la structure de la pompe elle-même. Nous avons pu confirmer que seule la substitution F1018L dans la protéine MexY entraîne une augmentation de la résistance à tous les substrats de la pompe. Toutefois, cette substitution n'explique que partiellement les hauts niveaux de résistance chez l'isolat 2804 conférés par le système MexXY(OprM) ce qui suggère la présence de mécanismes additionnels capables de renforcer l'efflux actif chez cette souche.

VI. Article

Les résultats décrits ci-dessus ont fait l'objet d'une publication en mai 2009 dans Antimicrobial Agents and Chemotherapy :

Efflux Unbalance in Cystic Fibrosis Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*,
Vettoretti L, Plésiat P, Muller C, El Garch F, Phan G, Attrée I, Ducruix A, Llanes C.
(cf texte de l'article, annexe 2)

VII. Résultats complémentaires

La résistance élevée des isolats 2804 et 3066 (CMI de la gentamicine égale à 64 mg/L) concerne aussi les fluoroquinolones (CMI de la ciprofloxacine égale à 16 mg/L), antibiotiques substrats du système MexXY(OprM). Afin de déterminer si l'efflux actif est le seul mécanisme en cause dans ce phénomène nous avons recherché des mutations éventuelles dans les QRDR (*Quinolone Resistance-Determining Regions*) des sous-unités GyrA, GyrB, ParC et ParE. Par ailleurs, nous avons évalué la cinétique de croissance des isolats Tic^{HS} afin de déterminer si ces souches présentent un fitness particulier pouvant expliquer la résistance élevée aux aminosides.

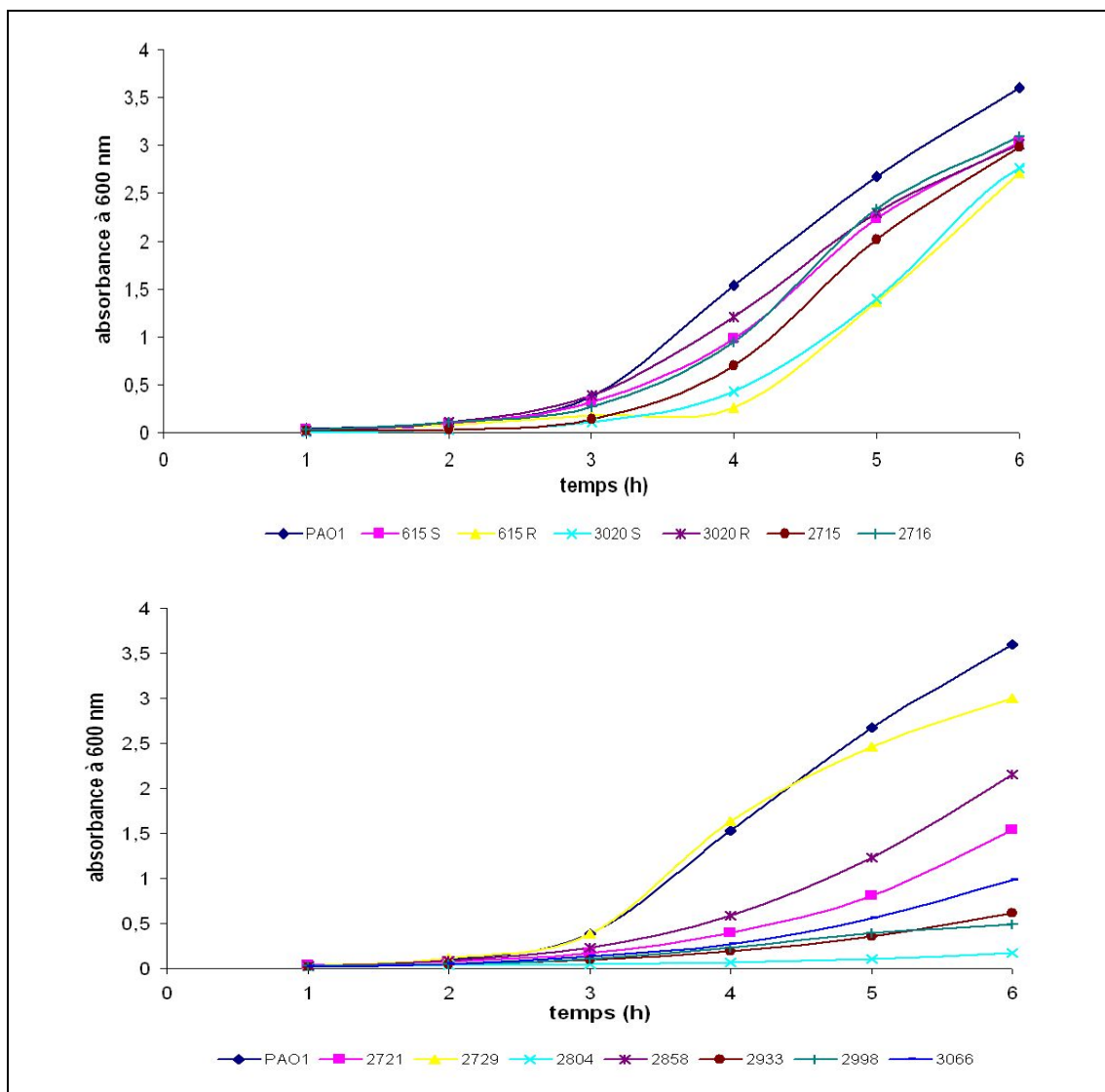
1. Résistance à la ciprofloxacine : séquençage des QRDR

Parmi les 11 souches sélectionnées pour l'étude, deux (2804, 3066) présentaient une résistance élevée à la ciprofloxacine (CMI 16 mg/L), antibiotique substrat du système d'efflux actif MexXY(OprM). Or, la surproduction de ce système chez le mutant MutGr1 n'entraîne qu'une augmentation modeste de la CMI d'un facteur 4 [tableau 28]. Nous avons pu constater que la repression de *mexXY* chez les isolats 2804 et 3066 par le plasmide pAZ17 s'accompagne d'une chute des CMI de la ciprofloxacine à 1 mg/L et 0,5 mg/L, respectivement. Par comparaison, le niveau de sensibilité du mutant FE60 (PAO1 Δ *mexXY*) est de 0,125 mg/L. La résistance résiduelle observée chez la souche 2804 laisse donc supposer la présence de mécanismes complémentaires contribuant à la résistance à la ciprofloxacine. Etant donné que les mutations dans les QRDR, en empêchant la fixation des quinolones sur leur cible, génèrent des niveaux de résistance à la ciprofloxacine s'échelonnant de 1 à 64 mg/L (Mouneimne *et al.* 1999¹⁵⁸ ; Akasaka *et al.* 2001⁶), nous avons entrepris le séquençage des gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE* chez 2804 et 3066. Seule la souche 2804 a présenté une altération de cible (substitution T83I dans GyrA) bien décrite chez des isolats CF (Jalal *et al.* 2000⁹²). La CMI élevée de la ciprofloxacine chez l'isolat 2804 s'explique donc à la fois par une modification d'affinité de la cible et par la surproduction du système MexXY(OprM), ce qui n'est pas le cas de l'isolat 3066 pour lequel seule la surproduction de MexXY a pu être démontrée.

2. Courbes de croissance

Il a été décrit dans la littérature des mutants « énergétiques » présentant une résistance aux aminosides jusqu'à 64 fois supérieure à celle des souches parentales sauvages (Haussler *et al.* 1999⁷⁰). En effet, afin d'atteindre leur cible ribosomale, les aminosides doivent franchir la membrane cytoplasmique par un transport actif dépendant de la force proton motrice $\Delta\Psi$ (Taber *et al.* 1987²¹⁷). La résistance élevée aux aminosides observée chez certains isolats étudiés pourrait donc en partie dépendre d'un défaut de pénétration dû à un déficit énergétique. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé des courbes de croissance de nos isolats [figure 61]. Cependant aucune corrélation nette n'a pu être établie entre la cinétique de croissance et la résistance aux aminosides. En effet, les isolats les plus résistants, 2804 et 3066, ont présenté une croissance ralentie tout comme les isolats 2721, 2933 et 2998 dont les niveaux de résistance sont inférieurs. Par ailleurs, la souche 3020R dont les niveaux de résistance aux aminosides sont identiques à ceux de l'isolat 2721, ont montré une cinétique de croissance proche de celle de la souche sauvage PAO1.

A ce stade de l'étude, nous n'expliquons pas totalement les mécanismes impliqués dans la résistance de haut niveau aux aminosides. La persistance des souches de *P. aeruginosa* au sein du poumon est un phénomène complexe et multifactoriel qui semble résulter davantage du mode de vie adopté dans l'environnement pulmonaire que d'un déficit énergétique. La compréhension des mécanismes d'adaptation de *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose demeure une préoccupation de notre équipe de recherche.



Résultats (2)

Diversification des souches de *P. aeruginosa* dans mucoviscidose.

I. Contexte clinique de l'étude - Problématique

Soixante quatorze (65%) des 114 patients suivis par le CRCM de Besançon sont actuellement colonisés, de façon chronique ou intermittente, au niveau broncho-pulmonaire par *P. aeruginosa*. Chez les patients colonisés chroniques, l'administration de fortes doses d'antibiotiques (β -lactamines, aminosides, fluoroquinolones, colistine) parvient à améliorer temporairement la fonction respiratoire mais rarement à éradiquer la bactérie. Comme nous avons pu le voir dans le chapitre précédent, cette efficacité médiocre des antibiotiques est le résultat de mécanismes de résistance complexes développés par *P. aeruginosa*. L'analyse rétrospective d'une collection de souches constituée sur une dizaine d'années par le laboratoire de Bactériologie du CHU de Besançon a révélé une faible variation de sensibilité des souches de *P. aeruginosa* aux antibiotiques chez les malades colonisés de façon intermittente (n=39). Au contraire, chez la plupart des porteurs chroniques (29/35), on observe, à plus ou moins long terme, une diversification parfois extrême des profils de résistance (jusqu'à 21 chez un même patient) ; ces phénotypes de résistance différents sont d'autant plus nombreux que la période de colonisation est longue.

Il semble peu probable que ce phénomène soit le reflet de la colonisation du poumon par des souches différentes mais plutôt de l'évolution adaptative d'une souche unique qui persiste et se diversifie au cours du temps. En effet, il a été montré par différents travaux que l'adaptation de *P. aeruginosa* à l'environnement pulmonaire de la mucoviscidose était un processus complexe faisant intervenir une adaptation à la fois génétique et phénotypique (Smith *et al.* 2006²⁰⁹ ; Mena *et al.* 2008¹⁴⁵). Cette combinaison de mécanismes permet l'émergence de sous-populations pouvant persister à long terme dans les poumons (Oliver *et al.* 2000¹⁶⁹). Afin de mieux comprendre comment *P. aeruginosa* s'adapte à l'environnement pulmonaire des patients atteints de mucoviscidose, nous avons effectué une analyse génotypique des souches isolées chez différents patients colonisés de façon chronique et pour lesquels nous avons identifié et conservé la souche de primo-colonisation. Ce travail a été complété par une analyse de l'évolution des profils de résistance au cours du temps ainsi qu'une analyse préliminaire qualitative de différents facteurs de virulence.

II. Sélection des patients et des souches CF de colonisation chronique

L'analyse de la collection de souches de *P. aeruginosa* conservée au laboratoire nous a permis de sélectionner 7 patients (numérotés de 1 à 7) colonisés de façon chronique pour lesquels (i) la durée de colonisation était suffisamment longue (> 2 ans) et (ii) la souche de primo-colonisation était identifiée et conservée [tableau 29]. Une analyse préliminaire, basée sur la réalisation d'antibiogrammes, a montré que la souche de primo-colonisation, de phénotype sauvage dans la majorité des cas, est suivie à plus ou moins courte échéance par l'apparition d'isolats ayant des phénotypes de résistance différents [figure 62]. Seul le patient 2 héberge une souche dont le phénotype de résistance demeure identique après 7 années de colonisation chronique. Nous avons donc écarté ce patient de l'étude. La détermination des CMI de trois aminosides (gentamicine, tobramycine et amikacine), de quatre β -lactamines (ticarcilline, imipénème, ceftazidime et céfépime) et de la ciprofloxacine, antibiotiques couramment utilisés en thérapeutique anti-pyocyannique, nous permis d'affiner la sélection des isolats collectés chez les 6 patients restants. L'objectif étant d'étudier l'évolution du phénotype au cours de la colonisation chronique, nous n'avons conservé que les souches présentant au minimum une variation de la résistance d'un facteur 4 pour un antibiotique ou d'un facteur 2 pour plusieurs antibiotiques. Les souches dont la sensibilité à un seul antibiotique variait seulement d'un facteur 2 ont été écartées car cette variation pourrait tout aussi bien être due à l'incertitude de la mesure [tableau 29].

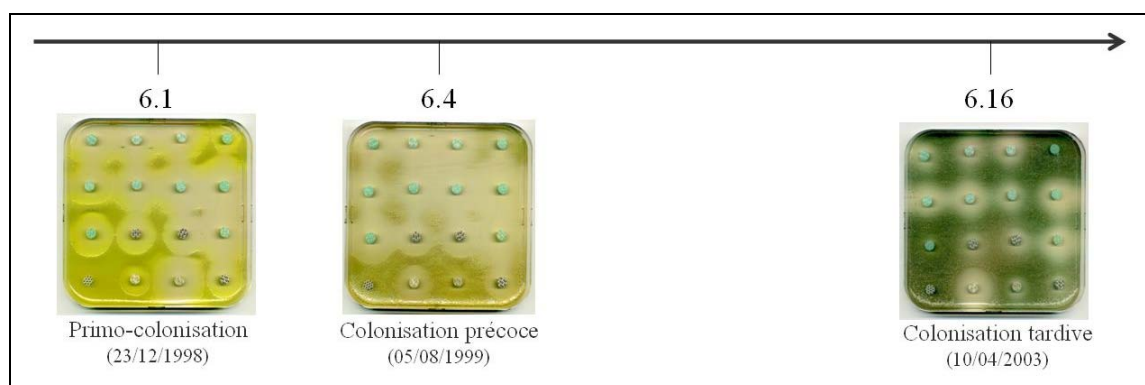


Figure 62. Apparition chronologique de différents phénotypes de résistance chez un patient CF colonisé de façon chronique.

La souche de promo-colonisation (isolat 6.1) présente un phénotype de résistance sauvage. Au cours du temps, le diamètre des zones d'inhibition autour des disques d'antibiotique fluctuent ; la souche isolée à un stade tardif de colonisation (isolat 6.16) apparaît bien plus résistante aux 16 antibiotiques testés.

Tableau 29. Patients CF sélectionnés pour l'étude.

	Sexe	Age	Colonisation			
			Age de primocolonisation	Nb d'isolats ^a	Période de recueil	Nb de phénotypes ^b
Patient 1	F	36 ans	32 ans	12	2 ans	11
Patient 2	M	18 ans	6 ans	15	7 ans	1
Patient 3	M	22 ans	13 ans	18	7 ans	13
Patient 4	M	8 ans	10 mois	11	5 ans	5
Patient 5	F	20 ans	15 ans	5	3 ans	5
Patient 6	M	21 ans	11 ans	33	8 ans	19
Patient 7	F	5 ans	7 mois	8	3 ans	7

^a nombre d'isolats conservés par le Laboratoire de Bactériologie du CHU de Besançon.

^b nombre de phénotypes différents sélectionnés pour l'étude après détermination des CMI.

III. Génotypage des souches et comparaison des techniques utilisées

Pour chacun des 6 patients sélectionnés, la clonalité des isolats a été déterminée, dans un premier temps, par amplification aléatoire de l'ADN génomique (RAPD) à l'aide des amorces AP3 et AP5 (Talon *et al.* 1995²¹⁹). A l'exception des isolats du patient 6 pour lesquels aucune amplification n'a été possible malgré plusieurs tentatives, des profils de migration ont ainsi pu être obtenus pour l'ensemble des isolats collectés. L'interprétation des résultats obtenus reste cependant difficile dans certains cas. En effet, les critères publiés établissent que deux isolats appartiennent à un même clone si leurs profils présentent moins de trois bandes différentes. Par exemple, chez le patient 3, l'amplification à l'aide de l'amorce AP3 conduit à la conclusion que les 13 isolats étudiés appartiennent à un même clone alors que l'amplification à l'aide de l'amorce AP5 suggère la présence de 2 clones voire plus **[figure 63]**. Si on applique ces critères, il devient donc difficile de déterminer si les isolats appartiennent à un clone unique. L'interprétation parfois approximative des résultats obtenus par RAPD rend cette technique peu discriminante et nous a conduit à utiliser deux techniques supplémentaires pour affiner les résultats. C'est ainsi que la variation du nombre de motifs dans différentes répétitions en tandem (MLVA) a été étudiée par PCR de même que le génotypage de 32 « *Single Nucleotide Polymorphism* » (SNPs) à l'aide de puces Clondiag®. Les résultats obtenus par ces différentes techniques ont été comparés à ceux

obtenus par analyse en champ pulsé après restriction de l'ADN génomique par l'enzyme *DraI* (PFGE), actuellement technique de référence (Tenover *et al.* 1995²²¹) [tableau 30].

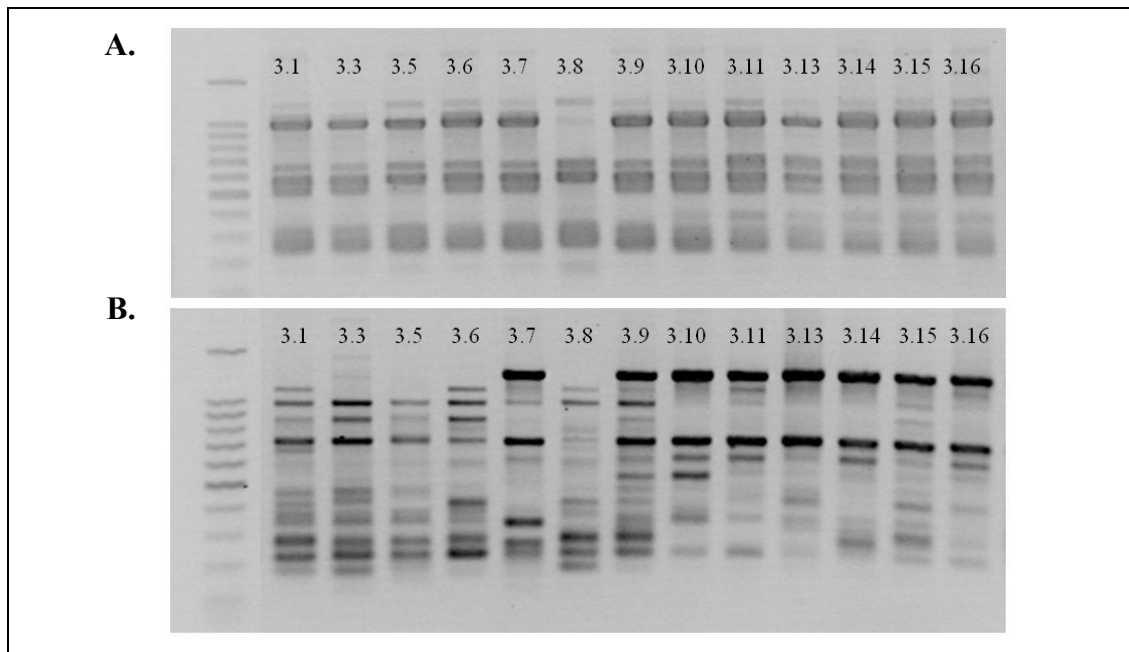


Figure 63. Profils de migration obtenus après amplification aléatoire de l'ADN génomique (RAPD).

A. Amplification obtenue avec l'amorce AP3. Les profils de migration présentant moins de trois bandes de différence, il semblerait que les 13 isolats collectés chez le patient 3 appartiennent à un clone unique.

B. Lorsque l'amplification est réalisée avec l'amorce AP5, les profils de migration présentent plus de trois bandes de différence, invalidant l'hypothèse d'un clone unique.

Les résultats obtenus par ces trois techniques (MLVA, Clondiag[®] et PFGE) sont superposables, à l'exception du patient 3 pour lequel les résultats diffèrent. Ainsi, les patients 1 et 7 sont colonisés par un clone, les patients 4 et 5 sont colonisés par un premier clone qui laisse place par la suite à un second clone, le patient 6 est quant à lui, colonisé par un clone majoritaire, qui persiste au cours du temps, alors que deux clones apparaissent ponctuellement. Chez le patient 3, l'analyse par la technique de MLVA a révélé la présence de clones différents, tandis que l'analyse des SNPs par la méthode Clondiag[®] n'a détecté qu'un clone unique. Enfin, si l'on se reporte à la technique de référence, l'analyse en PFGE, 2 clones se succéderaient chez ce patient.

Tableau 30. Comparaison des méthodes de génotypage utilisées dans l'analyse des séries hypervariables

MLVA															
															% ^a
	77	127	142	172	211	212	213	214	215	216	217	222	223		
répétition (pb)							loci								
PAO1	39	15	115	54	101	40	103	115	129	113	109	101	106		
fragment (pb)	4	8	7	12	5	9	5	3	4	3	2	2	4		
PA14	442	210	890	789	663	522	640	426	765	543	606	390	454		-
fragment (pb)	2	9	1	12	2	4	1	5	2	1	5	2	4		
	364	225	201	789	360	324	221	655	507	315	933	391	453		-
1.1	3	8	1	11	1	10	4	4	5	2	3	3	3		
1.3	3	8	1	11	1	10	4	4	5	2	3	3	3		
1.4	3	8	1	11	1	10	4	4	5	2	3	3	3		
1.5	3	8	1	11	1	10	4	4	5	2	3	3	3		
1.6	3	8	1	11	1	10	4	4	5	2	3	3	3		
1.7	3	8	1	11	1	10	4	4	5	2	3	3	3		
1.8	3	8	1	11	1	10	4	4	5	2	3	3	3		
1.9	3	8	1	11	1	10	4	4	5	2	3	3	3		
1.10	3	8	1	11	1	10	4	4	5	2	3	3	3		
1.11	3	8	1	11	1	10	4	4	5	2	3	3	3		
1.12	3	8	1	11	1	10	4	4	5	2	3	3	3		
3.1	3	8	4	10	3	5	0	0	1	2	5	1	3		-
3.3	3	8	4	10	3	5	0	0	1	2	4	1	3		90 %
3.5	3	8	4	10	3	5	0	0	1	2	4	1	3		90 %
3.6	3	8	0	10	3	5	0	0	1	2	4	1	3		80 %
3.7	3	8	4	10	3	5	5	5	1	2	4	1	3		70 % ^b
3.8	3	8	0	10	7	5	0	0	1	2	4	1	3		70 % ^b
3.9	3	8	0	10	7	5	0	0	1	2	4	1	3		70 % ^b
3.10	3	8	4	10	3	5	5	5	1	2	4	1	3		70 %
3.11	3	8	4	10	3	5	5	5	1	2	4	1	3		70 %
3.13	3	8	4	10	3	5	5	5	1	2	4	1	3		70 %
3.14	3	8	4	10	3	5	5	5	1	2	4	1	3		70 %
3.15	3	8	4	10	3	5	5	5	1	2	4	1	3		70 %
3.16	3	8	4	10	3	5	5	5	1	2	4	1	3		70 %
4.1	2	9	1	12	2	4	1	5	2	1	5	2	4		-
4.2	2	9	1	12	2	4	1	5	2	1	5	2	4		-
4.3	2	9	1	12	2	4	1	5	2	1	5	2	4		-
4.4	4(5)	8	3	9	2	9	5	3	1	2	4	2	2		20 %
4.5	4(5)	8	3	9	2	9	5	3	1	2	4	2	2		clone 2

Tableau 31. Interprétation des puces clonDIAG

		oriC	oprL	alkB2	citS-1	citS-2	oprI	ampC-1	ampC-3	ampC-4	ampC-5	ampC-6	ampC-7	fliCa	fliCa SNP	fliCb	exoS	exoU	fpvA type I	fpvA type II a	fpvA type II b	fpvA type III	fpvB	LES	PA0636	PA0722	PA0728	PA2185	PA2221	PA3835
strain	Group	SNPs											Flagellin			ExoS/U		Pyov.-Rezeptoren					LES	variable Gene						
1.1	2E1A	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1
1.3	2E1A	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1
1.4	2E1A	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1
1.5	2E1A	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1
1.6	2E1A	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1
1.7	2E1A	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1
1.8	2E1A	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1
1.9	2E1A	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1
1.10	2E1A	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1
1.11	2E1A	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1
1.12	2E1A	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1
3.1	0C2A	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
3.3	0C2A	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
3.5	0C2A	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
3.6	0C2A	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
3.7	0C2A	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
3.8	0C2A	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
3.9	0C2A	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
3.10	0C2A	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
3.11	0C2A	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
3.13	0CAA	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
3.14	0C2A	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
3.15	0C2A	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1
4.1	9420	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
4.2	9420	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
4.3	9420	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
4.4	149C	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
4.5	149C	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
5.1	A82A	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1
5.2	2432	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
5.3	2432	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
5.4	2432	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
5.5	2432	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1
6.1	0C92	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
6.2	0C92	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
6.3	0C92	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
6.4	0C92	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
6.5	0C92	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
6.6	0C92	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
6.7	0C92	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
6.8	0C92	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
6.10	0C92	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
6.11	0C92	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
6.12	0C9A	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
6.13	0C9A	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0
6.14	0C92	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
6.15	0C92	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
6.16	0C92	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
6.17	3C3A	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
6.18	0C92	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
6.19	0C92	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1
6.21	0C92	0	0	0	0	1	1	0																						

[illegible]

IV. Suivi de la colonisation chez les différents patients sélectionnés

Afin de mieux comprendre comment *P. aeruginosa* parvient sur le long terme à s'adapter à l'environnement pulmonaire et y persister malgré l'antibiothérapie, la clonalité des isolats a été corrélée à l'évolution de la résistance aux antibiotiques, à la production de facteurs de virulence et à la capacité de former du biofilm. Ainsi, la production de rhamnolipides, biosurfactants agissant comme un détergent pouvant altérer les membranes cellulaires et inhiber la fonction ciliaire de l'épithélium respiratoire humain, a été évaluée semi-quantitativement. En effet, la production de rhamnolipides est caractérisée par l'apparition, autour d'un dépôt bactérien calibré, d'un halo bleu foncé correspondant à un complexe insoluble formé par les rhamnolipides, le CTAB et le bleu de méthylène. La production d'hémolysine thermosensible (phospholipase C), enzyme capable de détruire les membranes cellulaires par hydrolyse des glycérophospholipides, est estimée semi-quantitativement sur gélose au sang. Sur ce milieu, l'hémolyse se traduit par un éclaircissement de la gélose caractéristique de la lyse des globules rouges. Enfin, la capacité d'adhésion de cellules de *P. aeruginosa* sur les parois d'une cupule plastique, à l'interface air/liquide, a été évaluée par spectrophotométrie.

Planche 1. Isolats du patient 1

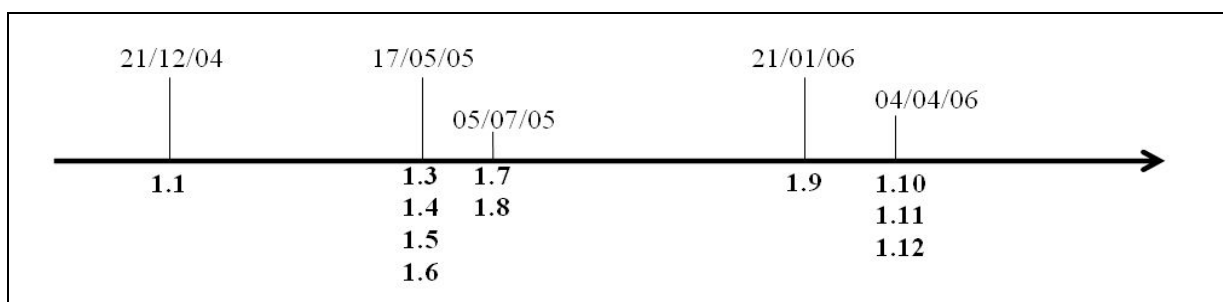


Figure 1. Chronologie d'apparition des nouveaux phénotypes de résistance

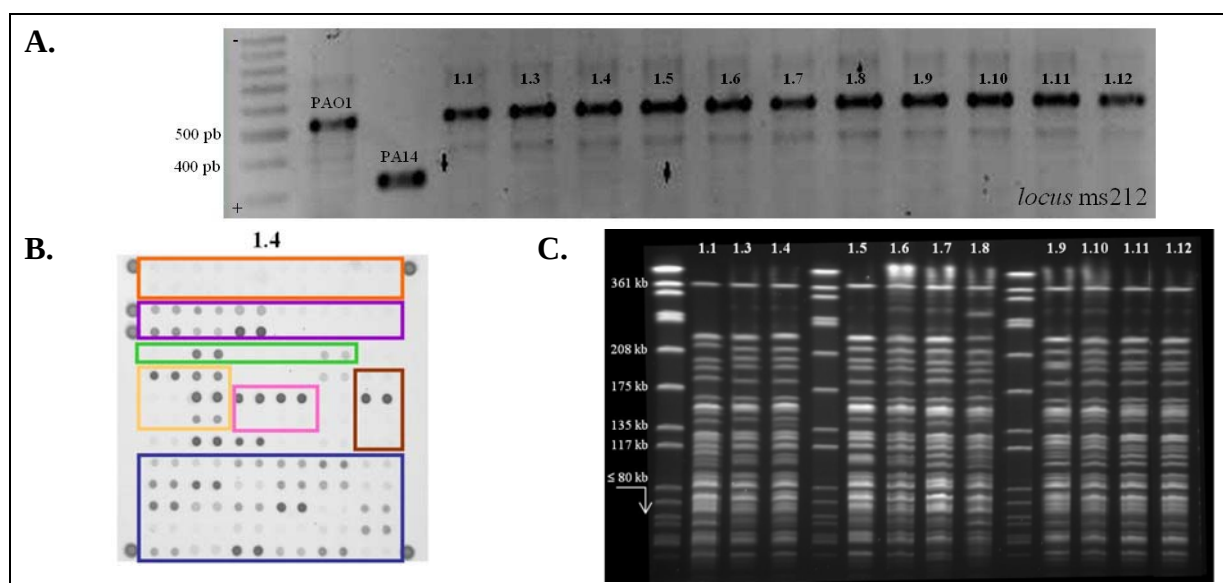


Figure 2. Génotypage

A. Profils « MLVA » obtenus après amplification du locus ms212. L'ensemble des isolats sélectionnés chez le patient 1 présente le même nombre de répétitions ; ce résultat révèle que les isolats appartiennent à un même clone.

B. Profil « SNPs » obtenus par puces Clondiag®. Les isolats collectés chez le patient 1 appartiennent à un même clone car les profils SNP sont identiques.

C. Profils obtenus après restriction de l'ADN génomique par *DraI* puis électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Le génotypage par la méthode de référence confirme la présence d'un seul clone chez le patient 1. PFGE réalisé par Pascal Cholley, Service d'hygiène hospitalière, CHU de Besançon.

Tableau 1. Evolution de la résistance chez les isolats du patient 1

Souches	Date d'isolement	CMI (mg/L)							
		Amk	Tm	Gn	Cip	Fep	Ipm	Tic	Caz
PAO1	-	8	1	4	0,125	4	1	16	2
MutGr1	-	16	2	8	0,5	16	1	16	4
PT629	-	4	1	4	0,5	8	1	64	2
1.1	02/12/04	8	2	4	0,5	8	2	64	8
1.3	17/05/05	32	4	16	0,25	32	2	64	4
1.4	17/05/05	64	4	32	0,5	8	2	32	16
1.5	17/05/05	32	2	16	1	64	4	256	16
1.6	17/05/05	32	2	16	1	64	4	256	2
1.7	05/07/05	8	0,5	2	2	8	2	8	2
1.8	05/07/05	64	8	32	1	32	1	256	16
1.9	20/01/06	32	2	16	0,5	8	2	64	32
1.10	04/04/06	32	2	16	0,5	8	0,5	32	2
1.11	04/04/06	32	4	32	0,5	16	1	64	16
1.12	04/04/06	64	8	64	0,5	16	0,5	32	4

Amk, Amikacine ; Tm, Tobramycine ; Gn, Gentamicine ; Cip, Ciprofloxacine ; Fep, Céfépime ; Ipm, Imipénème ; Tic, Ticarcilline ; Caz, Ceftazidime. Les mutants MutGr1 et PT629 surproduisant, respectivement, les systèmes d'efflux actif MexXY(OprM) et MexAB-OprM sont utilisés comme témoins.

1. Evolution de la résistance chez la patiente 1 [planche 1]

Chez la patiente 1, actuellement âgée de 36 ans, la souche de primo-colonisation a été isolée en 2004. Depuis cette date, le laboratoire de Bactériologie du CHU a conservé, sur la base de l'antibiogramme, 11 souches supplémentaires de phénotypes différents. Cependant, la détermination des CMI nous a conduit à écarter de l'étude un isolat qui présentait un profil de sensibilité trop proche de celui observé chez la souche de primo-colonisation. Le génotypage réalisé par la technique de MLVA a mis en évidence que les 11 isolats sélectionnés présentaient le même nombre de répétitions des 13 motifs en tandem criblés. Ces 11 isolats présentent également des profils SNPs identiques après réalisation de puces Clondiag[®]. Chez cette patiente, 1 seul clone est donc présent sur la période 2004-2006, ce résultat étant confirmé par la technique de génotypage de référence « PFGE ». De manière un peu inhabituelle, la souche à l'origine de la primo-colonisation n'est pas de phénotype sauvage mais présente une résistance de bas niveau (2 à 4 fois le niveau sauvage) à la tobramycine, l'imipénème, au céfépime, à la ciprofloxacine, la ticarcilline et la ceftazidime. Au cours du temps, cette souche évolue et voit ses niveaux de résistance aux aminosides et au céfépime augmenter. Avec des CMI pouvant atteindre 256 mg/L, certains isolats (1.5, 1.6, 1.8) présentent un haut niveau de résistance à la ticarcilline. A l'inverse, des tests qualitatifs ont indiqué que la capacité de formation de biofilm, la production de rhamnolipides et le caractère hémolytique observés chez les isolats restent relativement constants au cours du temps et sont proches de ceux observés chez la souche de référence PAO1. L'analyse du génome accessoire réalisé à l'aide des puces Clondiag[®] n'a pas révélé de modifications majeures dans cette série d'isolats.

Chez la patiente 1, ce travail préliminaire a ainsi mis en évidence qu'un clone unique est à l'origine de la colonisation bronchique. Durant la période étudiée, ce clone donne naissance à plus de 10 phénotypes de résistance différents impliquant probablement divers mécanismes tels que la surproduction du système d'efflux actif MexXY et la surproduction de β -lactamase. L'identification de ces mécanismes ainsi que l'analyse des facteurs de virulence produits par ce clone seront poursuivis au laboratoire.

Au final, chez ce patient on observe l'évolution d'un clone unique vers une résistance progressive aux aminosides.

Planche 2. Isolats du patient 7

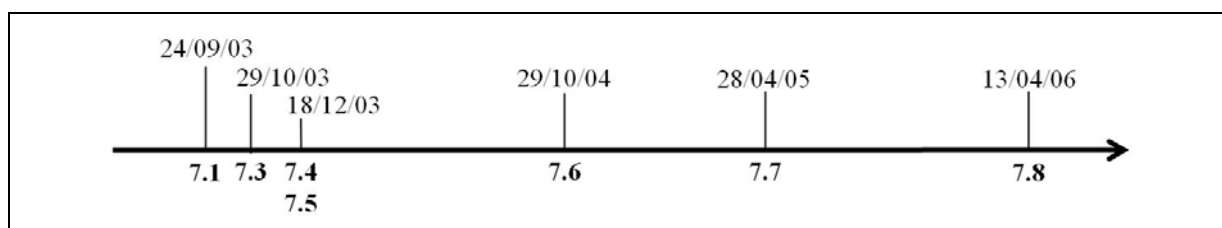


Figure 1. Chronologie d'apparition des nouveaux phénotypes de résistance

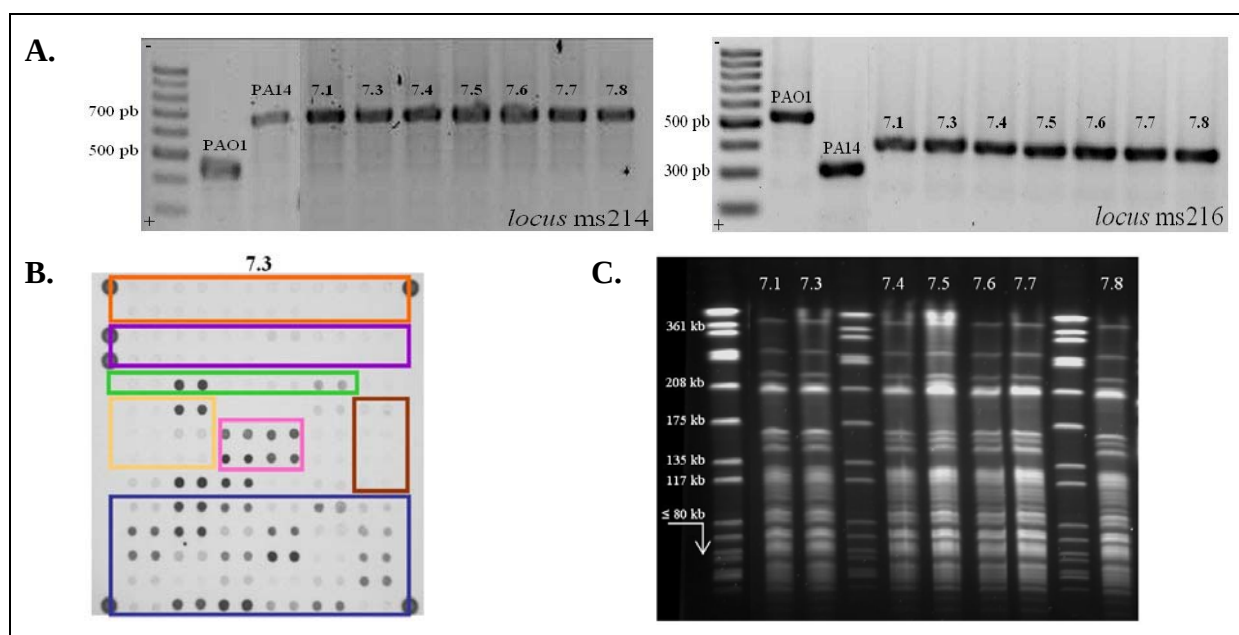


Figure 2. Génomique

A. Profils « MLVA » obtenus après amplification des *loci* ms214 et ms222. L'ensemble des isolats sélectionnés chez le patient 7 présente le même nombre de répétitions des *loci* amplifiés ; ce résultat révèle que les isolats appartiennent à un même clone.

B. Profil « SNPs » obtenus par puces Clondia®. Les isolats collectés chez le patient 7 appartiennent à un même clone car les profils SNP sont identiques.

C. Profils obtenus après restriction de l'ADN génomique par *DraI* puis électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Le génotypage par la méthode référence confirme la présence d'un seul clone chez le patient 7. PFGE réalisé par Pascal Cholley, Service d'hygiène hospitalière, CHU de Besançon

Tableau 1. Evolution de la résistance chez les isolats du patient 7

Souches	Date d'isolement	CMI (mg/L)							
		Amk	Tm	Gn	Cip	Fep	Ipm	Tic	Caz
PAO1	-	8	1	4	0,125	4	1	16	2
MutGr1	-	16	2	8	0,5	16	1	16	4
PT629	-	4	1	4	0,5	8	1	64	2
7.1	24/09/03	4	1	4	0,125	1	1	8	2
7.3	29/10/03	8	1	4	0,125	1	2	16	2
7.4	18/12/03	8	2	8	0,125	1	2	16	2
7.5	18/12/03	4	1	4	0,125	4	4	16	4
7.6	29/10/04	8	2	8	0,06	1	1	8	1
7.7	28/04/05	16	2	8	0,125	4	1	32	4
7.8	13/04/06	16	1	4	0,06	0,5	1	2	1

Amk, Amikacine ; Tm, Tobramycine ; Gn, Gentamicine ; Cip, Ciprofloxacine ; Fep, Céfépime ; Ipm, Imipénème ; Tic, Ticarcilline ; Caz, Ceftazidime. Les mutants MutGr1 et PT629 surproduisant, respectivement, les systèmes d'efflux actif MexXY(OprM) et MexAB-OprM sont utilisés comme témoins.

2. Evolution de la résistance chez la patiente 7 [planche 2]

Chez la patiente 7, actuellement âgée de 5 ans, la colonisation bronchique par *P. aeruginosa* a eu lieu très tôt dans la maladie. La souche de primo-colonisation a été isolée en 2003 alors que cette patiente n'avait que 7 mois. Entre 2003 et 2006, le laboratoire de Bactériologie du CHU a conservé 8 isolats présentant, à l'antibiogramme, des phénotypes de résistance différents. La détermination des CMI nous a conduit à éliminer un isolat qui présentait un phénotype de résistance trop proche de la souche de primo-colonisation.

Le génotypage réalisé par la technique de MLVA et par puce Clondiag[®] a mis en évidence que les 7 isolats sélectionnés appartenaient tous à un même clone. Ces résultats ont été confirmés par la technique de PFGE. Chez cette patiente, 1 seul clone est donc présent sur la période 2003-2006. La souche de primo-colonisation, à l'origine sensible, évolue au cours du temps donnant naissance à de sous-populations dont les niveaux de résistance à l'amikacine augmentent graduellement, tout d'abord d'un facteur 2 (isolats 7.3, 7.4, 7.6) puis d'un facteur 4 (7.7 et 7.8). Chez l'isolat 7.8, l'augmentation de la résistance à l'amikacine (mais pas à la tobramycine et la gentamicine) s'accompagne d'une sensibilité accrue à la ciprofloxacine et au céfépime. Cet isolat présente également une hypersensibilité à la ticarcilline, un phénotype (Tic^{HS}) dont la prévalence est voisine de 30 % (*cf première partie des résultats*). L'analyse qualitative des facteurs de virulence révèle que la production de rhamnolipides et le caractère hémolytique fluctuent au cours du temps.

L'analyse préliminaire de la série de souches isolées chez la patiente 7 a mis en évidence l'émergence d'une résistance isolée et modérée à l'amikacine. Il apparaît donc important de poursuivre la collecte des isolats afin d'étudier l'évolution de la résistance à plus long terme.

Au final, chez cette patiente on observe une stabilité relative de la sensibilité du clone de colonisation.

Planche 3. Isolats du patient 3

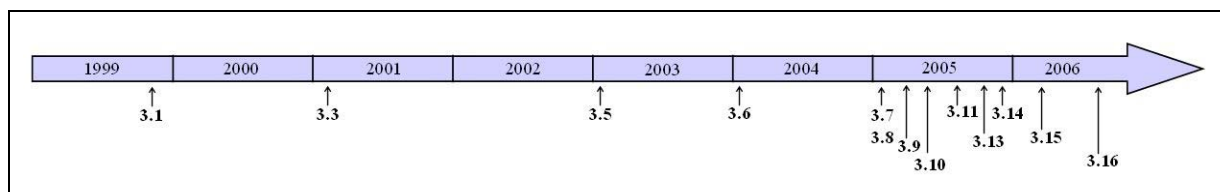


Figure 1. Chronologie d'apparition des nouveaux phénotypes de résistance

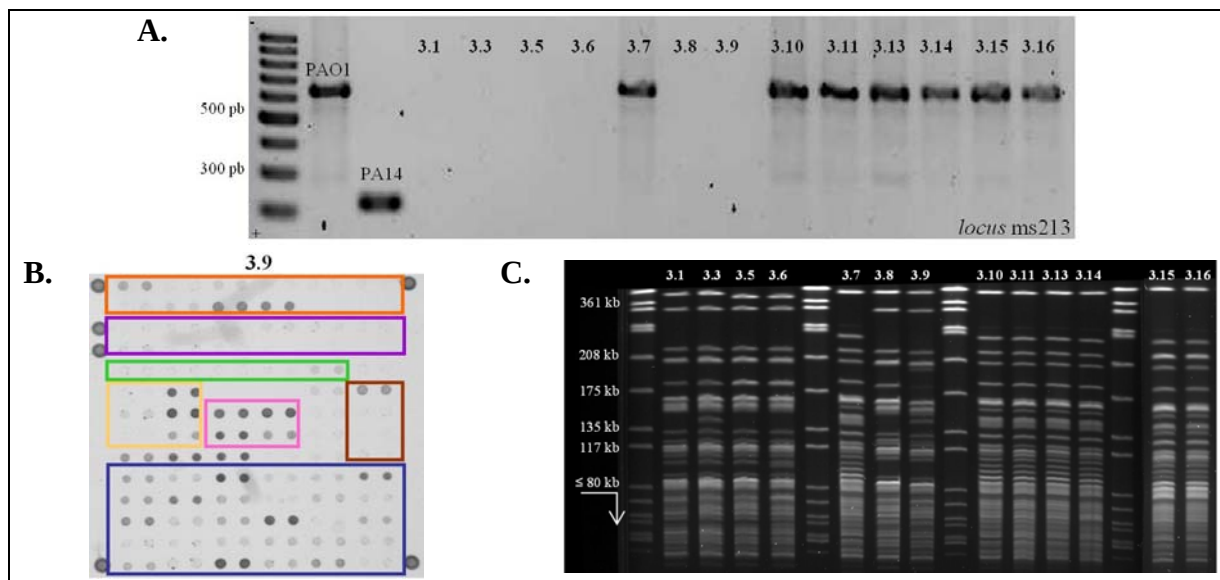


Figure 2. Génotypage

A. Profils « MLVA » obtenus après amplification du locus ms216. L'ensemble des isolats sélectionnés chez le patient 3 présente le même nombre de répétitions du locus amplifié ; ce résultat indique que les isolats appartiennent à des clones différents.

B. Profil « SNPs » obtenus par puces Clondiag®. Les isolats collectés chez le patient 3 appartiennent à un même clone car les profils SNP sont identiques.

C. Profils obtenus après restriction de l'ADN génomique par *DraI* puis électrophorèse en champ pulsé (PFGE). L'analyse par champ pulsé révèle la présence de 2 clones. PFGE réalisé par Pascal Cholley, Service d'hygiène hospitalière, CHU de Besançon

Tableau 1. Evolution de la résistance chez les isolats du patient 3

Souches	Date d'isolement	CMI (mg/L)							
		Amk	Tm	Gn	Cip	Fep	Ipm	Tic	Caz
PAO1	-	8	1	4	0,125	4	1	16	2
MutGr1	-	16	2	8	0,5	16	1	16	4
PT629	-	4	1	4	0,5	8	1	64	2
3.1	05/11/99	2	0,25	0,25	0,125	2	1	0,25	1
3.3	03/03/01	2	0,5	0,5	2	4	2	0,5	1
3.5	16/01/03	16	2	8	2	8	2	8	2
3.6	29/01/04	32	2	8	2	4	2	8	2
3.7	17/01/05	16	4	256	2	8	2	8	2
3.8	17/01/05	8	1	4	2	4	1	8	1
3.9	14/04/05	16	1	8	2	4	1	8	1
3.10	18/05/05	32	128	256	1	64	4	128	128
3.11	08/09/05	32	128	256	0,5	64	1	128	128
3.13	16/10/05	32	128	256	2	64	8	64	64
3.14	22/12/05	16	128	256	2	64	2	64	64
3.15	09/02/06	8	128	256	1	64	8	256	16
3.16	15/11/06	16	128	256	1	64	16	1024	128

Amk, Amikacine ; Tm, Tobramycine ; Gn, Gentamicine ; Cip, Ciprofloxacine ; Fep, Céfépime ; Ipm, Imipénème ; Tic, Ticarcilline ; Caz, Ceftazidime. Les mutants MutGr1 et PT629 surproduisant, respectivement, les systèmes d'efflux actif MexXY(OprM) et MexAB-OprM sont utilisés comme témoins.

3. Evolution de la résistance chez le patient 3 [planche 3]

Chez le patient 3, actuellement âgé de 22 ans, la souche de primo-colonisation a été isolée en 1999. Depuis cette date et durant 8 ans, le laboratoire de Bactériologie du CHU a conservé 17 isolats supplémentaires présentant à l'antibiogramme des phénotypes différents. La détermination des CMI nous a conduit à écarter de notre sélection 5 isolats qui présentaient des niveaux de résistance aux 8 antibiotiques testés similaires à ceux des souches isolées antérieurement.

Le génotypage des isolats a produit des résultats différents selon les techniques utilisées (*cf paragraphe IV. Comparaison des méthodes de génotypages utilisées*). En effet, la RAPD effectuée dans un premier temps n'a pas permis d'établir clairement le nombre de clones présents. L'analyse par la technique de MLVA a révélé la présence de clones différents alors que l'analyse des SNPs par la méthode Clondiag[®] a démontré la présence d'un clone unique. Enfin, si l'on se réfère à la technique de référence, PFGE, 2 clones se succéderaient chez ce patient. Un premier clone correspondant aux isolats 3.1, 3.3, 3.5, 3.6, 3.8 et 3.9 laisse la place à un second clone regroupant les isolats 3.7, 3.10 à 3.16. La détermination des CMI chez les isolats sélectionnés a mis en évidence que les niveaux de résistance fluctuent au cours du temps. On peut ainsi observer une résistance élevée aux aminosides à partir de la souche 3.10 isolée en 2005. Les isolats collectés à partir de cette date présentent également une résistance accrue à la ciprofloxacine, la ticarcilline, la ceftazidime et le céfépime.

Chez le patient 3 le génotypage n'a pas permis d'établir la clonalité des isolats sélectionnés. L'utilisation d'une quatrième technique reposant sur le séquençage de gènes de ménage (MLST) pourrait être envisagée ; la détermination de la clonalité restant un préalable à l'interprétation de l'évolution de la résistance au cours du temps.

Au final, on note (i) une augmentation modérée et graduelle de la résistance aux aminosides, à la ciprofloxacine et à la ticarcilline chez un premier clone initialement de phénotype Tic^{HS} et (ii) l'apparition d'un second clone d'emblée résistant aux aminosides probablement par la production d'une enzyme modificatrice et qui devient, par la suite, beaucoup plus résistant à la tobramycine, la ticarcilline, la ceftazidime, l'imipénème et au céfépime.

Planche 4. Diversification des clones isolés chez le patient 4

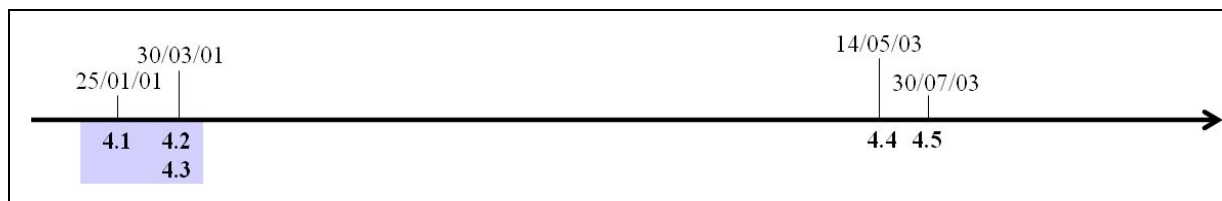


Figure 1. Chronologie d'apparition des nouveaux phénotypes de résistance

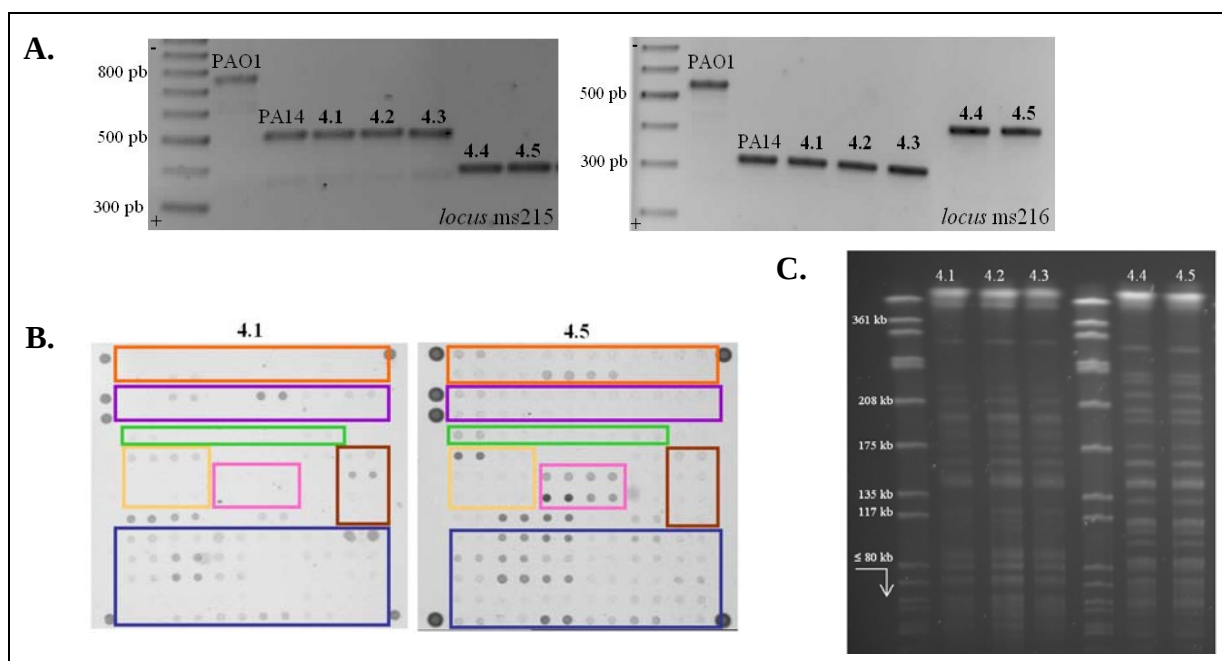


Figure 2. Génomique

A. Profils « MLVA » obtenus après amplification des loci ms215 et ms216. Les isolats appartenant au clone 1 (4.1, 4.2, 4.3) présentent 5 répétitions du locus ms215 et 2 répétitions du locus ms216 alors que les isolats appartenant au clone 2 en présentent, respectivement 1 et 2.

B. Profil « SNPs » obtenus par puces Clondiag®. Les isolats appartenant au clone 1 (4.1, 4.2, 4.3) présentent un profil SNP différent de ceux appartenant au clone 2.

C. Profils obtenus après restriction de l'ADN génomique par *DraI* puis électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Le génotypage par la méthode référence confirme la présence de 2 clones distincts chez le patient 4. PFGE réalisé par Pascal Cholley, Service d'hygiène hospitalière, CHU de Besançon

Tableau 1. Evolution de la résistance chez les isolats du patient 4

Souches	Date d'isolement	CMI (mg/L)							
		Amk	Tm	Gn	Cip	Fep	Ipm	Tic	Caz
PAO1	-	8	1	4	0,125	4	1	16	2
MutGR1	-	16	2	8	0,5	16	1	16	4
PT629	-	4	1	4	0,5	8	1	64	2
4.1	25/01/01	16	64	64	0,25	8	8	32	1
4.2	30/03/01	32	>128	>128	0,125	16	8	32	2
4.3	30/03/01	16	64	64	0,125	8	8	32	1
4.4	14/05/03	8	2	8	0,125	2	1	16	1
4.5	30/07/03	32	8	32	0,25	8	2	2	1

Amk, Amikacine ; Tm, Tobramycine ; Gn, Gentamicine ; Cip, Ciprofloxacine ; Fep, Céfépime ; Ipm, Imipénème ; Tic, Ticarcilline ; Caz, Ceftazidime. Les mutants MutGr1 et PT629 surproduisant, respectivement, les systèmes d'efflux actif MexXY(OprM) et MexAB-OprM sont utilisés comme témoins.

4. Diversification des souches de *P. aeruginosa* isolées chez le patient 4 [planche 4]

Chez ce patient, actuellement âgé de 8 ans, la souche de primo-colonisation a été isolée en janvier 2001. A partir des données de l'antibiogramme, le laboratoire de Bactériologie du CHU a collecté 10 isolats supplémentaires sur une période de 5 ans. Mais la détermination des CMI a montré que les six derniers isolats collectés présentaient en réalité le même niveau de résistance aux antibiotiques testés. Cette observation nous a conduit à les écarter de la sélection et ne conserver que 5 souches pour la suite de l'étude. L'analyse génotypique réalisée par la technique de MLVA et par puces Clondiag® a révélé chez ce patient la présence de deux clones dont les variants se sont succédés dans le temps. Ces résultats ont pu être confirmés par PFGE.

Le premier clone, correspondant à la souche de primo-colonisation (isolat 4.1) a donné naissance à un mutant (4.2) présentant une résistance accrue aux aminosides et au céfépime pouvant évoquer la surproduction du système MexXY(OprM). Le clone 2 est, quant à lui, apparu plus tardivement dans la colonisation (isolat 4.4). Son phénotype a rapidement évolué vers une résistance aux aminosides et au céfépime, associée à une hypersensibilité à la ticarcilline (Tic^{HS}) (isolat 4.5). L'analyse qualitative de quelques facteur de virulence a montré que le clone 1 n'était pas hémolytique et ne produisait pas de rhamnolipides contrairement au clone 2 [figure 64].

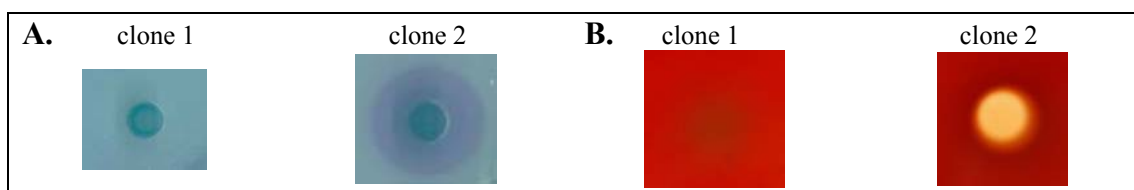


Figure 64. Analyse qualitative de la production de rhamnolipides (A) et du caractère hémolytique (B).

Contrairement aux isolats appartenant au clone 2 (4.4 et 4.5), les isolats du clone 1 (4.1, 4.2 et 4.3) ne produisent pas de rhamnolipides et ne présentent pas de caractère hémolytique.

Au final, chez le patient 4, on observe la co-existence de 2 clones avec (i) l'apparition pour chacun d'entre eux de mutants évoquant la surproduction du système d'efflux MexXY(OprM) et (ii) l'émergence d'un phénotype Tic^{HS} dans un cas.

Planche 5. Isolats du patient 5

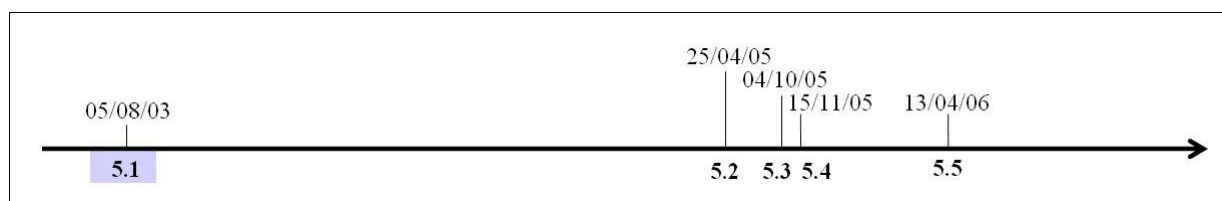


Figure 1. Chronologie d'apparition des nouveaux phénotypes de résistance

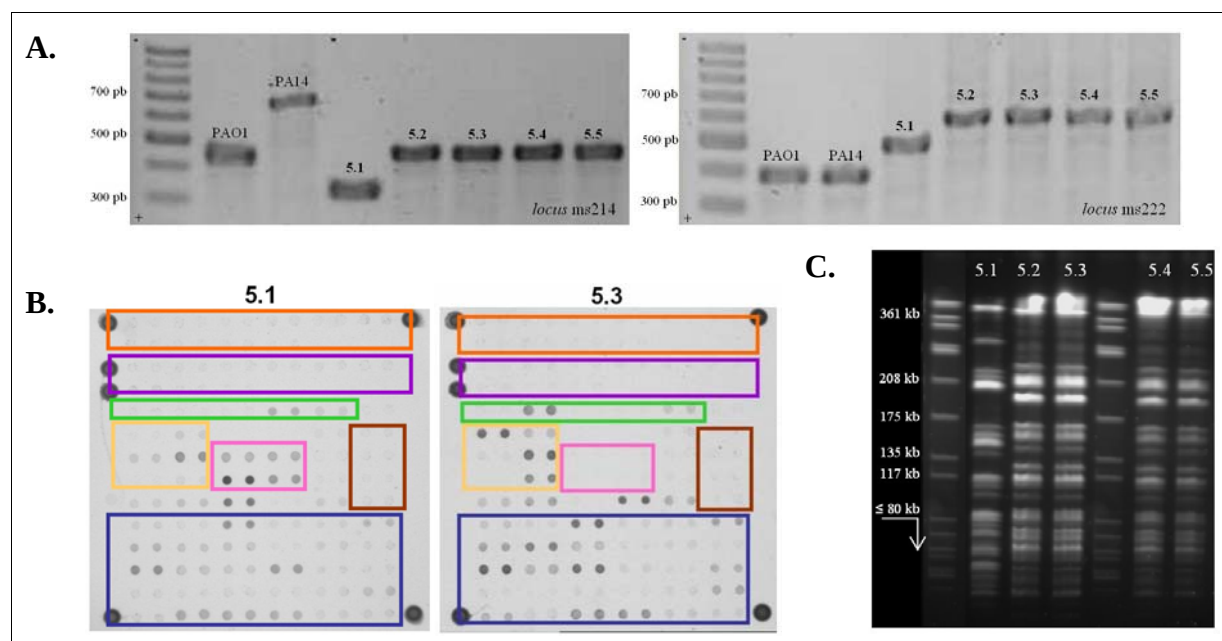


Figure 2. Génomique

A. Profils « MLVA » obtenus après amplification des loci ms214 et ms222. L'isolat appartenant au clone 1 (5.1) présente 2 répétitions du locus ms214 et 3 du locus ms222 alors que les isolats appartenant au clone 2 (5.2 à 5.5) en présentent respectivement 3 et 4.

B. Profil « SNPs » obtenus par puces Clondia®. L'isolat appartenant au clone 1 (5.1) présente un profil SNP différent de ceux appartenant au clone 2.

C. Profils obtenus après restriction de l'ADN génomique par *DraI* puis électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Le génotypage par la méthode référence confirme la présence de 2 clones distincts chez le patient 5. PFGE réalisé par Pascal Chollet, Service d'hygiène hospitalière, CHU de Besançon

Tableau 1. Evolution de la résistance chez les isolats du patient 5

Souches	Date d'isolement	CMI (mg/L)							
		Amk	Tm	Gn	Cip	Fep	Ipm	Tic	Caz
PAO1	-	8	1	4	0,125	4	1	16	2
MutGR1	-	16	2	8	0,5	16	1	16	4
PT629	-	4	1	4	0,5	8	1	64	2
5.1	05/08/03	4	2	4	0,125	2	1	16	1
5.2	25/04/05	32	8	32	1	16	1	1	1
5.3	04/10/05	>128	>128	>512	nd	8	2	8	8
5.4	15/11/05	>128	128	>512	nd	8	0,5	≤1	2
5.5	13/04/06	>128	128	>512	nd	8	0,5	2	2

Amk, Amikacine ; Tm, Tobramycine ; Gn, Gentamicine ; Cip, Ciprofloxacine ; Fep, Céfépime ; Ipm, Imipénème ; Tic, Ticarcilline ; Caz, Ceftazidime ; nd, non déterminé. Les mutants MutGr1 et PT629 surproduisant, respectivement, les systèmes d'efflux actif MexXY(OprM) et MexAB-OprM sont utilisés comme témoins.

5. Diversification des souches de *P. aeruginosa* isolées chez la patiente 5 [planche 5]

Chez la patiente 5, actuellement âgée de 20 ans, la souche de primo-colonisation a été isolée en 2003. A partir des données de l'antibiogramme le laboratoire de bactériologie du CHU a conservé 4 isolats supplémentaires sur une période de 3 ans. Après détermination des CMI, nous avons pu sélectionner l'ensemble des isolats car ils présentaient tous des phénotype de résistance distincts. L'analyse génotypique effectuée par les différentes méthodes a révélé la présence de deux clones qui se succèdent au cours du temps. Ainsi, la souche de primo-colonisation (isolats 5.1) appartient à un premier clone. Cette souche, de phénotype sauvage laisse place à un second clone (isolats 5.2 à 5.5) dont les niveaux de résistance aux aminosides et au céfépime sont d'emblée élevés évoquant la surproduction du système MexXY(OprM). Ce deuxième clone évolue ensuite avec le temps vers une résistance beaucoup plus forte aux aminosides (CMI de la tobramycine ≥ 128 mg/L) tout en conservant un phénotype Tic^{HS} (isolat 5.4 et 5.5). Les isolats du 2^{ème} clone ne produisent pas de rhamnolipides et semblent faiblement hémolytiques. Par ailleurs, aucune hybridation au niveau des facteurs de virulence du génome accessoire n'a pu être détectée par les puces Clondiag[®].

Chez la patiente 5, ce travail préliminaire a ainsi mis en évidence la présence de 2 clones qui se succèdent dans l'environnement pulmonaire. La souche de primo-colonisation de phénotype sauvage est remplacée par une souche Tic^{HS} probablement surproduisant le système MexXY(OprM) qui évolue vers une résistance élevée aux aminosides. Le premier clone laisse ainsi place à un second clone présentant une virulence apparemment réduite. Ces observations relatives à la virulence demandent toutefois à être confirmées qualitativement et quantitativement.

Planche 6. Isolats du patient 6

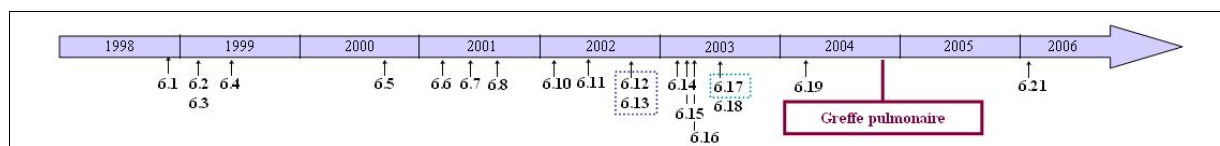


Figure 1. Chronologie d'apparition des nouveaux phénotypes de résistance

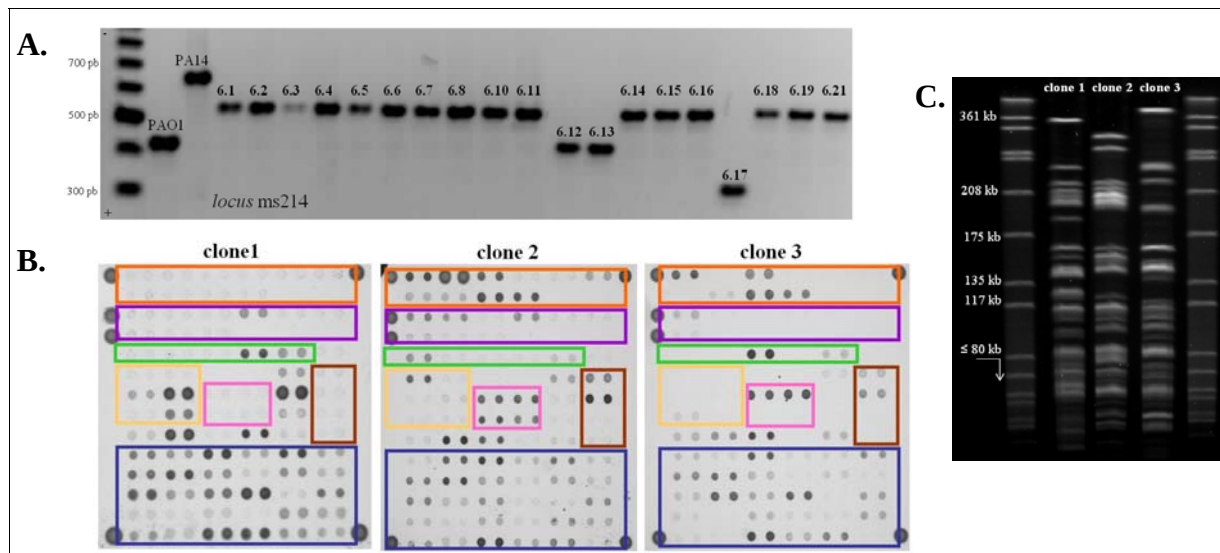


Figure 2. Génomique

A. Profils « MLVA » obtenus après amplification des *loci* ms214. Les isolats appartenant au clone 1 (6.1 à 6.11, 6.14 à 6.16 et 6.18 à 6.21) présentent 4 répétitions du *locus* ms215 alors que les isolats appartenant au clone 2 (6.12 et 6.13) et au clone 3 (6.17) en présentent respectivement 3 et 2.

B. Profil « SNPs » obtenus par puces Clondiag®. Les isolats appartenant au clone 1, clone 2 et clone 3 présentent des profils SNP différents.

C. Profils obtenus après restriction de l'ADN génomique par *Dra*I puis électrophorèse en champ pulsé (PFGE). Le génotypage par la méthode référence confirme la présence de 3 clones distincts chez le patient 6. PFGE réalisé par Pascal Cholley, Service d'hygiène hospitalière, CHU de Besançon

Tableau 1. Evolution de la résistance chez les isolats du patient 6

Souches	Date d'isolement	CMI (mg/L)							
		Amk	Tm	Gn	Cip	Fep	Ipm	Tic	Caz
PAO1	-	8	1	4	0,125	4	1	16	2
MutGR1	-	16	2	8	0,5	16	1	16	4
PT629	-	4	1	4	0,5	8	1	64	2
6.1	23/12/98	4	1	4	0,125	<1	1	16	1
6.2	29/07/99	4	1	4	0,5	4	1	16	2
6.3	29/07/99	4	2	4	0,125	2	1	16	1
6.4	05/08/99	8	2	8	0,25	4	0,5	8	1
6.5	32/10/00	8	2	8	4	4	1	16	2
6.6	23/03/01	8	2	4	8	4	0,5	16	1
6.7	10/08/01	8	2	8	4	8	1	16	2
6.8	30/10/01	8	2	8	0,5	8	0,5	32	2
6.10	16/02/02	8	2	8	8	32	1	64	16
6.11	17/05/02	>128	64	>128	8	64	1	64	8
6.12	30/08/02	4	2	4	0,125	2	1	16	1
6.13	30/08/02	8	4	16	0,125	4	1	16	2
6.14	14/02/03	16	2	16	4	32	8	128	64
6.15	11/03/03	16	2	16	8	32	16	128	64
6.16	10/04/03	64	8	32	4	8	8	32	8
6.17	16/05/03	64	4	16	0,5	8	1	64	4
6.18	16/05/03	32	8	16	8	32	1	128	32
6.19	18/03/04	32	8	16	4	64	2	256	>128
6.21*	13/02/06	32	8	32	2	8	16	64	16

Amk, Amikacine ; Tm, Tobramycine ; Gn, Gentamicine ; Cip, Ciprofloxacine ; Fep, Céfépime ; Ipm, Imipénème ; Tic, Ticarcilline ; Caz, Ceftazidime. Les mutants MutGr1 et PT629 surproduisant, respectivement, les systèmes d'efflux actif MexXY(OprM) et MexAB-OprM sont utilisés comme témoins.

* post greffe

6. Diversification des souches de *P. aeruginosa* isolées chez le patient 6 [planche 6]

Chez ce patient, âgé aujourd'hui de 22 ans, la colonisation chronique à *P. aeruginosa* débute en 1998, date d'isolement de la première souche (isolat 6.1). Le laboratoire de Bactériologie du CHU a collecté 19 isolats supplémentaires jusqu'en 2004, date à laquelle le patient a pu bénéficier d'une greffe pulmonaire. La colonisation par *P. aeruginosa* a persisté *post* greffe et conduit à l'isolement d'un phénotype de résistance supplémentaire (isolat 6.21). Parmi les 21 isolats conservés, 2 ont été exclus de l'étude après détermination des CMI car ils présentaient des niveaux de résistance trop peu différents de ceux d'autres isolats.

L'analyse génotypique, par MLVA, puces Clondiag[®] et PFGE, révèle la présence de trois clones. Le clone 1, majoritaire et correspondant à la souche de primo-colonisation, est à l'origine d'une diversification extrême des profils de résistance alors que les clones 2 (isolats 6.12 et 6.13) et 3 (isolat 6.17) ne sont apparus que transitoirement. Chez ce patient, la souche de primo-colonisation (isolat 6.1) présente un phénotype de résistance sauvage comparable à celui de la souche de référence PAO1. Cette souche se diversifie au cours du temps conduisant à l'apparition de sous-populations dont les niveaux de résistance fluctuent. Ainsi, on peut observer une augmentation graduelle de la résistance aux aminosides 2 fois (isolats 6.4 à 6.10), 4 fois (isolats 6.14 et 6.15) puis 8 fois (isolats 6.18 à 6.21) supérieure au niveau de résistance initial. Cette tendance est retrouvée vis-à-vis de la ciprofloxacine, du céfépime, de l'imipénème, de la ticarcilline et de la ceftazidime. La résistance très élevée aux aminosides de l'isolat 6.15 évoque la production d'une enzyme inactivatrice. La résistance croisée entre les aminosides, la ciprofloxacine et le céfépime observée chez les isolats du clone 1 à partir de l'isolat 6.4 suggère quant à elle l'apparition d'un mutant d'efflux MexXY(OprM) au sein du clone initial. La surexpression du gène *mexY* (entre 13 et 75 fois celle de la souche PAO1) détectée par RT-PCR en temps réel confirme cette hypothèse. Les clones 2 et 3 n'ont cependant pas montré de surexpression du gène *mexY*.

L'analyse de la série d'isolats collectée chez le patient 6 sur une période de 8 ans a mis en évidence la présence de 3 clones différents dont un (clone 1 initial) s'est diversifié phénotypiquement (15 phénotypes de résistance différents). Cette hypervariabilité pourrait être révélatrice de la capacité d'adaptation de ce clone et expliquer sa persistance au cours du temps dans le poumon même après l'épisode de greffe. Il est intéressant de noter que l'isolat post greffe 6.21 redevient un peu plus sensible aux β -lactamines à l'exception de l'imipénème.

V. Conclusion

L'analyse des séries d'isolats collectées chez 6 patients a permis de mettre en évidence une diversification des phénotypes de résistance des clones isolés chez les patients colonisés à un stade chronique. On observe ainsi que les souches de primo-colonisation, à l'origine sensibles, donnent naissance à des sous-populations fluctuantes ayant des caractéristiques et des mécanismes de résistance spécifiques. L'évolution des phénotypes reste toutefois individuelle et se révèle complexe. On a ainsi pu observer, chez un même patient, la présence d'une ou plusieurs souches ayant acquis au cours du temps des mécanismes de résistance spécifiques du contexte CF tels que la surproduction du système MexXY(OprM) ou l'apparition d'un phénotype Tic^{HS}. Parallèlement, certaines souches ont développé des mécanismes non caractérisés à ce jour pouvant par exemple conférer une résistance isolée à l'amikacine (isolat 6.17).

De façon générale on constate (i) que le phénotype Tic^{HS} apparaît spontanément au cours de la colonisation (patients 4 et 7) ou est présent précocement chez les souches de primo-colonisation (patients 3 et 5) et (ii) que l'augmentation de la résistance aux aminosides se révèle progressive avec l'apparition possible de hauts niveaux de résistance évoquant la présence d'enzymes inactivatrices.

Conclusion - Perspectives

Caractérisation du phénotype Tic^{HS}

Dans un premier temps, ce travail a mis en évidence que plus d'un patient atteint de mucoviscidose sur deux suivis au CHU de Besançon est colonisé par des souches de *P. aeruginosa* dont le système d'efflux actif MexAB-OprM est déficient. L'inactivité de ce système se traduit, *in vitro*, par un phénotype d'hypersensibilité à la ticarcilline, l'aztréonam et la pipéracilline, β -lactamines parfois utilisées dans le traitement de l'infection broncho-pulmonaire (Ramsey 1996¹⁸²). Les souches présentant ce phénotype, noté Tic^{HS}, sont principalement retrouvées au stade de la colonisation chronique mais peuvent également apparaître rapidement en début de colonisation. En effet, parmi les 46 patients étudiés, nous avons pu observer le phénotype Tic^{HS} chez 63 % des adultes (17/27) et chez 42% des enfants (8/19). Ces souches arrivent à se maintenir dans les poumons des patients malgré l'administration itérative de β -lactamines. Toutefois, il a été reporté que certaines populations de *P. aeruginosa* pouvaient s'adapter à la forte pression de sélection dans l'environnement pulmonaire CF (i) par une surproduction, stable ou transitoire, de la céphalosporinase AmpC (Giwerzman *et al.* 1990⁵⁵), (ii) par une diminution de la perméabilité membranaire (Ballesterio *et al.* 1996¹¹) ou (iii) par l'altération des PLP (Godfrey *et al.* 1981⁵⁶). Il est à noter que le traitement anti-pyocyanique de référence en France dans la mucoviscidose est basé sur l'administration de ceftazidime, antibiotique dont l'efficacité *in vitro* n'est peu affectée par la « perte » du système MexAB-OprM.

Par ailleurs, les souches étudiées peuvent présenter parallèlement une résistance accrue aux aminosides, à la ciprofloxacine et au céfépime, molécules substrats du système MexXY(OprM). Comme cela a déjà été décrit dans la littérature (Islam *et al.* 2004⁸⁹ ; Vogne *et al.* 2004²²⁷ ; Islam *et al.* 2009⁹⁰), la surproduction des protéines MexX et MexY, qui s'associent à la protéine OprM pour former un système tripartite fonctionnel (Aires *et al.* 1999²), entraîne chez les souches Tic^{HS} une augmentation variable des niveaux de résistance aux aminosides (CMI 4 à 64 fois supérieures à celles observées chez la souche PAO1). Les expériences de répression de l'opéron *mexXY* par le plasmide pAZ17 ou d'inactivation du gène *mexY* par insertion du plasmide suicide pUC Δ Y ont montré, pour la première fois, que le système MexXY(OprM) conférait à certains isolats (2804 et 3066) une résistance élevée aux aminosides (CMI gentamicine : 64 mg/L). Bien que les facteurs modulant l'activité du système MexXY(OprM) soient

peu connus à ce jour (Sobel *et al.* 2003²¹¹ ; Vogne *et al.* 2004²²⁷), nous avons mis en évidence une mutation dans la protéine MexY capable d'augmenter la résistance aux aminosides, à la ciprofloxacine et au céfépime d'un facteur 2. Cette mutation n'explique pas, à elle seule, les hauts niveaux de résistance à la gentamicine (CMI de 64 mg/L) des isolats 2804 et 3066. Or les deux isolats les plus résistants aux aminosides sont les seuls de la série étudiée qui produisent des protéines MexB tronquées. Nous pourrions donc envisager l'hypothèse qu'un système chimérique MexAY-OprM se forme chez ces bactéries et participe en plus du système MexXY(OprM) à la résistance aux aminosides. Cependant, les travaux de co-précipitation réalisés par Mokhonov *et al.* n'ont pas mis en évidence d'interaction évidente entre les protéines MexA et MexY (Mokhonov *et al.* 2004¹⁵²).

Le fait que chez les isolats CF on trouve une proportion non négligeable (60,4%) de souches surproduisant le système MexXY(OprM) et un MexAB-OprM déficient pourrait évoquer l'existence d'un régulateur commun au deux pompes, responsable de ce déséquilibre. Toutefois, les deux événements apparaissent indépendants car l'isolat 3020R semble avoir acquis une résistance aux aminosides concomitante de l'apparition du phénotype Tic^{HS} alors que l'isolat 615R provient d'une souche (615S) déjà hypersensible aux β -lactamines avant d'être résistante aux aminosides.

L'efflux actif de type MexAB-OprM ne semble pas nécessaire pour que la bactérie puisse persister au niveau pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose. Le mode de vie qu'adopte *P. aeruginosa* dans cette pathologie lui confère probablement une résistance suffisante aux β -lactamines *in vivo*. En revanche, la surproduction du système MexXY(OprM) serait nécessaire pour répondre à la forte pression de sélection exercée par les aminosides et, plus particulièrement, par les aérosols de tobramycine.

Les raisons de ce déséquilibre d'efflux sont aujourd'hui inconnues mais confortent les travaux publiés par Smith *et al.* qui ont mis en évidence, chez des isolats CF isolés après 8 ans de colonisation, (i) l'apparition de mutation dans *mexA* entraînant la production de protéines tronquées ou inactives et (ii) la surproduction du système MexXY(OprM) associée à des mutations dans le gène régulateur *mexZ* (Smith *et al.* 2006²⁰⁹). C'est pourquoi nous envisageons d'explorer les causes génétiques conduisant à ce phénotype particulier, mais également les raisons de son émergence et l'avantage que peut en tirer

la bactérie. Dans notre étude, nous ne disposions que d'un couple isogénique sauvage/Tic^{HS} isolé dans un même prélèvement (3020S/3020R). Compte tenu de l'hétérogénéité des souches de *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose et afin de valider les résultats obtenus, nous projetons de cribler la bibliothèque du laboratoire dans le but de sélectionner une dizaine de couples isogéniques supplémentaires. Ces couples seront prioritairement recherchés chez les 11 patients pour lesquels nous avons déjà caractérisé les isolats Tic^{HS} sur le plan génétique et sur le plan fonctionnel. Après la détermination des profils de sensibilité des couples sauvage/Tic^{HS}, différents axes de recherche seront explorés.

Dans un premier temps, la complémentation des souches Tic^{HS} à l'aide d'une banque génomique issue de leurs parents wt respectifs permettra de restaurer la résistance sauvage (CMI de la ticarcilline égale à 16 mg/L) et ainsi d'identifier les gènes, en dehors de *mexA* et *mexB*, responsables de l'inactivité de MexAB-OprM. Par la suite, il sera intéressant de déterminer si les souches Tic^{HS} présentent des caractéristiques particulières en termes de croissance et de virulence pouvant leur conférer un avantage dans l'environnement pulmonaire CF. La formation de micro-colonies (biofilm) et la croissance en micro-aérophilie sont deux éléments caractéristiques du développement de *P. aeruginosa* dans les voies pulmonaires CF (Haussler *et al.* 1999⁷⁰ ; Hassett *et al.* 2002⁶⁸). La capacité des couples isogéniques à former du biofilm et à se développer en anaérobiose/microaérophilie sera évaluée *in vitro* afin de mettre en évidence une différence éventuelle entre les souches Tic^{HS} et sauvages. Par ailleurs, il sera intéressant de déterminer si les souches Tic^{HS} ont un effet pro-inflammatoire supérieur à celui des souches sauvages. Jusqu'à présent, les travaux sur le sujet ont été principalement réalisés avec des souches entretenues de *P. aeruginosa* (PAO1, PA14, PAK) et différentes lignées cellulaires. C'est pourquoi de nombreuses inconnues subsistent quant à la capacité des souches cliniques d'induire les différentes voies de signalisation pro-inflammatoire notamment chez les macrophages humains. La réponse inflammatoire pouvant être modulée par différents facteurs de virulence (hémolysines, protéases, sidérophores...) (Wagner *et al.* 2006²²⁹), il est envisagé d'en quantifier leur production et de déterminer s'il existe, ou non, une variation entre les souches Tic^{HS} et leurs parents isogéniques wt. A long terme, ce projet vise donc à déterminer les avantages que présente pour la bactérie l'inactivation de son système principal d'efflux au cours de la colonisation bronchique.

Suivi de la colonisation chez les patients colonisés chroniques

Dans la seconde partie du travail, nous avons étudié la clonalité de différents isolats collectés au cours du temps, chez 6 patients colonisés à un stade chronique. Quelles que soient les méthodes utilisées, nous n'avons pas mis en évidence de transmission croisée entre les malades. Compte tenu de la petite taille de cette cohorte, il n'est pas possible de généraliser ces résultats.

Par ailleurs, les techniques de MLVA, Clondiag® et PFGE ont conduit à des résultats similaires, à l'exception du patient 3 pour lequel une interrogation demeure sur le nombre de clones retrouvés dans l'environnement pulmonaire. La technique de génotypage par MLST (*Multilocus Sequence Typing*), validée chez différentes espèces bactériennes, pourrait peut-être lever le doute chez ce patient. En revanche, notre expérience montre que l'interprétation des résultats obtenus par la méthode de RAPD pose parfois problème. En effet, cette technique s'avère parfois peu reproductible et moins discriminante que la méthode de référence PFGE. Le typage par PFGE a toutefois ses limites selon le contexte épidémiologique et la période de temps considérée. Compte tenu des remaniements génétiques importants survenant chez les souches de *P. aeruginosa* CF (Jelsbak *et al.* 2007⁹⁶ ; Mena *et al.* 2008¹⁴⁵), il pourrait être envisagé d'adapter les critères d'interprétation décrits par Tenover *et al.* (Tenover *et al.* 1995²²¹). La validation de ces nouveaux critères demanderait l'analyse approfondie d'une collection de souches plus importante. Enfin, l'utilisation des puces Clondiag® est apparue particulièrement intéressante chez les isolats CF. Outre les informations de génotypage, ces puces nous renseignent sur le génome accessoire de chaque isolat. Il est ainsi possible de détecter la présence de gènes codant différents facteurs de virulence.

L'étude de la clonalité des isolats CF et de quelques facteurs de virulence nous a permis d'étudier l'évolution dans le temps des profils de résistance aux antibiotiques chez plusieurs patients et d'analyser de façon préliminaire quelques facteurs de virulence. Ainsi, nous avons pu observer une diversification des phénotypes de résistance chez la plupart des malades. Les souches de primo-colonisation, le plus souvent sensibles à l'origine, donnent naissance à des sous-populations fluctuantes ayant des

caractéristiques et des mécanismes de résistance spécifiques. Certaines de ces sous-populations évoluent vers la multirésistance, tandis que d'autres, au contraire, deviennent hypersensibles à certains antibiotiques comme, par exemple, le phénotype Tic^{HS} précédemment décrit. L'évolution des niveaux de résistance aux antibiotiques ne reflète probablement que partiellement les modifications phénotypiques associées au mode de vie dans le poumon CF. En effet, d'autres caractères tels que le morphotype, la virulence, le métabolisme ou encore la croissance sont très vraisemblablement modifiés. L'identification et la caractérisation des facteurs associés à l'adaptation et l'évolution de la résistance des souches de *P. aeruginosa* isolées dans le contexte CF se poursuivra au sein de notre équipe de recherche. Pour cela, nous envisageons de comparer le profil d'expression génique de la souche de primo-colonisation avec celui de 2 isolats plus tardifs, l'un retrouvé à un stade précoce de colonisation et l'autre à un stade chronique. En préalable à cette analyse transcriptionnelle globale par puce ADN nous avons pu identifier grâce à notre travail de génotypage des clones représentatifs des trois stades de colonisation. Nous comparerons le transcriptome de chacun exposé ou non à un aminoside (tobramycine) afin de mieux comprendre l'adaptation de la bactérie au niveau pulmonaire malgré la pression antibiotique. La compréhension de ces mécanismes d'adaptation reste un préalable à l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques qui doivent dorénavant s'appuyer sur une meilleure connaissance de la physiologie et de la génétique bactérienne.

Annexe 1

Liste et séquences des sondes greffées sur la puce Clondiaq®

Probe name	Accession no.	Reference	5'-3'-Sequence (probe)	Start	Stop
oriC PAO	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	GAAGCCCAAGCAATTGCGTGTTC	155	177
oriC non-PAO	CP000438.1 Gi:115583796	UCBPP-PA14, complete genome, Lee et al. (2006)	GAAGCCCAAGCAACTGCGTGTTC	155	177
oprL (1) PAO	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	GGTGCTGCAGGGTGTTCGCCGG	1057783	1057805
oprL (1) non-PAO	CP000438.1 Gi:115583796	UCBPP-PA14, complete genome, Lee et al. (2006)	GGTGCTGCAGGGCGTTTCGCCGG	4593752	4593730
oprL (2) PAO	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	GTGCTGCAGGGTGTTCGCCG	1057784	1057804
oprL (2) non-PAO	CP000438.1 Gi:115583796	UCBPP-PA14, complete genome, Lee et al. (2006)	GTGCAAGGGCGTTTCGCCG	4593749	4593731
flhCa (1) PAK	M57501.1 Gi:151225, AJ865693.1 Gi:118402729	PAK, Totten and Lory (1990), flagellin type a2, Giske et al. (2006)	CAAGATCGCGCGTGCAGTCAAC	1067462	1088483
flhCa (1) non-PAK	L81147.1 Gi:3386643, AJ865694.1 Gi:118402731	ATCC15691, Spangenberg et al. (1998), flagellin type a1, Giske et al. (2006)	CAAGATCGCGCGTGCAGTCAAC	768462	789483
flhCa (2) PAK	M57501.1 Gi:151225, AJ865693.1 Gi:118402729	PAK, Totten and Lory (1990), flagellin type a2, Giske et al. (2006)	CAAGATCGCGCGAGCGGTCAACGAC	1067462	1091486
flhCa (2) non-PAK	L81147.1 Gi:3386643, AJ865694.1 Gi:118402731	ATCC15691, Spangenberg et al. (1998), flagellin type a1, Giske et al. (2006)	CAAGATCGCGCGTGCAGTCAACGAC	768462	792486
alkB2 PAO	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	CCTCGCCCTGTTCCACCGCTCTGG	1659515	1659491
alkB2 non-PAO	AJ633613.1 Gi:48927318	ATCC 15691, Morales et al. (2004)	CTCGCCCTGTTCCCGCCGCTCTGG	1194	1217
citS-1 PAO	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	TCGAGCAACTGGCAGAGAAATCCG	1720175	1720152
citS-1 non-PAO	CP000438.1 Gi:115583796	UCBPP-PA14, complete genome, Lee et al. (2006)	CGAGCAACTGGCGGAGAAATCCG	3923335	3923357
citS-2 PAO	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	GCGGAAAATTCCTGCACATGATGTT	1719813	1719788
citS-2 non-PAO	AE004091.2 Gi:110227054	Kiewitz and Tummlier. J Bacteriol. (2000) 182:3125-35.	GCGGAAAATTCCTCCACATGATGTT	1719827	
oprI (1) PAO	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	AGCTCAGCAGACTGCTGACGAGG	3207097	3207119
oprI (1) non-PAO	CP000438.1 Gi:115583796	UCBPP-PA14, complete genome, Lee et al. (2006)	AGCTCAGCAGACGCTGACGAG	2362286	2362265
oprI (2) PAO	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	GCTCAGCAGACTGCTGACGAGGCTAAG	3207098	3207125
oprI (2) non-PAO	CP000438.1 Gi:115583796	UCBPP-PA14, complete genome, Lee et al. (2006)	GCTCAGCAGACCGTGCAGGAGGCTAAC	2362285	2362259
ampC-1 PAO	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	ACGGCCGCGCGGTGACGCC	4594255	4594273
ampC-1 non-PAO	AY083593.1 Gi:20135561	De Champs et al. (2002), Kiewitz and Tummlier. J Bacteriol. (2000)	ACGGCCGCGCAGGTGACGCCG	266	285
ampC-3 PAO	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	CGACCTACGCGCCGGGCGAG	4594528	4594546
ampC-3 non-PAO	AY083593.1 Gi:20135561	De Champs et al. (2002), Kiewitz and Tummlier. J Bacteriol. (2000)	CGACCTATGCGCCGGGCGAGC	539	558
ampC-4 PAO	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	CGTTTCAAACGGCTCATGGAGCAG	4594615	4594637
ampC-4 non-PAO	AY083593.1 Gi:20135561	De Champs et al. (2002), Kiewitz and Tummlier. J Bacteriol. (2000)	CGTTTCAAACGACTCATGGAGCAGC	626	649
ampC-5 PAO	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	TGGAGCAGCAAGTGTTCGCCGC	4594630	4594651
ampC-5 non-PAO	AF490770.1 Gi:19919853	De Champs et al. (2002), Kiewitz and Tummlier. J Bacteriol. (2000)	TGGAGCAGCAACTGTTCGCCGC	646	667
ampC-6 PAO	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	GAACAAGACCGGTTCCACCAACGG	4595048	4595071
ampC-6 non-PAO	CP000438.1 Gi:115583796	UCBPP-PA14, complete genome, Lee et al. (2006)	AACAAGACCGGCTCCACCAACGG	932804	932782
ampC-7 PAO	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	CGACCTGGGCGCTGGTGATCCT	4595105	4595125
ampC-7 non-PAO	AY083595.1 Gi:20135565	De Champs et al. (2002), Kiewitz and Tummlier. J Bacteriol. (2000)	GGACCTGGGACTGGTGATCCTGG	1120	1143
flhC a	L81147.1 Gi:3386643	ATCC15691, Spangenberg et al. (1998)	GTCGCTGAACGGGCACTACTTCA	609	631
flhC b	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	GCCGACCAACTGAAGTCCCAACTCG	1183880	1183903
exoS	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	CAGCCCAAGTCAGGACGCGCA	4304250	4304231
exoU	CP000438.1 Gi:115583796	UCBPP-PA14, complete genome, Lee et al. (2006)	CGCCAGTTTGAGAACGGAGTCAAC	4582759	4582736
fpvA type I	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	CCTGAATCCGACCAATTCGGGAGTC	2656860	2656883
fpvA type IIa	AF537095.1 Gi:24571197	de Chial et al. (2003)	TCGGACTGTACTCTACGAAGCAGC	1848	1872
fpvA type IIb	AF540993.1 Gi:27502156	Spencer et al. (2003)	CCAATCCCTATCGCTGGAACCGTACC	41162	41187
fpvA type III	AF537094.1 Gi:24571194	de Chial et al. (2003)	GCTCGGAGACTCGCAATTTTCGTCC	1754	1775
fpvB	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	GCGTTATTGCTCGGTCTCTCTCTCG	4663875	4663898
LES	unpublished sequence	LES400 (personal communication C. Winstanley)	TGCATAGGAGTCAATGCGCACAGCA		

Probe name	Accession no.	Reference	5'-3'-Sequence (probe)	Start	Stop
PA0636	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	GCCAAATTGGGTCAGCAAGCAACG	692161	692183
PA0722	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	CGTGTGCGGAACATCGCATGGC	790786	790806
PA0728	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	CTGGAGCCTGCGAAAGTGGCTC	796090	796111
PA2185	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	ACGAGGTGATGGCTGGGAATACG	2406678	2406701
PA2221	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	CAGTTGTGCCAGGCTCTGGAGAAATCC	2443377	2443402
PA3835	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	CACATCAATGTACAGCCACACGCCA	4294567	4294545
fla-island	AF332547.1 Gi:13183732	Arora et al. (2001)	ACCTGTGTCGCTGGAGGGTATGTT	3452	3475
orfA	AF332547.1 Gi:13183732	Arora et al. (2001)	CGCTGGAGGGTATGTTCCGCAAGG	3460	3483
orfI	AF332547.1 Gi:13183732	Arora et al. (2001)	CCTGGACCTCTCCAAGGTTCCGCT	10668	10691
orfJ	AF332547.1 Gi:13183732	Arora et al. (2001)	GCCATTCGACGACCAACAAGGC	12405	12428
PA0980	AE004091.2 Gi:110227054	PAO1- Sequence, Stover et al. (updated 2006)	CGGTATGAAGATGGGTGGTTGGGTCG	1062618	1062643
XF1753	CP000438.1 Gi:115583796	UCBPP-PA14, complete genome, Lee et al. (2006)	TGCGAGGACCAGAAACCTTGATGG	5357627	5357604
acetyltransferase	CP000438.1 Gi:115583796	UCBPP-PA14, complete genome, Lee et al. (2006)	CGAAGCGTAGGGTCTTCGTAGCC	4585279	4585257
pKL-1	AY257538.1 Gi:37955661	Klockgether et al. (2004)	CACCATGCAAAATGCTCGATGGAATGC	619	644
pKL-3	AY257538.1 Gi:37955661	Klockgether et al. (2004)	TCTGAACCTGCGGCTATCACCTGGA	8707	8730
TB-C47-1	unpublished sequence	P. aeruginosa TB, pKLC102 related gene island integrated in tRNA(Lys) PA4541.1	GCAGCGTCCAAGTTGGAGCTCTCC		
TB-C47-2	unpublished sequence	P. aeruginosa TB, pKLC102 related gene island integrated in tRNA(Lys) PA4541.1	TCCAACAGGACGAGGATACAGGGTG	5318353	5318332
PAP1-1 pili chaperone	CP000438.1 Gi:115583796	UCBPP-PA14, complete genome, Lee et al. (2006)	GGAACACAACGTGGGCGTGAC	5270538	5270516
PAP1-1 luminal binding prote	CP000438.1 Gi:115583796	UCBPP-PA14, complete genome, Lee et al. (2006)	CCAGTTGGCACCAACCATGCTTCG		
pKLC conserved hypoethetica	AY257538.1 Gi:37955661	Klockgether et al. (2004)	GCCTGCCTACTTGTTCCTCCAACGC	6786	6808
pKLC adhesin	AY257538.1 Gi:37955661	Klockgether et al. (2004)	GGCTGTATTGCCCGCCATTCTCC	84476	84498
pKLC fatty acid synthase	AY257538.1 Gi:37955661	Klockgether et al. (2004)	CGACAGACAGAAAGGTTCTTGCGC	96612	96636
PAGI-2/3-4	AF440523.1 Gi:24461522	Larbig et al. (2002)	GCGCCTCTCCTCTTTGCAGATGT	95633	95656
PAGI-2/3-5	AF440523.1 Gi:24461522	Larbig et al. (2002)	CAGTATGGTACGGACACGAAGCGC	121958	121981
PAGI-2/3-6	AF440523.1 Gi:24461522	Larbig et al. (2002)	CCATGGTCGGAACAGGCACGATATGC	128281	128306
C-45	AF440523.1 Gi:24461522	Larbig et al. (2002)	CGAGGAGTTTTCGGACCCGCTTTGA	72652	72675
C-46	AF440523.1 Gi:24461522	Larbig et al. (2002)	CGAAGCTGAGGTGTGGACCCGC	73566	73588
C-47	AF440523.1 Gi:24461522	Larbig et al. (2002)	CCACTCGATCATGTTGAGCATCGGCTCC	74082	74109
PAGI-2	AF440523.1 Gi:24461522	Larbig et al. (2002)	GCATCATTTGCGGTCACATCTGGT	36101	36124
PAGI-2/3-1	AF440523.1 Gi:24461522	Larbig et al. (2002)	GACCGAAGCAGAAACGGCATGC	27763	27785
PAGI-3-1	AF440524.1 Gi:24461644	Larbig et al. (2002)	CCCGTTGCTCTATAACCCGTTCTCTG	16703	16726
PAGI-3-8	AF440524.1 Gi:24461644	Larbig et al. (2002)	GGTTAGTCCCTTCTGCCCGCATCG	93929	93952
tRNA(Pro)- island 1	unpublished sequence	P. aeruginosa TB, gene island integrated into tRNA(Pro) PA2736.1	GTGTACGGCCCCATGTCTAGCAGC		
tRNA(Pro)- island 2	unpublished sequence	P. aeruginosa TB, gene island integrated into tRNA(Pro) PA2736.1	AGGCCATGGGCTAGCCGGATGC		
PAGI-1	AF241171.1 Gi:12698376	Liang et al. (2001)	TTCTCGGTGTCGAGGGATTCTCGG	1759	1782

Efflux Unbalance in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Cystic Fibrosis Patients[▽]

Lucie Vettoretti,¹ Patrick Plésiat,^{1*} Cédric Muller,¹ Farid El Garch,² Gilles Phan,³ Inna Attrée,⁴ Arnaud Ducruix,³ and Catherine Llanes¹

Department of Bacteriology, University of Franche-Comté, Faculty of Medicine, F-25030 Besançon, France¹; Unité de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, Université Catholique de Louvain, Brussels, Belgium²; Laboratoire de Cristallographie, RMN Biologique, UMR CNRS 8015, Faculté de Pharmacie, Paris V, F-75270 France³; and Commissariat à l'Energie Atomique, Laboratoire de Biochimie et de Biophysique des Systèmes Intégrés, F-38054 Grenoble, France⁴

Received 31 July 2008/Returned for modification 10 October 2008/Accepted 18 February 2009

Retrospective analysis of 189 nonredundant strains of *Pseudomonas aeruginosa* sequentially recovered from the sputum samples of 46 cystic fibrosis (CF) patients over a 10-year period (1998 to 2007) revealed that 53 out of 189 (28%) samples were hypersusceptible to the β -lactam antibiotic ticarcillin (MIC ≤ 4 μ g/ml) (phenotype dubbed Tic^{hs}). As evidenced by *trans*-complementation and gene inactivation experiments, the mutational upregulation of the efflux system MexXY was responsible for various degrees of resistance to aminoglycosides in a selection of 11 genotypically distinct strains (gentamicin MICs from 2 to 64 μ g/ml). By demonstrating for the first time that the MexXY pump may evolve in CF strains, we found that a mutation leading to an F1018L change in the resistance-nodulation-cell division (RND) transporter MexY was able to increase pump-promoted resistance to aminoglycosides, cefepime, and fluoroquinolones twofold. The inactivation of the *mexB* gene (which codes for the RND transporter MexB) in the 11 selected strains showed that the Tic^{hs} phenotype was due to a mutational or functional loss of function of MexAB-OprM, the multidrug efflux system known to contribute to the natural resistance of *P. aeruginosa* to β -lactams (e.g., ticarcillin and aztreonam), fluoroquinolones, tetracycline, and novobiocin. Two of the selected strains synthesized abnormally low amounts of the MexB protein, and 3 of 11 strains expressed truncated MexB ($n = 2$) or MexA ($n = 1$) polypeptide as a result of mutations in the corresponding genes, while 7 of 11 strains produced wild-type though nonfunctional MexAB-OprM pumps at levels similar to or even higher than that of reference strain PAO1. Overall, our data indicate that while MexXY is necessary for *P. aeruginosa* to adapt to the hostile environment of the CF lung, the MexAB-OprM pump is dispensable and tends to be lost or inactivated in subpopulations of *P. aeruginosa*.

The chronic colonization of the airways by *Pseudomonas aeruginosa* is often associated with a decline in respiratory function and higher rates of morbidity in cystic fibrosis (CF) patients (44). As antibiotic chemotherapy remains the cornerstone of the management of CF lung infection, many studies have attempted to correlate the results of *in vitro* methods for susceptibility testing to patients' outcomes in order to optimize individual treatments. However, clinical practice brings evidence that the administration of antibiotics predicted to be poorly efficient by *in vitro* susceptibility tests may actually improve the condition of some CF patients (16, 67, 73). On the other hand, strains that are susceptible to many antibiotics *in vitro* may turn out to be impossible to eradicate *in vivo* by "appropriate" antibiotic regimens. The reasons why conventional parameters (MIC and MBC) fail to reliably predict clinical success in the treatment of pulmonary exacerbations are complex and related to both host and bacterial factors (21). For instance, the mode of life of *P. aeruginosa* in CF airways is believed to contribute to the higher resistance of the pathogen *in vivo* (recently discussed in reference 55). Alternatively, the

great phenotypic diversity of bacterial populations at the stage of chronic infection may be underestimated when routine susceptibility tests are performed on a colony morphotype basis (14, 30, 61, 69).

More than three decades ago, May and Ingold (51) reported the existence of an intriguing subpopulation of *P. aeruginosa* in the sputum samples of CF patients that is hypersusceptible to carbenicillin *in vitro* (MIC ≤ 6 μ g/ml). The strains exhibiting this particular phenotype, dubbed Tic^{hs} in the present paper (for hypersusceptibility to ticarcillin), accounted for 33% of the selected isolates. A subsequent study confirmed the high prevalence of these strains (45%) and their even distributions among the mucoid and nonmucoid populations of *P. aeruginosa* (30). The Tic^{hs} phenotype, which extends to other penicillins (e.g., azlocillin and piperacillin), tetracycline, and trimethoprim but not to aminoglycosides, was attributed to qualitative variations in outer membrane proteins (30) and later on was associated with mutations in a genetic locus closely linked to *nalB* (15). Interestingly, studies in the 1990s demonstrated that the *nalB* gene encodes a negative regulator of MexAB-OprM (63), a polyspecific efflux system which contributes to the natural resistance of *P. aeruginosa* toward a wide range of antibiotics including β -lactams, tetracyclines, trimethoprim, fluoroquinolones, and novobiocin (36, 40). In parallel, another efflux pump, MexXY, which is encoded by a distinct operon (*mexXY*) on the bacterial chromosome, was found to provide CF isolates with moderate resistance to amino-

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Bactériologie, EA 3186, UFR Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 19 rue Ambroise Paré, 25041 Besançon Cedex, France. Phone: (33) 3 63 08 22 06. Fax: (33) 3 63 08 22 32. E-mail: patrick.plesiat@univ-fcomte.fr.

[▽] Published ahead of print on 2 March 2009.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids^a

Strain or plasmid	Phenotype or genotype	Reference or source
Strains		
<i>P. aeruginosa</i>		
PAO1	Wild-type reference strain	82
MutGR1	<i>mexXY</i> overexpressing mutant of PAO1	83
FE60	Δ <i>mexXY</i> mutant of PAO1	12
PT629	<i>mexAB-oprM</i> overexpressing mutant of PAO1	11
FB1	<i>mexB::FRT</i> mutant of PAO1	This study
K1119	Δ <i>mexAB-oprM</i> mutant of PAO1	39
<i>P. putida</i> KT2440	Plasmid-free derivative of strain mt-2; <i>hsdR1</i> ($r^- m^+$)	2
<i>E. coli</i>		
S17.1	<i>recA thi pro hsdR⁻M⁺</i> RP4-2-Tc::Mu Km::Tn7 Tp ^r Sm ^r	72
DH5 α	F ⁻ <i>supE44 endA1 hsdR17</i> ($r_K^- m_K^+$) <i>thi-1 recA1</i> Δ (<i>argF-lacZYA</i>) <i>U169</i> ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 <i>phoA gyrA96 relA1 deoR</i> λ^-	Invitrogen
Plasmids		
pAK1900	Broad-host-range expression vector; Amp ^r Tic ^r	62
pRK2013	Broad-host-range helper plasmid; Tc ^r	35
pRSP17	<i>mexAB-oprM</i> operon cloned into broad-host-range vector pRK415; Tc ^r	79
pAZ17	<i>mexZ</i> gene cloned into pAK1900; Amp ^r Tic ^r	83
pAGH97	<i>mexXY</i> operon cloned into pAK1900; Amp ^r Tic ^r	65
pAGH29	pAGH97 encoding an F29S substitution in MexY; Amp ^r Tic ^r	This study
pAGH1018	pAGH97 encoding an F1018L substitution in MexY; Amp ^r Tic ^r	This study
pEX100Tlink	Gene replacement vector with multiple-cloning site from pUC18; <i>oriT⁺ sacB⁺</i> Amp ^r	64
pPS858	Source of FRT gene sequences, green fluorescent protein gene, and Gen ^r cassette; Amp ^r	24
pFLP2	Source of Flp recombinase; Amp ^r	24
pEXB	1-kb PCR fragment of the <i>mexB</i> gene cloned into pEX100Tlink; Amp ^r	This study
pEXBR	FRT cassette from pPS858 inserted into pEXB; Amp ^r	This study
pUC18	Multipurpose cloning vector; Amp ^r	85
pUCAY	1.1-kb internal fragment of <i>mexY</i> cloned into pUC18; Amp ^r	This study

^a Abbreviations: Tp^r, trimethoprim resistance; Sm^r, streptomycin resistance; Amp^r, ampicillin resistance; Tic^r, ticarcillin resistance; Tc^r, tetracycline; Gen^r, gentamicin resistance.

glycosides, fluoroquinolones, and the zwitterionic cephalosporin cefepime when stably overproduced upon various mutations (31, 50, 83, 84).

The present study revisits the prevalence of Tic^{hs} subpopulations of *P. aeruginosa* in a cohort of 46 CF patients. Analysis of 11 representative Tic^{hs} strains shows the divergent roles played by the efflux systems MexAB-OprM and MexXY in the adaptation of *P. aeruginosa* to the specific environment of CF lungs.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria, growth conditions, and drug susceptibility tests. The laboratory strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Strains 72.1 and 100.1 were isolated during a French national survey of *P. aeruginosa*-associated bloodstream infections and were found to be genotypically different (25). An environmental strain, *P. aeruginosa* E1, was isolated from surface waters in the east of France. The 189 CF strains of *P. aeruginosa* cited in the text were obtained from 19 children and 27 adult CF patients monitored at the Besançon teaching hospital in France between 1998 and 2007. These nonredundant isolates were selected from standard sputum cultures on the basis of both patient and resistance profiles. We considered all the strains from the same individual patient that differed by at least one major difference (from the category "susceptible" to the category "resistant") in their profiles of susceptibility to a panel of 16 antibiotics according to the breakpoints defined by the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (<http://www.sfm.asso.fr/>) to be nonredundant. Routine susceptibility testings with the disk diffusion method were performed on Mueller-Hinton agar (MHA) plates (Bio-Rad) as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (8). Strains 615R, 3020R, 2715, 2716, 2721, 2729, 2804, 2858, 2933, 2998, and 3066 were selected for further analysis because of their hypersusceptibility to ticarcillin (MIC ≤ 2 μ g/ml). All

these isolates exhibited very different random amplified polymorphic DNA banding patterns (data not shown) (46). Random amplified polymorphic DNA banding pattern analysis showed that 615R was clonally related to an aminoglycoside-susceptible isolate, 615S, occurring in a same sputum sample (83). Similarly, 3020R was found in mixed populations with a genotypically identical counterpart, 3020S, exhibiting wild-type susceptibility to antibiotics. Lipopolysaccharide O serotyping was performed by slide agglutination with fresh colonies and specific antisera supplied by Bio-Rad. The strains were routinely cultured at 37°C in Mueller-Hinton broth (MHB; Bio-Rad) or on MHA plates. Where necessary and unless otherwise stated, the media were rendered selective by the addition of 50 μ g/ml ampicillin for *Escherichia coli* and 150 μ g/ml ticarcillin or 200 μ g/ml gentamicin for *P. aeruginosa*. Electrotransformation of competent cells with plasmid DNA was performed as reported elsewhere previously (74). The MICs of selected antibiotics were determined by the conventional serial twofold macrodilution method in MHA with adjusted concentrations of Mg²⁺ and Ca²⁺ (BBL, Cockeysville, MD), by using a Steers replicator and inocula of ca. 10⁴ CFU per spot (7). Inoculated plates were incubated for 18 h at 37°C $\pm$ 1°C before bacterial growth was assessed visually.

Complementation experiments. The complementation of MexAB-OprM deficient strains 2804, 2933, and K1119 with broad-host-range plasmid pRSP17(Tc^r), which carries the wild-type *mexAB-oprM* operon from PAO1 (79), was carried out by triparental mating essentially as indicated previously by Srikumar et al. (80). In short, cultures of donor strain *E. coli* S17-1(pRSP17), of helper strain *E. coli* HB101(pRK2013), and of a recipient *P. aeruginosa* strain grown overnight were mixed together (50 μ l:50 μ l:100 μ l, respectively); pelleted in a microcentrifuge for 20 s; and resuspended in 25 μ l of MHB. The bacterial mixture was spotted onto the surface of an MHA plate and left during 4 h at 37°C before dispersion in 1 ml MHB. MHA plates containing 200 μ g/ml cetrimide (to counterselect the *E. coli* strains) and tetracycline at twofold the MIC (to select for the *P. aeruginosa* transconjugants) were inoculated with 100- μ l fractions of the suspension and incubated for 48 to 72 h at 37°C. The presence of plasmid pRSP17 in selected colonies was checked by agarose gel electrophoresis after small-scale

TABLE 2. Primers used in the study

Function and primer	Nucleotide sequence (5'–3')	Reference or source
Gene expression		
mexB1	ATC CGC CAG ACC ATC GCC A	27
mexB2	CAT CAC CAG GAA CAC GAG GAG G	27
mexC3	GTA CCG GCG TCA TGC AGG GTT C	11
mexC4	TTA CTG TTG CGG CGC AGG TGA CT	11
mexE4	CCA GGA CCA GCA CGA ACT TCT TGC	11
mexE5	CGA CAA CGC CAA GGG CGA GTT CAC C	11
mexG1	GCA ACT GGC TCT GGC TGA CC	27
mexG2	ACG GCG GTG GCG ATG TTG AA	27
mexJ1	GCC CTG TCC CTG TTT TCC TCC C	27
mexJ2	CCT TCT TTA CCC GCT CGC CG	27
mexV1	CGT CAG CAG ATC GCC CTT TTC AGC	42
mexV2	CGC TTT TCG AGA TGG CCT TGC TGC	42
mexY1a	TTA CCT CCT CCA GCG GC	33
mexY1b	GTG AGG CGG GCG TTG TG	33
uvrD1	CAC GCC TCG CCC TAC AGC A	34
uvrD2	GGA TCT GGA AGT TCT GCT CAG C	34
Gene inactivation^a		
mexBrec1	CTC <u>GGA TCC</u> GTC GGT GAC TTC CAG GTG TT (BamHI)	This study
mexBrec2	CTC <u>AAG CTT</u> GAA AGG AAC ATC CGG TTG AA (HindIII)	This study
mexYb1	CTC <u>GGA TCC</u> GGT CTA CAC CCT GGT CAT CG (BamHI)	This study
mexYb2	CTC <u>AAG CTT</u> GGC CGA CCT TGA AGT AGA TG (HindIII)	This study
Mutagenesis experiments^b		
F29S sup	GCG ATC CGC TCC CTG CCG GTC	This study
F29S down	GAC CGG CAG GGA GCG GAT CGC	This study
F1018 up	CTG GTA CCG CTG CTC TTC CTG GTG GTC	This study
F1018 down	GAC CAC CAG GAA GAG CAG CGG TAC CAG	This study

^a The restriction sites introduced into primers are underlined in the sequences, with the corresponding endonucleases indicated in parentheses.

^b The nucleotide substitutions introduced into primers are indicated in boldface type in the sequences.

extraction. The susceptibility of transconjugants to ticarcillin and aztreonam, two specific substrates of the MexAB-OprM pump (49), was subsequently assayed in MHB without IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) since *mexAB-oprM* is constitutively expressed from the *Plac* promoter in pRSP17 (79).

Molecular biology methods. Standard protocols were used for DNA restriction, fragment ligation, plasmid transformation, and agarose gel electrophoresis (1). Plasmids were extracted and purified with the Qiagen (Hilden, Germany) Midi kit. Chromosomal DNA was prepared with the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega, Madison, WI). PCR amplifications were carried out in a 50- μ l final volume with 0.5 U of BioTaq Red (Bioline, Paris, France). The reactions were performed using a DNA thermal cycler (Biometra, Göttingen, Germany) for 35 cycles, each consisting of 30 s at 94°C, 30 s at 60°C, and 1 min at 72°C. DNA amplicons were sequenced on both strands in a 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) with the BigDye Terminator v3 cycle sequencing kit (Applied Biosystems). Data were subsequently edited with SeqScape software v2.5 (Applied Biosystems).

QRDR sequencing. The search for mutations in the quinolone resistance-determining regions (QRDRs) encoded by the genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* was carried out in strains 2716, 2804, and 3066, as described previously (26). Isolates 2716 and 3066 exhibited wild-type QRDRs, while 2804 showed the canonical T83I substitution in *GyrA* that is known to confer fluoroquinolone resistance (56).

Quantitative real-time PCR. The expression levels of the operons *mexAB-oprM*, *mexCD-oprJ*, *mexEF-oprN*, *mexGHI-opmD*, *mexJK*, *mexVW*, and *mexXY* were assessed by reverse transcription real-time PCR (RT-PCR) with the fluorescent dye Sybr green (Qiagen Sciences, MD) in a RotorGene RG3000 apparatus (Corbett Research, Sydney, Australia), as described previously by Dumas et al. (11). The primers used for the amplification of the *mexB* (primers mexB1 and mexB2), *mexC* (mexC3 and mexC4), *mexE* (mexE4 and mexE5), *mexG* (mexG1 and mexG2), *mexJ* (mexJ1 and mexJ2), *mexV* (mexV1 and mexV2), and *mexY* (mexY1a and mexY1b) genes are listed in Table 2. The gene transcription levels were normalized in each strain to that of the housekeeping gene *uvrD* (34) and expressed as ratios to the values of strain PAO1 (by definition set at 1). The RT-PCR data presented here are means of four determinations from two independent experiments. Well-characterized mutants overexpressing MexAB-OprM

(PT629) (38), MexCD-OprJ (EryR) (52), MexEF-OprN (PAO7H) (37), MexJK (PAO318) (6), and MexXY (MutGR1) (83) were used as positive controls. None of the CF isolates exhibited mRNA levels of the *mexC* and *mexE* genes greater than 5% of those of EryR and PAO7H, respectively. The transcript levels of the *mexG* and *mexV* genes in the CF strains were found to be identical or rather close to those of wild-type strain PAO1 (from 1- to 3.8-fold and from 0.4- to 1.7-fold, respectively).

Immunodetection of MexB, MexY, and OprM. Bacterial membranes (whole-membrane fractions for MexB and MexY and outer membrane fractions for OprM) were isolated, subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and analyzed by Western blotting with MexB-, MexY-, and OprM-specific polyclonal antisera (diluted 1:1,000, 1:20,000, and 1:5,000, respectively), as reported previously (28).

Gene inactivation experiments. The *sacB*-based strategy described previously by Hoang et al. (24) was used here to inactivate the *mexB* gene. Briefly, a ca. 1-kb BamHI-HindIII PCR fragment carrying *mexB* from strain PAO1 (primers mexBrec1 and mexBrec2) (Table 2) was cloned into BamHI-HindIII-restricted vector pEX100Tlink(*sacB*⁺), yielding pEXB. This plasmid was cleaved inside the insert with endonuclease SphI, and the resultant fragment was blunt ended with Klenow enzyme. The 1.7-kb SmaI fragment, which contains the gentamicin cassette, the green fluorescent protein gene, and the Flp recognition target (FRT) gene sequences from plasmid pPS858 (24), was then ligated into linearized pEXB. This recombinant plasmid, named pEXBR, was conjugally transferred from *E. coli* S17.1 to the *P. aeruginosa* strains. Recombinant clones were selected on M9 minimal medium (1) supplemented with gentamicin, and mero-diploids were subsequently resolved by culture on MHA medium containing 5% (wt/vol) sucrose and gentamicin. Flippase-promoted excision of the chromosomally integrated FRT cassette (gentamicin resistance and green fluorescent protein markers) was finally achieved by the transfer of plasmid pLFP2, as described previously (12). The disruption of *mexB* by the FRT sequences was verified by PCR and DNA sequencing experiments.

For unknown reasons, the above-described *sacB*-based strategy with plasmid pEX Δ XYR (12) failed to inactivate the *mexXY* operon in the CF strains. A suicide plasmid derived from multicopy vector pUC18(Tic^r) was thus constructed in *E. coli* DH5 α cells by cloning a ca. 1.1-kb BamHI-HindIII PCR fragment

internal to the *mexY* gene (primers *mexYb1* and *mexYb2*) (Table 2). Transformants of CF isolates 3020S, 3020R, and 2804 with crossover recombination of the resultant plasmid pUCΔY with the chromosomally located *mexY* gene were obtained on MHA medium supplemented with ticarcillin. PCR experiments confirmed the disruption of *mexY* by pUCΔY in these bacteria.

Mutagenesis experiments. Site-directed mutagenesis of the *mexY* gene was performed with the QuikChange II site-directed mutagenesis kit (Stratagene). Plasmid pAGH97, which carries the *mexXY* operon from strain PAO1 (65), was used as the target DNA. The oligonucleotide primers, each complementary to opposite strands of pAGH97 and harboring the desired nucleotide substitution (Table 2), were extended during temperature cycling by *Pfu* Turbo polymerase (Stratagene). Two pairs of primers, designated F29S-up/F29S-down and F1018L-up/F1018L-down (Table 2), were used to introduce the amino acid substitutions F29S and F1018L, respectively, in plasmid-encoded MexY in vitro. DNA sequence analysis confirmed that the proper nucleotide changes had been successfully engineered in the resultant plasmids pAGH29 and pAGH1018, respectively. Transformants of a Δ*mexXY* mutant from PAO1, named FE60, and of *Pseudomonas putida* reference strain KT2440 were obtained by electrotransformation and subsequent selection on MHA with ticarcillin. We used the same strategy to generate additional mutations in pAGH1018, leading to K329Q and W358R substitutions in the MexX protein and T543A substitution in the MexY protein (data not shown).

β-Lactamase activities. Enzymatic activities were measured on crude French press lysates by a spectrophotometric assay using nitrocefin as a chromogenic substrate (26). Briefly, CF strains were cultured to mid-log phase both in 200 ml MHB (uninduced culture) and in 200 ml MHB (induced culture) supplemented with 50 μg/ml cefoxitin, a β-lactam antibiotic that is able to strongly induce the expression of chromosomally encoded AmpC β-lactamase in *P. aeruginosa* cells. Spectrophotometric measurements were performed on each bacterial lysate in triplicates.

RESULTS

Prevalence of ticarcillin-hypersusceptible strains among CF patients. Forty-six CF patients with *P. aeruginosa*-positive sputum samples (19 children and 27 adults) were monitored on a regular basis between 1998 and 2007 at the teaching hospital of Besançon, France. Analysis of the drug resistance patterns of 189 nonredundant (as defined in Materials and Methods) isolates sequentially collected from these patients during the survey showed that 25 of 46 patients (54.3%) were colonized with *P. aeruginosa* strains that were hypersusceptible to ticarcillin (at least fourfold more susceptible than wild-type strains such as PAO1) (MIC ≤ 4 μg/ml) (Fig. 1). Interestingly, many of the strains displaying this particular phenotype, named Tic^{hs}, appeared to exhibit various degrees of resistance to aminoglycosides (gentamicin, amikacin, tobramycin, and netilmicin) (data not shown). For instance, 32 of 53 (60.4%) of the Tic^{hs} isolates were at least fourfold more resistant to tobramycin than was PAO1 (i.e., MIC ≥ 2 μg/ml). However, these rates were not very different from those of the isolates with ticarcillin MICs of ≥8 μg/ml (98/136 isolates; 72%), supporting the notion that the Tic^{hs} phenotype and aminoglycoside resistance result from independent mechanisms. In order to further characterize the Tic^{hs} subpopulation, we selected 11 genotypically distinct Tic^{hs} strains showing various levels of resistance to aminoglycosides from different patients. In four patients, the Tic^{hs} strains constituted the only *P. aeruginosa* population detected in the sputum samples over the course of the survey. In the other seven patients, the Tic^{hs} isolates were found in mixed populations with one (*n* = 3), two (*n* = 1), or more (*n* = 3) strains for which ticarcillin MICs were ≥8 μg/ml. In one case, a Tic^{hs} isolate with moderate resistance to aminoglycosides (615R) was present in a mixed culture with a genotypically identical counterpart (615S) showing wild-type susceptibility to these anti-

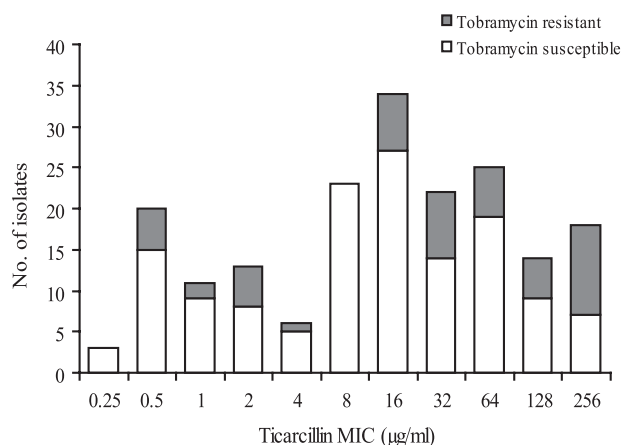


FIG. 1. Susceptibilities of selected CF isolates to ticarcillin and tobramycin. One hundred eighty-nine isolates recovered from 46 patients were tested for drug susceptibility with the standard agar dilution method. White and gray bars represent isolates that are susceptible (MIC ≤ 4 μg/ml) and resistant (MIC ≥ 8 μg/ml) to tobramycin according to CLSI breakpoints, respectively.

biotics. Finally, in another patient, the Tic^{hs} isolate (3020R) was cocultured with a clonally related parent exhibiting wild-type susceptibility to both ticarcillin and aminoglycosides (3020S). As expected from long-term colonizing strains (23), only 2 of 11 of the selected isolates were serotypeable (O:3 and O:11 for 2716 and 2729, respectively), while 3 of 11 isolates produced mucoid colonies (2715, 2858, and 2933). These data confirmed that the Tic^{hs} phenotype is not necessarily associated with a loss of O-type lipopolysaccharides or mucoidity.

Role of the MexXY-OprM pump in aminoglycoside resistance. As indicated in Table 3, the selected Tic^{hs} strains exhibited various levels of resistance to antipseudomonal aminoglycosides such as gentamicin (2- to 64-fold), amikacin (4- to 64-fold), and tobramycin (2- to 128-fold) as well as to enzyme-recalcitrant test compounds like fortimicin (2- to >16-fold) (data not shown) and apramycin (2- to 64-fold) (data not shown) (71). These results were fully consistent with previously published data showing the absence of horizontally acquired aminoglycoside-modifying enzymes in most CF isolates of *P. aeruginosa* (29, 45, 70, 83). As the efflux system MexXY-OprM is known to play a major role in emergence of aminoglycoside resistance in CF strains (31, 83, 84), we assessed its expression at the gene (*mexY*) and the protein (MexY) levels by reverse transcription RT-PCR and Western blotting, respectively. As expected, all the Tic^{hs} strains were found to overexpress both the *mexY* gene (11.4- to 58.8-fold) (data not shown) and the MexY protein compared with aminoglycoside-susceptible strains PAO1, 615S, and 3020S (Fig. 2).

An upregulation of the *mexXY* operon may result from mutations occurring in the regulatory gene *mexZ*, which codes for a TetR-like repressor, or in as-yet-undetermined loci (31, 43, 77, 83, 84). Modulating previous conclusions that CF strains overexpress *mexXY* mostly as a result of mutations in the *mexZ* gene (31, 83), only 5 of 11 strains exhibited alterations (frame-shifts) in the coding sequence of *mexZ* (Table 4). The nucleotide sequences of *mexZ* and of the *mexZ-mexXY* intergenic region were identical to that of PAO1 in the other six strains.

TABLE 3. Drug susceptibilities of the *P. aeruginosa* strains

Strain	MIC (μg/ml) ^a								
	GEN ^b	AMK	TOB	TIC	ATM ^c	CAZ	FEP	CIP	NOV ^c
PAO1 and derivatives									
PAO1	1 (0.125)	2	0.5	32	4 (0.12)	1	2	0.25	512 (32)
MutGR1	2	8	1	32	4	1	8	0.5	512
FE60(pAK1900)	0.125	0.5	0.06	ND	ND	ND	2	0.25	ND
FE60(pAGH97)	1	4	0.5	ND	ND	ND	8	0.5	ND
FE60(pAGH29)	1	4	0.5	ND	ND	ND	8	0.5	ND
FE60(pAGH1018)	2	8	1	ND	ND	ND	16	1	ND
Clinical strains									
615S	1 (0.125)	2	0.25	1	0.12 (—) ^d	1	2	4	64 (—)
615R	8 (0.125)	16	2	2	0.25 (0.25)	1	4	1	4 (4)
3020S	2 (0.125)	2	0.5	16	2 (0.25)	1	2	0.25	512 (8)
3020R	16 (0.25)	32	4	2	0.25 (0.25)	1	4	0.5	16 (16)
2715	4 (0.125)	8	2	2	0.5 (0.25)	1	16	1	16 (8)
2716	2 (0.125)	8	1	2	0.25 (0.25)	1	8	2	32 (32)
2721	16 (0.125)	32	4	2	0.25 (0.12)	0.5	8	1	32 (32)
2729	8 (0.25)	16	2	0.5	0.25 (0.25)	1	8	1	32 (32)
2804	64 (0.5)	128	64	0.5	0.25 (—)	2	32	16	8 (—)
2858	4 (0.125)	8	1	2	0.25 (—)	4	4	0.5	64 (—)
2933	16 (—)	32	4	0.5	0.25 (0.12)	0.5	16	0.5	8 (4)
2998	8 (0.125)	16	4	0.5	0.12 (0.12)	0.5	8	1	32 (32)
3066	64 (0.125)	128	16	2	0.25 (0.25)	>8	32	16	32 (32)

^a Values in boldface type (or underlined) are at least fourfold higher (or fourfold lower) than those for wild-type strain PAO1. Abbreviations: GEN, gentamicin; AMK, amikacin; TOB, tobramycin; TIC, ticarcillin; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; CIP, ciprofloxacin; NOV, novobiocin; ND, not determined.

^b Values in parentheses indicate MICs after the *mexXY* operon has been repressed in *trans* by plasmid pAZ17 (in isolates 3020S and 3020R, the inactivation of *mexXY* was achieved by the chromosomal integration of plasmid pUCΔY). Preliminary experiments showed that the addition of 50 μg/ml ticarcillin to selectively maintain pAZ17 in cultures did not influence MICs.

^c Values in parentheses indicate MICs after the *mexB* gene has been inactivated by the FRT cassette from plasmid pEXBR.

^d —, the inactivation of *mexXY* or *mexB* was unsuccessful in these strains.

Variations in the amino acid sequence of the MexXY pump. While stable MexXY overproduction is usually associated with a modest two- to fourfold increase in aminoglycoside MICs in *in vitro* mutants such as MutGR1 (as seen here for CF strains 2715, 2716, and 2858) (Table 3), most of the selected Tic^{hs} isolates displayed much stronger resistance to these antibiotics (for example, 2804 and 3066 fall into the “resistant” category according to CLSI breakpoints). To evaluate the contribution of the upregulated MexXY proteins to aminoglycoside resistance, we turned off the expression of the *mexXY* operon in the Tic^{hs} strains by *trans*-complementation with a plasmid-encoded repressor, MexZ (construct pAZ17). The transformation of the strains with pAZ17 was successful in all the strains but 3020R and 2933. Subsequent RT-PCR experiments provided evidence that the *mexY* gene was strongly repressed following

pAZ17 transfer (data not shown). As expected, the MexZ-dependent repression of *mexXY* resulted in a decrease in aminoglycoside MICs in the pAZ17-transformed strains (Table 3). The residual resistance that was supposed to result from MexXY-independent mechanisms was actually very low and comparable between the CF isolates and PAO1(pAZ17) (gentamicin MICs from 0.125 to 0.5 μg/ml versus 0.125 μg/ml, respectively), thus suggesting a major role of the efflux process in the high level of aminoglycoside resistance exhibited by some strains (2721, 2804, and 3066). Of note, pAZ17-dependent repression of *mexXY* also strongly reduced the MIC of ciprofloxacin (from 16 to 0.5 μg/ml) in 3066, a strain showing wild-type QRDRs in the DNA gyrase and topoisomerase IV enzymes. The transfer of pAZ17 had similar effects on ciprofloxacin resistance (from 16 to 1 μg/ml) in 2804, which contains

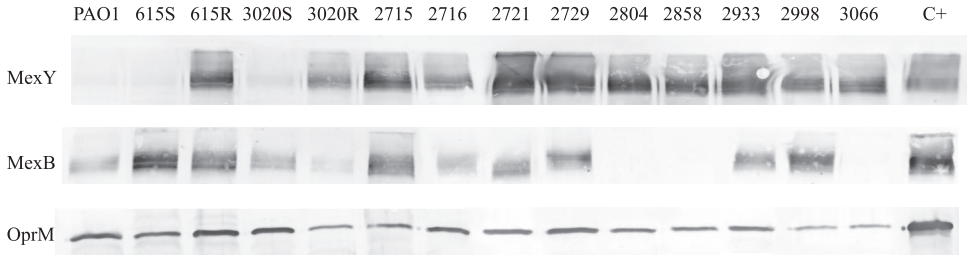


FIG. 2. Expression of efflux pumps in CF isolates. The production of the MexY, MexB, and OprM proteins was assessed by Western blotting with specific antibodies after extraction of cell membranes and SDS-PAGE. Mutants MutGR1 and PT629 were used as positive controls (C+) for the overexpression of MexXY and MexAB-OprM efflux systems, respectively. Twenty micrograms of whole (outer and inner) membranes was subjected to SDS-PAGE for detection of MexY and MexB. Ten micrograms of outer membrane protein was used per lane for immunodetection of OprM.

TABLE 4. Mutations and amino acid changes in CF strains

Strain	Alteration(s) ^a				
	<i>mexZ</i>	MexX	MexY	<i>mexA</i>	<i>mexB</i>
Control strains					
E1	— ^b	— ^{c,d,e,f}	— ^{g,h,i,j}	ND	ND
72.1	+6 nt at position 166	— ^b	— ^h	ND	ND
100.1	— ^b	— ^{d,e,f}	— ^{g,h,i}	ND	ND
CF strains					
615S	— ^b	— ^{d,e,f}	— ^h	— ^b	— ^b
615R	Δ386 nt (from A248 to A633)	— ^{d,e,f}	A254G, Q282R ^h	— ^b	— ^b
3020S	— ^b	— ^{d,e,f}	— ^h	— ^b	— ^b
3020R	— ^b	— ^{d,e,f}	— ^h	— ^b	— ^b
2715	— ^b	— ^{d,e,f}	— ^h	— ^b	— ^b
2716	— ^b	R351S ^{d,f}	E152D ^h	— ^b	— ^b
2721	— ^b	L22M, D135Y ^{d,e,f}	S46G, Q282R, A596V, K692M ^k	— ^b	— ^b
2729	Δ15 nt (from C595 to C609)	— ^{d,e,f}	I536P ^h	— ^b	— ^b
2804	Δ81 nt (from C217 to C297) IS <i>Pa1635</i>	— ^{d,f}	F1018L ^h	— ^b	Δ1 nt at position 2147
2858	— ^b	— ^{c,d,e,f}	G1002A ^{h,j}	— ^b	— ^b
2933	— ^b	— ^{c,d,e,f}	— ^h	Δ1 nt at position 870	— ^b
2998	+1 nt at position 27	— ^{d,e,f}	— ^h	— ^b	— ^b
3066	Δ25 nt (from C217 to G241)	— ^{d,e,f}	F29S	— ^b	G2364A (nonsense)

^a Nucleotide or amino acid positions refer to strain PAO1. Abbreviations: nt, nucleotide; ND, not determined.

^b Sequence identical to that of PAO1.

^c Contains amino acid substitution A30T of PA14.

^d Contains amino acid substitution K329Q of PA14.

^e Contains amino acid substitution L331V of PA14.

^f Contains amino acid substitution W358R of PA14.

^g Contains amino acid substitution I536V of PA14.

^h Contains amino acid substitution T543A of PA14.

ⁱ Contains amino acid substitution G589A of PA14.

^j Contains amino acid substitution Q840E of PA14.

^k Contains amino acid substitution N1036T of PA14.

a T83I substitution in the QRDR of GyrA. However, one could argue that pAZ17-encoded MexZ may well sensitize *P. aeruginosa* to antibiotics by mechanisms other than repressing *mexXY*. To address this issue, we carried out the inactivation of the *mexY* gene in several isolates (PAO1, 3020S, 3020R, and 2804) by homologous recombination with suicide plasmid pUCΔY. As with the pAZ17 strategy, the disruption of *mexY* rendered 3020R (MIC equal to 0.25 μg/ml) and 2804 (0.5 μg/ml) almost as susceptible to gentamicin as 3020S::pUCΔY (0.125 μg/ml) and PAO1::pUCΔY (0.125 μg/ml), thereby confirming the absence of mechanisms other than drug efflux providing significant resistance to aminoglycosides (more than fourfold) in the Tic^{hs} strains. Residual resistance to ciprofloxacin in 2804 following the inactivation of *mexY* (1 μg/ml) was identical to that provided by pAZ17.

Since our RT-PCR and immunoblotting experiments did not show evident differences in levels of MexXY expression among the clinical strains, we wondered whether specific amino acid substitutions in these proteins would account for the variations in aminoglycoside MICs. We thus sequenced the *mexXY* operon in all the 11 CF strains as well as in the two susceptible strains 615S and 3020S (Table 4). We next aligned these sequences with those of reference strains PAO1 and PA14 (available at <http://v2.pseudomonas.com/>), those of two bacteremic, non-CF isolates (72.1 and 100.1) (25), and that of one environmental strain, named E1. Interestingly, all the CF strains appeared to contain the same amino acid substitutions in the predicted proteins MexX (A30T, K329Q, L331V, and/or

W358R) and MexY (T543A, Q840E, and/or N1036T) compared with PAO1 (Table 4). However, since these variations were present in susceptible strains PA14, 100.1, and E1, they were considered to be nonsignificant with respect to aminoglycoside resistance. On the other hand, a number of strain-specific changes in MexXY could be identified in bacteria exhibiting low to moderate resistance to gentamicin such as 615R (MIC of 8 μg/ml), 2716 (2 μg/ml), 2721 (16 μg/ml), 2729 (8 μg/ml), and 2858 (4 μg/ml). While it remains unclear whether these amino acid changes in the MexXY translocase actually improve the efflux of aminoglycosides and resistance, this finding demonstrates that the MexXY proteins may be subject to evolution in CF strains (compare 615S and 615R in Table 4).

To gain an insight into the adaptation of the pump to the CF lung environment, we focused our attention on strains 2804 and 3066, which combine a strong resistance to aminoglycosides (gentamicin MIC of 64 μg/ml) with a single-amino-acid substitution in MexY (F1018L and F29S, respectively). These strain-specific mutations were engineered by directed mutagenesis into the *mexXY* operon from PAO1 previously cloned in a proper orientation downstream of the *lac* promoter on broad-host-range vector pAK1900 (yielding construct pAGH97) (65). The resultant constructs, named pAGH1018 (encoding an F1018L change) and pAGH29 (encoding an F29S change), and their parent plasmid, pAGH97, were transferred by electroporation into a Δ*mexXY* mutant, FE60, derived from PAO1. Control RT-PCR experiments confirmed that the three trans-

formants of FE60 expressed similar mRNA levels of the *mexY* gene (56.6 ± 6 times that of PAO1). As indicated in Table 3, FE60(pAGH1018) turned out to be consistently more resistant (twofold) than FE60(pAGH97) or FE60(pAGH29) to all of the MexXY substrates including aminoglycosides, cefepime, and ciprofloxacin. To confirm these results, we introduced pAGH97 and pAGH1018 into *P. putida* reference strain KT2440 (2) and measured the levels of resistance of the resultant transformants to gentamicin and cefepime. Again, pAGH1018 provided levels of resistance to both agents that were twofold greater than that provided by pAGH97 (4 versus 2 $\mu\text{g/ml}$ and 4 versus 2 $\mu\text{g/ml}$, respectively). These data provide clear evidence that specific mutations may improve the drug transport activity of the MexXY translocase. However, since the resistance levels of FE60(pAGH1018) were much lower than those of 2804, we wondered whether the additional substitutions detected in the MexX (K329Q and W358R) and MexY (T543A) proteins from 2804 might cooperatively improve the efflux activity provided by the F1018L mutation (as pAGH1018 carries the *mexXY* operon from strain PAO1). The K329Q, W358R (MexX), and T543A (MexY) changes were thus engineered into pAGH1018 in addition to F1018L. The resultant plasmid was found to confer the same levels of resistance to mutant FE60 as pAGH1018, ruling out a cooperative effect of the four amino acid residues in pump functioning (data not shown).

Role of the MexAB-OprM pump in the Tic^{hs} phenotype. As indicated in Table 3, the hypersusceptibility of the 11 selected strains to ticarcillin (16- to 64-fold more than reference strain PAO1) also extended to other antipseudomonal β -lactams such as aztreonam (8- to 32-fold) and piperacillin (four- to eightfold) (data not shown) but was not correlated with lower resistance to ceftazidime or cefepime. Since the MexAB-OprM efflux system strongly contributes to the natural resistance of *P. aeruginosa* to ticarcillin, carbenicillin, aztreonam, and piperacillin but has a poor impact on intrinsic resistance to ceftazidime (40, 58), we hypothesized that the selected Tic^{hs} strains might have impaired MexAB-OprM pumps. Supporting this notion, all the strains proved to be highly susceptible to novobiocin, a hydrophobic antibiotic known to be specifically extruded by the pump (41, 47) (Table 3). Furthermore, a disruption of the *mexB* gene in these bacteria (except 615S, 2804, and 2858, for which the inactivation experiments with plasmid pEXBR were unsuccessful) did not result in a more-than-twofold reduction in MICs of ticarcillin (data not shown), aztreonam, and novobiocin (Table 3). In comparison, *mexB* null mutant FB1 was 64-, 32-, and 16-fold more susceptible than its parent, PAO1, to these agents, respectively (data not shown). It should be mentioned here that cefepime MICs may be influenced by the expression of other efflux systems such as MexCD-OprJ and MexXY-OprM independently of MexAB-OprM (49).

Because the activity of MexAB-OprM is thought to be impaired when the MexCD-OprJ (20, 32) or MexEF-OprN (47) pump is upregulated, we measured the transcript levels of the *mexC* and *mexE* genes (as representatives of the *mexCD-oprJ* and *mexEF-oprN* operons, respectively) by reverse transcription RT-PCR. However, none of the 11 CF strains significantly overexpressed these operons compared to wild-type strain PAO1 (data not shown). Similar negative results were obtained

when the transcript levels of the *mexGHI-opmD*, *mexJK*, and *mexVW* operons, which code for other efflux systems operating with resistance-nodulation-cell division (RND) transporters (data not shown), were assessed.

More interestingly, immunoblotting analysis of bacterial membranes revealed the presence of smaller amounts of the MexB and OprM proteins in strain 3020R compared with its wild-type counterpart, 3020S, and the lack of visible MexB bands in strains 2804, 2858, and 3066 (Fig. 2). Surprisingly, the latter bacteria were able to express the OprM protein, the exit duct which, together with MexAB, enables the extrusion of substrates to the external milieu. The other 7 of 11 Tic^{hs} strains (namely, 615R, 2715, 2716, 2721, 2729, 2933, and 2998) were found to produce significant amounts of both MexB and OprM. Assessment of gene transcription by RT-PCR confirmed that *mexB* was underexpressed in 3020R (0.2-fold) and 2858 (0.3-fold) compared with PAO1 or 3020S (onefold) and was expressed at wild-type levels or higher (0.9- to 2.3-fold) in the other strains (data not shown). However, RT-PCR experiments also showed significant levels of *mexB* transcripts in MexB-deficient isolates 2804 and 3066 (0.9- and 3.1-fold that of PAO1, respectively), suggesting the presence of mutations disrupting *mexB* in these bacteria.

Nucleotide sequencing of (i) the repressor gene *mexR*, whose product downregulates the *mexAB-oprM* operon (63); (ii) the intergenic region between *mexR* and *mexA*, which carries the two promoters of *mexAB-oprM* (13, 68); (iii) the PA3721 gene (5), which negatively controls the expression of a protein (coded by PA3719) that is able to bind and inactivate MexR (9); and (iv) the PA3574 gene, which codes for a second repressor of *mexAB-oprM* (76), did not show significant mutations in strains 2858 and 3020R, compared with PAO1 and 3020S, that would explain their reduced levels of expression of MexB. In addition, no differences were observed between strains 2858, 3020S, 3020R, and PAO1 with respect to mRNA levels of the *mexR*, PA3719, and PA3574 genes (data not shown).

Alterations in the MexAB-OprM pump. Several studies have shown that amino acid substitutions in the transporter MexB at positions essential for proton translocation (22), proper compaction of transmembrane stretches (TMSs) (86), trimerization (53), or interactions with the periplasmic adaptor MexA (53, 60) may impair the transport activity of MexAB-OprM and thus increase the susceptibility of resultant mutants to the pump substrates. Similarly, mutations in the *mexA* gene may compromise the oligomerization of MexA or its binding to MexB and thus alter the functioning of the efflux system (59). To determine if such alterations could be responsible for the Tic^{hs} phenotype, we sequenced the *mexAB-oprM* operon in the 11 CF strains as well as in 615S and 3020S. This operon appeared strictly conserved and identical to that of reference strain PAO1 in all the isolates except in three strains (Table 4). Strains 2804 and 3066 exhibited mutations in *mexB* resulting in premature stop codons and truncated polypeptides of 719 and 787 amino acids, respectively, instead of 1,046 residues for the wild-type MexB protein. These polypeptides, which lacked 5 of 12 transmembrane segments (from TMS-8 to TMS-12) were not detected in whole-membrane extracts by Western blotting (Fig. 2), likely because of their inability to insert into the cytoplasmic membrane. As mentioned above, mRNAs of the

corresponding *mexB* genes were amplified by RT-PCR. Strain 2933 displayed a C870 deletion in the *mexA* gene, generating a truncated polypeptide of 311 amino acids lacking 72 residues at the C-terminal end of the MexA protein. Finally, nucleotide sequencing of the *oprM* genes demonstrated that all of the Tic^{hs} isolates produced a strictly conserved OprM protein that was 100% identical to that of PAO1.

To confirm the impact of mutations on pump activity in strains 2933, 2804, and 3066, we attempted to complement the bacteria with plasmid pRSP17, which carries the entire *mexAB-oprM* operon from PAO1 in the proper orientation downstream of the *Plac* promoter. The transfer of pRSP17 was successful with 2933, 2804, and a Δ *mexAB-oprM* derivative of PAO1 named K1119 but not with 3066. The overexpression of *mexAB-oprM* from pRSP17 dramatically increased the resistance to ticarcillin (from 0.5 to 64 μ g/ml) and aztreonam (from 0.25 to 16 to 32 μ g/ml) in 2933, 2804, and K1119, thus clearly indicating that in these strains, the MexAB-OprM function was lost mutationally.

Because the chromosomally encoded, large-spectrum AmpC β -lactamase contributes to the natural resistance of *P. aeruginosa* to many β -lactam antibiotics together with MexAB-OprM (48), we measured the β -lactamase activities expressed by the CF strains. Both their basal (from 9 to 51 nmol nitrocefin hydrolyzed min⁻¹ mg⁻¹ protein) and cefoxitin-induced (from 1,241- to 6,604 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein) enzymatic levels were comparable to those of reference strain PAO1 (33 and 3,900 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein, respectively). These results provide evidence that the Tic^{hs} phenotype was not associated with deficient production in AmpC β -lactamase, especially in those strains producing intact MexA, MexB, and OprM proteins.

DISCUSSION

This study shows that many CF patients are colonized and/or infected by populations of *P. aeruginosa* that are strongly deficient in MexAB-OprM-dependent efflux activity. Bacteria expressing the typical phenotype (Tic^{hs}) due to inactive MexAB-OprM are mostly recovered during chronic colonization but may also emerge rapidly at the stage of early colonization (e.g., strain 3020R). For instance, we observed that 17 of 27 adults (63%) versus 8 of 19 children (42%) harbored Tic^{hs} isolates. This bacterial adaptation to the CF lung is intriguing, as the loss of MexAB-OprM function results in *in vitro* hypersusceptibility to a number of antibiotics that are widely prescribed for the treatment of exacerbations of pulmonary infection, such as ticarcillin, aztreonam, piperacillin, and ciprofloxacin (66). It is interesting that the increasing use of "newer" β -lactam molecules (e.g., ceftazidime, cefepime, and meropenem) over the years has not reduced the prevalence of Tic^{hs} strains compared with data reported in the initial article by May and Ingold in the early 1970s (51). There is little doubt that the Tic^{hs} phenotype expressed *in vitro* by so many persistent *P. aeruginosa* isolates does not reflect the real susceptibility of bacteria in CF hosts. It has been well documented that some lung populations of *P. aeruginosa* adapt to the strong selective pressure exerted by repeated cures of β -lactams through the stable or transient upregulation of intrinsic AmpC β -lactamase (3, 17), decreased outer membrane permeability (4), or alterations in penicillin

binding proteins (19). Preexisting subpopulations with stable, partially derepressed AmpC may thus rapidly expand under treatment with agents such as ceftazidime, piperacillin, or imipenem (17). Partial release of their β -lactamase content in sputum samples could contribute to antibiotic inactivation *in situ* (18). Whether these partially derepressed mutants would provide more susceptible bacterial populations with efficient protection against β -lactams is unclear. AmpC-overproducing mutants were not detected in the sputum samples of 10 of 25 of our patients, suggesting that at least in these patients, the persistence of Tic^{hs} populations involves nonhydrolytic mechanisms. It is conceivable that hypersusceptible bacteria may survive in the CF lung if physically protected from antibiotics by mucus and/or biofilm-like materials (10). However, our observation that most of the Tic^{hs} isolates were resistant to aminoglycosides, a class of antibiotics known to diffuse poorly in exopolymer matrices (10), does not support this hypothesis (Table 3). In addition, strain 3066 turned out to be highly resistant to ceftazidime as a consequence of repeated courses of chemotherapy with this product. Because of the high prevalence of the Tic^{hs} populations, the loss of MexAB-OprM is likely to confer a decisive advantage to *P. aeruginosa* for its survival in the hostile environment of CF airways. Time-kill studies with ticarcillin in our laboratory failed to demonstrate a tolerance of the selected isolates to β -lactams under standard laboratory conditions (i.e., exponentially growing bacteria in rich medium) (data not shown). However, other conditions that more closely resemble those of the CF lung (microaerobiosis, biofilm mode of growth, and nutrient limitation) should be tested to determine which factors specifically contribute to the resistance of Tic^{hs} strains *in vivo* (78, 81).

Confirming the results of previous studies on CF strains (31, 83, 84), all the Tic^{hs} strains exhibiting some degree of resistance to aminoglycosides (at least twofold that of reference strain PAO1) (Table 3) proved to overproduce the MexXY proteins, which interact with OprM to form a functional tripartite efflux system (65). However, strain 615S provides evidence that the Tic^{hs} phenotype is not linked to MexXY upregulation (Tables 3 and 4). RT-PCR analysis of another strain, named 1710, exhibiting wild-type susceptibility to tobramycin (MIC of 0.25 μ g/ml) and hypersusceptibility to ticarcillin (MIC of 0.25 μ g/ml) (Fig. 1) confirmed this result (data not shown). More importantly, complementation experiments with plasmid pAZ17 (the *mexZ* gene) demonstrated for the first time that MexXY can be responsible for strong aminoglycoside resistance in CF strains (2804 and 3066). Although the factors that modulate MexXY-OprM functioning remain poorly understood (77, 83), we could establish that specific mutations in the transporter MexY are able to increase the efflux of aminoglycosides, cefepime, and fluoroquinolones [compare FE60(pAGH97) and FE60(pAGH1018) in Table 3]. The F1018L substitution of strain 2804 is located in TMS-12 of MexY, at the groove delimited by TMS-7, TMS-8, and TMS-9. Based on the crystal structure of the homolog transporter AcrB, this groove is supposed to be an efflux pathway for substrates from the cytosol or inner membrane (57). Additional site-directed mutagenesis studies have been carried out to elucidate how the F1018L mutation may facilitate the export of antibiotics predicted to be captured from the periplasm (87).

To our knowledge, this is the first example of the *in vivo*

emergence of resistant mutants overproducing a “modified” efflux pump. Interestingly, in this study, the two Tic^{hs} strains displaying the highest levels of resistance to aminoglycosides (2804 and 3066) both appeared to lack the MexB protein. It is tempting to assume that these strains form chimeric MexAB-OprM pumps that contribute to the resistance in addition to MexXY-OprM. Against this hypothesis, pull-down assays reported previously by Mokhonov et al. (54) did not evidence an interaction between MexA, MexY, and OprM. Alternatively, the loss of MexB might allow more recruitment of OprM by the tandem MexXY.

The suppression of MexAB-OprM drug transport activity was associated with mutations disrupting the *mexA* (2933) and *mexB* (2804 and 3066) genes in 3 of 11 of our strains. Consistent with our conclusions that pulmonary populations of *P. aeruginosa* tend to abolish MexAB-OprM efflux during long-term colonization, another study showed that isolates from 11 of 29 (38%) CF patients harbored nonsynonymous mutations in the *mexA* gene (75). Whereas 2 of 11 of our Tic^{hs} strains (3020R and 2858) were partially deficient in MexB production, 6 of 11 were unexpectedly found to express the wild-type pump at levels similar to those of PAO1. Reminiscent of this, recent data from our laboratory strongly suggest that, while normally produced, the MexAB-OprM system is functionally impaired in MexCD-OprJ-overproducing *nfxB* mutants (32). In the present study, none of the Tic^{hs} strains appeared to overexpress the *mexC* gene; nevertheless, it is clear that still unknown factors may strongly influence the drug transport activity of MexAB-OprM. Ongoing experiments are investigating the role of TonB1 in the emergence of the Tic^{hs} phenotype, since mutations in defined regions of this energy-coupling periplasmic protein may compromise the operation of the MexAB-OprM efflux pump without affecting iron acquisition (88).

In conclusion, our data demonstrate the existence in CF strains of an unbalance between the efflux system MexAB-OprM, which seems to be dispensable in the context of the CF lung environment, and MexXY-OprM, whose upregulation is necessary for *P. aeruginosa* to stand the strong selective pressure exerted by aminoglycosides. We believe that the MexXY-OprM pump should be the primary target for the development of efflux inhibitors in adjunctive therapy of CF pulmonary infection.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the French Cystic Fibrosis Association Vaincre la Mucoviscidose and the Conseil Régional de Franche Comté.

We are grateful to Christiane Bailly for collecting the *P. aeruginosa* CF isolates, Gérard Couetdic for recovery of clinical data, Thilo Köhler for providing strain PT629, Keith Poole for sharing strain K1119 and plasmid pRSP17, Fabrice Poncet for DNA sequencing, and Katy Jeannot for helpful assistance.

REFERENCES

- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 2000. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
- Bagdasarian, M., R. Lurz, B. Rückert, F. C. H. Franklin, M. M. Bagdasarian, J. Frey, and K. N. Timmis. 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors. II. Broad host range, high copy number, RSF1010-derived vectors and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* 16:237–247.
- Bagge, N., M. Hentzer, J. B. Andersen, O. Ciofu, M. Givskov, and N. Høiby. 2004. Dynamic and spatial distribution of β -lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1168–1174.
- Ballesterio, S., A. Fernández-Rodríguez, R. Villaverde, H. Escobar, J. C. Pérez-Díaz, and F. Baquero. 1996. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 38:39–45.
- Cao, L., R. Srikumar, and K. Poole. 2004. MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of the *nalC* gene encoding a repressor of PA3720-PA3719. *Mol. Microbiol.* 53:1423–1436.
- Chuanchuen, R., C. T. Narasaki, and H. P. Schweizer. 2002. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *J. Bacteriol.* 184:5036–5044.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, 7th ed. M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard, 9th ed., M2-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Daigle, D. M., L. Cao, S. Fraud, M. S. Wilke, A. Pacey, R. Klinoski, N. C. Strynadka, C. R. Dean, and K. Poole. 2007. Protein modulator of multidrug efflux gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 189:5441–5451.
- Drenkard, E. 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* 5:1213–1219.
- Dumas, J.-L., C. vanDelden, K. Perron, and T. Köhler. 2006. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 254:217–225.
- ElGarch, F., K. Jeannot, D. Hocquet, C. Llanes-Barakat, and P. Plésiat. 2007. Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:1016–1021.
- Evans, K., L. Adewoye, and K. Poole. 2001. MexR repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of MexR binding sites in the *mexA-mexR* intergenic region. *J. Bacteriol.* 183:807–812.
- Foweraker, J. E., C. R. Laughton, D. F. J. Brown, and D. Bilton. 2005. Phenotypic variability of *Pseudomonas aeruginosa* in sputa from patients with acute infective exacerbation of cystic fibrosis and its impact on the validity of antimicrobial susceptibility testing. *J. Antimicrob. Chemother.* 55:921–927.
- Fyfe, J. A., and J. R. Govan. 1984. Chromosomal loci associated with antibiotic hypersensitivity in pulmonary isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 130:825–834.
- Gaillard, J. L., P. Cahen, C. Delacourt, C. Silly, M. Le Bourgeois, C. Coustère, J. de Blic, G. Lenoir, and P. Scheinmann. 1995. Correlation between activity of beta-lactam agents in vitro and bacteriological outcome in acute pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14:291–296.
- Givercman, B., P. A. Lambert, V. T. Rosdahl, G. H. Shand, and N. Høiby. 1990. Rapid emergence of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients due to in-vivo selection of stable partially derepressed β -lactamase producing strains. *J. Antimicrob. Chemother.* 26:247–259.
- Givercman, B., C. Meyer, P. A. Lambert, C. Reinert, and N. Høiby. 1992. High-level β -lactamase activity in sputum samples from cystic fibrosis patients during antipseudomonal treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:71–76.
- Godfrey, A. J., L. E. Bryan, and H. R. Rabin. 1981. β -Lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with modified penicillin-binding proteins emerging during cystic fibrosis treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 19:705–711.
- Gotoh, N., H. Tsujimoto, M. Tsuda, K. Okamoto, A. Nomura, T. Wada, M. Nakahashi, and T. Nishino. 1998. Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in delta *mexA-mexB-oprM* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:1938–1943.
- Govan, J. W. R. 2006. Multidrug-resistant pulmonary infection in cystic fibrosis—what does “resistant” mean? *J. Med. Microbiol.* 55:1615–1617.
- Guan, L., and T. Nakae. 2001. Identification of essential charged residues in transmembrane segments of the multidrug transporter MexB of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 183:1734–1739.
- Hancock, R. E. W., L. M. Mutharia, L. Chan, R. P. Darveau, D. P. Speert, and G. B. Pier. 1983. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypeable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect. Immun.* 42:170–177.
- Hoang, T. T., R. R. Karkhoff-Schweizer, A. J. Kutchma, and H. P. Schweizer. 1998. A broad-host-range F1p-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *Gene* 212:77–86.
- Hocquet, D., P. Berthelot, M. Roussel-Delvalle, R. Favre, K. Jeannot, O. Bajolet, N. Marty, F. Grattard, P. Mariani-Kurkdjian, E. Bingen, M.-O. Husson, G. Couedic, and P. Plésiat. 2007. *Pseudomonas aeruginosa* may accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3531–3536.
- Hocquet, D., X. Bertrand, T. Köhler, D. Talon, and P. Plésiat. 2003. Genetic and phenotypic variations of a resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemic clone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:1887–1894.

27. Hocquet, D., P. Nordmann, F. El'Garch, L. Cabanne, and P. Plésiat. 2006. Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1347–1351.
28. Hocquet, D., C. Vogne, F. El'Garch, A. Vejux, N. Gotoh, A. Lee, O. Lomovskaya, and P. Plésiat. 2003. MexXY-OprM efflux pump is necessary for adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1371–1375.
29. Hurley, J. C., G. H. Miller, and A. L. Smith. 1995. Mechanism of amikacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **22**:331–336.
30. Irvin, R. T., J. W. R. Govan, J. A. M. Fyfe, and J. W. Costerton. 1981. Heterogeneity of antibiotic resistance in mucoid isolates of *Pseudomonas aeruginosa* obtained from cystic fibrosis patients: role of outer membrane proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **19**:1056–1063.
31. Islam, S., S. Jalal, and B. Wretling. 2004. Expression of the MexXY efflux pump in amikacin-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**:877–883.
32. Jeannot, K., S. Elsen, T. Köhler, I. Attree, C. vanDelden, and P. Plésiat. 2008. Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:2455–2462.
33. Jeannot, K., M. L. Sobel, F. El Garch, K. Poole, and P. Plésiat. 2005. Induction of the MexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction. *J. Bacteriol.* **187**:5341–5346.
34. Jo, J. T. H., F. S. L. Brinkman, and R. E. W. Hancock. 2003. Aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of novel outer membrane proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1101–1111.
35. Keen, N. T., S. Tamaki, D. Kobayashi, and D. Trollinger. 1988. Improved broad-host-range plasmids for DNA cloning in gram-negative bacteria. *Gene* **70**:191–197.
36. Köhler, T., M. Kok, M. Michéa-Hamzehpour, P. Plésiat, N. Gotoh, T. Nishino, L. K. Curty, and J. C. Pechère. 1996. Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2288–2290.
37. Köhler, T., M. Michéa-Hamzehpour, U. Henze, N. Gotoh, L. Kocjancic Curty, and J.-C. Pechère. 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **23**:345–354.
38. Köhler, T., M. Michéa-Hamzehpour, P. Plésiat, A. L. Kahr, and J. C. Pechère. 1997. Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2540–2543.
39. Li, X.-Z., L. Zhang, R. Srikumar, and K. Poole. 1998. β -Lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:399–403.
40. Li, X. Z., H. Nikaido, and K. Poole. 1995. Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1948–1953.
41. Li, X. Z., L. Zhang, and K. Poole. 2000. Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:433–436.
42. Li, Y., T. Mima, Y. Komori, Y. Morita, T. Kuroda, T. Mizushima, and T. Tsuchiya. 2003. A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**:572–575.
43. Llanes, C., D. Hocquet, C. Vogne, D. Benali-Baitich, C. Neuwirth, and P. Plésiat. 2004. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1797–1802.
44. Lyczack, J. B., C. L. Cannon, and G. B. Pier. 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:194–222.
45. MacLeod, D. L., L. E. Nelson, R. M. Shawar, B. B. Lin, L. G. Lockwood, J. E. Dirk, G. H. Miller, J. L. Burns, and R. L. Garber. 2000. Aminoglycoside resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. *J. Infect. Dis.* **181**:1180–1184.
46. Mahenthiralingam, E., M. E. Campbell, J. Foster, J. S. Lam, and D. P. Speert. 1996. Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **34**:1129–1135.
47. Maseda, H., H. Yoneyama, and T. Nakae. 2000. Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:658–664.
48. Masuda, N., N. Gotoh, C. Ishii, E. Sakagawa, S. Ohya, and T. Nishino. 1999. Interplay between chromosomal β -lactamase and the MexAB-OprM efflux system in intrinsic resistance to β -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:400–402.
49. Masuda, N., E. Sakagawa, S. Ohya, N. Gotoh, H. Tsujimoto, and T. Nishino. 2000. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3322–3327.
50. Matsuo, Y., S. Eda, N. Gotoh, E. Yoshihara, and T. Nakae. 2004. MexZ-mediated regulation of mexXY multidrug efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa* by binding on the mexZ-mexX intergenic DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **238**:23–28.
51. May, J. R., and A. Ingold. 1973. Sensitivity of respiratory strains of *Pseudomonas aeruginosa* to carbenicillin. *J. Med. Microbiol.* **6**:77–82.
52. Michéa Hamzehpour, M., J. C. Pechère, P. Plésiat, and T. Köhler. 1995. OprK and OprM define two genetically distinct multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2392–2396.
53. Middlemiss, J. K., and K. Poole. 2004. Differential impact of MexB mutations on substrate selectivity of the MexAB-OprM multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **186**:1258–1269.
54. Mokhonov, V. V., E. I. Mokhonova, H. Akama, and T. Nakae. 2004. Role of the membrane fusion protein in the assembly of resistance-nodulation-cell division multidrug efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **322**:483–489.
55. Moreau-Marquis, S., B. A. Stanton, and G. A. O'Toole. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **21**:595–599.
56. Mounieinné, H., J. Robert, V. Jarlier, and E. Cambau. 1999. Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:62–66.
57. Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita, and A. Yamaguchi. 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**:587–593.
58. Nakae, T., A. Nakajima, T. Ono, K. Saito, and H. Yoneyama. 1999. Resistance to β -lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the MexAB-OprM efflux pump and β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:1301–1303.
59. Nehme, D., X.-Z. Li, R. Elliot, and K. Poole. 2004. Assembly of the MexAB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of mutations in mexA compromising MexA multimerization and interaction with MexB. *J. Bacteriol.* **186**:2973–2983.
60. Nehme, D., and K. Poole. 2005. Interaction of the MexA and MexB components of the MexAB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of MexA extragenic suppressors of a T578I mutation in MexB. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:4375–4378.
61. Perry, J. D., L. Laine, S. Hughes, A. Nicholson, A. Galloway, and F. K. Gould. 2008. Recovery of antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from sputa of cystic fibrosis patients by culture on selective media. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**:1057–1061.
62. Poole, K., D. E. Heinrichs, and S. Neshat. 1993. Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. *Mol. Microbiol.* **10**:529–544.
63. Poole, K., K. Tetro, Q. X. Zhao, S. Neshat, D. E. Heinrichs, and N. Bianco. 1996. Expression of the multidrug resistance operon mexA-mexB-oprM in *Pseudomonas aeruginosa*: mexR encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2021–2028.
64. Quencee, L., D. Lamotte, and B. Polack. 2005. Combined sacB-based negative selection and cre-lox antibiotic marker recycling for efficient deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *BioTechniques* **38**:63–67.
65. Ramos Aires, J., T. Köhler, H. Nikaido, and P. Plésiat. 1999. Involvement of an efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2624–2628.
66. Ramsey, B. W. 1996. Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **335**:179–188.
67. Ramsey, B. W., M. S. Pepe, J. M. Quan, K. L. Otto, A. B. Montgomery, J. Williams-Warren, M. Vasiljev, D. Borowitz, C. L. Bowman, J. R. Marshall, S. Marshall, and A. L. Smith. 1999. Intermittent administration of inhaled tobramycin in patients with cystic fibrosis. *N. Engl. J. Med.* **340**:23–30.
68. Saito, K., S. Eda, H. Maseda, and T. Nakae. 2001. Molecular mechanism of MexR-mediated regulation of MexAB-OprM efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**:23–28.
69. Seale, T. W., H. Thirkill, M. Tarpay, M. Flux, and O. M. Rennert. 1979. Serotypes and antibiotic susceptibilities of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from single sputa of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* **9**:72–78.
70. Shawar, R. M., D. L. MacLeod, R. L. Garber, J. L. Burns, J. R. Stapp, C. R. Clausen, and S. K. Tanaka. 1999. Activities of tobramycin and six other antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2877–2880.
71. Shimizu, K., T. Kumada, W.-C. Hsieh, H.-Y. Chung, Y. Chong, R. S. Hare, G. H. Miller, F. J. Sabatelli, and J. Howard. 1985. Comparison of aminoglycoside resistance patterns in Japan, Formosa, and Korea, Chile, and the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**:282–288.
72. Simon, R., U. Prieffer, and A. Pühler. 1983. Vector plasmids for in vivo and in vitro manipulations of gram-negative bacteria, p. 98–106. In A. Pühler (ed.), *Molecular genetics of the bacteria-plant interaction*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
73. Smith, A. L., S. B. Fiel, N. Mayer-Hamblett, B. Ramsey, and J. L. Burns.

2003. Susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates and clinical response to parenteral antibiotic administration. *Chest* **123**:1495–1502.
74. Smith, A. W., and B. H. Iglewski. 1989. Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Nucleic Acids Res.* **17**:10509.
 75. Smith, E. E., D. G. Buckley, Z. Wu, C. Saenphimmachak, L. R. Hoffman, D. A. D'Argenio, S. I. Miller, B. W. Ramsey, D. P. Speert, S. M. Moskowitz, J. L. Burns, R. Kaul, and M. V. Olson. 2006. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:8487–8492.
 76. Sobel, M. L., D. Hocquet, L. Cao, P. Plésiat, and K. Poole. 2005. Mutations in PA3574 (*nalD*) lead to increased MexAB-OprM expression and multidrug resistance in laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:1782–1786.
 77. Sobel, M. L., G. A. McKay, and K. Poole. 2003. Contribution of the MexXY multidrug transporter to aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3202–3207.
 78. Spoering, A. L., and K. Lewis. 2001. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J. Bacteriol.* **183**:6746–6751.
 79. Srikumar, R., T. Kon, N. Gotoh, and K. Poole. 1998. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:65–71.
 80. Srikumar, R., X. Z. Li, and K. Poole. 1997. Inner membrane efflux components are responsible for β -lactam specificity of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **179**:7875–7881.
 81. Sriramulu, D. D., H. Lünsdorf, J. S. Lam, and U. Römling. 2005. Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *J. Med. Microbiol.* **54**:667–676.
 82. Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, F. S. L. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K.-S. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. W. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**:959–964.
 83. Vogne, C., J. Ramos Aires, C. Bailly, D. Hocquet, and P. Plésiat. 2004. Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1676–1680.
 84. Westbrook-Wadman, S., D. R. Sherman, M. J. Hickey, S. N. Coulter, Y. Q. Zhu, P. Warrenner, L. Y. Nguyen, R. M. Shawar, K. R. Folger, and C. K. Stover. 1999. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:2975–2983.
 85. Yanisch-Perron, C., J. Viera, and J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**:103–119.
 86. Yoneyama, H., H. Masada, T. Yamabayashi, S. Izumi, and T. Nakae. 2002. Secondary-site mutations restore the transport defect caused by the transmembrane domain mutation of the xenobiotic transporter MexB in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **292**:513–518.
 87. Yu, E. W., J. Ramos Aires, and H. Nikaido. 2003. AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. *J. Bacteriol.* **185**:5657–5664.
 88. Zhao, Q., and K. Poole. 2002. Differential effects of mutations in *tonB1* on intrinsic multidrug resistance and iron acquisition in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **184**:2045–2049.

Références Bibliographiques

- ¹**Aendekerk, S., Ghysels, B., Cornelis, P. and Baysse, C.** (2002). Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpnD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology* **148**(Pt 8): 2371-81.
 - ²**Aires, J. R., Köhler, T., Nikaido, H. and Plesiat, P.** (1999). Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **43**(11): 2624-8.
 - ³**Aires, J. R., Pechere, J. C., Van Delden, C. and Köhler, T.** (2002). Amino acid residues essential for function of the MexF efflux pump protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**(7): 2169-73.
 - ⁴**Akama, H., Kanemaki, M., Yoshimura, M., Tsukihara, T., Kashiwagi, T., Yoneyama, H., Narita, S., Nakagawa, A. and Nakae, T.** (2004). Crystal structure of the drug discharge outer membrane protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa*: dual modes of membrane anchoring and occluded cavity end. *J Biol Chem* **279**(51): 52816-9.
 - ⁵**Akama, H., Matsuura, T., Kashiwagi, S., Yoneyama, H., Narita, S., Tsukihara, T., Nakagawa, A. and Nakae, T.** (2004). Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **279**(25): 25939-42.
 - ⁶**Akasaka, T., Tanaka, M., Yamaguchi, A. and Sato, K.** (2001). Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**(8): 2263-8.
 - ⁷**Anderson, M. P., Gregory, R. J., Thompson, S., Souza, D. W., Paul, S., Mulligan, R. C., Smith, A. E. and Welsh, M. J.** (1991). Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* **253**(5016): 202-5.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K.** (2000). Current protocols in molecular biology. New York, N.Y, John Wiley & Sons, Inc.
- ⁹**Bagge, N., Ciofu, O., Hentzer, M., Campbell, J. I., Givskov, M. and Hoiby, N.** (2002). Constitutive high expression of chromosomal beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in *ampD*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**(11): 3406-11.
 - ¹⁰**Bagge, N., Hentzer, M., Andersen, J. B., Ciofu, O., Givskov, M. and Hoiby, N.** (2004). Dynamics and spatial distribution of beta-lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(4): 1168-74.
 - ¹¹**Ballesteros, S., Fernandez-Rodriguez, A., Villaverde, R., Escobar, H., Perez-Diaz, J. C. and Baquero, F.** (1996). Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother* **38**(1): 39-45.
 - ¹²**Barclay, M. L. and Begg, E. J.** (2001). Aminoglycoside adaptive resistance: importance for effective dosage regimens. *Drugs* **61**(6): 713-21.
 - ¹³**Barclay, M. L., Begg, E. J., Chambers, S. T., Thornley, P. E., Pattemore, P. K. and Grimwood, K.** (1996). Adaptive resistance to tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* **37**(6): 1155-64.

- ¹⁴**Becq, F.** (2003). [CFTR and transepithelial ionic transport abnormalities in cystic fibrosis]. *Arch Pediatr* **10 Suppl 2**: 325s-332s.
- ¹⁵**Bert, F. and Lambert-Zechovsky, N.** (1996). Comparative distribution of resistance patterns and serotypes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from intensive care units and other wards. *J Antimicrob Chemother* **37**(4): 809-13.
- ¹⁶**Bienvenu, T.** (2003). [Cystic fibrosis: relationship between genotype and phenotype]. *Arch Pediatr* **10 Suppl 2**: 318s-324s.
- ¹⁷**Biswas, S., Mohammad, M. M., Patel, D. R., Movileanu, L. and van den Berg, B.** (2007). Structural insight into OprD substrate specificity. *Nat Struct Mol Biol* **14**(11): 1108-9.
- ¹⁸**Bohnert, J. A., Schuster, S., Fahrnich, E., Trittler, R. and Kern, W. V.** (2007). Altered spectrum of multidrug resistance associated with a single point mutation in the *Escherichia coli* RND-type MDR efflux pump YhiV (MdtF). *J Antimicrob Chemother* **59**(6): 1216-22.
- ¹⁹**Bozziello, G., Werner, E., Roe, F., Kim, A. M., Ehrlich, G. D. and Stewart, P. S.** (2004). Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(7): 2659-64.
- ²⁰**BSAC** (2008). British Society of Antimicrobial Chemotherapy.
- ²¹**Burns, J. L., Saiman, L., Whittier, S., Larone, D., Krzewinski, J., Liu, Z., Marshall, S. A. and Jones, R. N.** (2000). Comparison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **38**(5): 1818-22.
- ²²**CA-SFM** (2008). Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.
- ²³**Campbell, J. I., Ciofu, O. and Hoiby, N.** (1997). *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis have different beta-lactamase expression phenotypes but are homogeneous in the *ampC-ampR* genetic region. *Antimicrob Agents Chemother* **41**(6): 1380-4.
- ²⁴**Cao, L., Srikumar, R. and Poole, K.** (2004). MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of the *nalC* gene encoding a repressor of *PA3720-PA3719*. *Mol Microbiol* **53**(5): 1423-36.
- ²⁵**Cardoso, O., Alves, A. F. and Leitao, R.** (2008). Metallo-beta-lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cystic fibrosis patient. *Int J Antimicrob Agents* **31**(4): 375-9.
- ²⁶**Cavallo, J. D., Leblanc, F. and Fabre, R.** (2000). [Surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* sensitivity to antibiotics in France and distribution of beta-lactam resistance mechanisms: 1998 GERPB study]. *Pathol Biol (Paris)* **48**(5): 472-7.
- ²⁷**Cavallo, J. D., Leblanc, F., Fabre, R. and Fourticq-Esqueoute, A.** (2001). [Survey of the antibiotic sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* in France and the distribution of beta-lactam resistance mechanisms: the GERPB 1999 study]. *Pathol Biol (Paris)* **49**(7): 534-9.

- ²⁸**Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T. T., Becher, A., Karkhoff-Schweizer, R. R. and Schweizer, H. P.** (2001). Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrob Agents Chemother* **45**(2): 428-32.
- ²⁹**Chuanchuen, R., Narasaki, C. T. and Schweizer, H. P.** (2002). The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. *J Bacteriol* **184**(18): 5036-44.
- ³⁰**CLSI** (2006). Clinical and Laboratory Standards Institute.
- ³¹**Conférence de Consensus.** (2002). Prise en charge du patient atteint de mucoviscidose.
- ³²**Daigle, D. M., Cao, L., Fraud, S., Wilke, M. S., Pacey, A., Klinoski, R., Strynadka, N. C., Dean, C. R. and Poole, K.** (2007). Protein modulator of multidrug efflux gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**(15): 5441-51.
- ³³**Daigle, D. M., Poole, K. and Dean, C. R.** (2007). RifAB (PA1540-PA1541) is an SMR Efflux Pump and Major Contributor to Multidrug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas 2007*: poster 95A.
- ³⁴**Daikos, G. L., Jackson, G. G., Lolans, V. T. and Livermore, D. M.** (1990). Adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics from first-exposure down-regulation. *J Infect Dis* **162**(2): 414-20.
- ³⁵**Daikos, G. L., Lolans, V. T. and Jackson, G. G.** (1991). First-exposure adaptive resistance to aminoglycoside antibiotics in vivo with meaning for optimal clinical use. *Antimicrob Agents Chemother* **35**(1): 117-23.
- ³⁶**de Kievit, T. R. and Lam, J. S.** (1997). Isolation and characterization of two genes, *waaC* (*rfaC*) and *waaF* (*rfaF*), involved in *Pseudomonas aeruginosa* serotype O5 inner-core biosynthesis. *J Bacteriol* **179**(11): 3451-7.
- ³⁷**de Lorenzo, V. and Timmis, K. N.** (1994). Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. *Methods Enzymol* **235**: 386-405.
- ³⁸**Dean, C. R., Visalli, M. A., Projan, S. J., Sum, P. E. and Bradford, P. A.** (2003). Efflux-mediated resistance to tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(3): 972-8.
- ³⁹**Diver, J. M., Bryan, L. E. and Sokol, P. A.** (1990). Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Anal Biochem* **189**(1): 75-9.
- ⁴⁰**Drenkard, E.** (2003). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect* **5**(13): 1213-9.
- ⁴¹**Drenkard, E. and Ausubel, F. M.** (2002). *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* **416**(6882): 740-3.
- ⁴²**Dubois, V., Arpin, C., Dupart, V., Scavelli, A., Coulange, L., Andre, C., Fischer, I., Grobost, F., Brochet, J. P., Lagrange, I., Dutilh, B., Jullin, J., Noury, P., Larribet, G. and Quentin, C.** (2008). Beta-lactam and aminoglycoside resistance rates and mechanisms among *Pseudomonas aeruginosa* in French general practice (community and private healthcare centres). *J Antimicrob Chemother* **62**(2): 316-23.

- ⁴³**Dumas, J. L., van Delden, C., Perron, K. and Köhler, T.** (2006). Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol Lett* **254**(2): 217-25.
- ⁴⁴**El'Garch, F., Jeannot, K., Hocquet, D., Llanes-Barakat, C. and Plesiat, P.** (2007). Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(3): 1016-21.
- ⁴⁵**Estivill, X., Bancells, C. and Ramos, C.** (1997). Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat* **10**(2): 135-54.
- ⁴⁶**Evans, J. C. and Segal, H.** (2007). A novel insertion sequence, ISPA26, in *oprD* of *Pseudomonas aeruginosa* is associated with carbapenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(10): 3776-7.
- ⁴⁷**Evans, K., Adewoye, L. and Poole, K.** (2001). MexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of MexR binding sites in the mexA-mexR intergenic region. *J Bacteriol* **183**(3): 807-12.
- ⁴⁸**Falagas, M. E. and Kasiakou, S. K.** (2005). Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* **40**(9): 1333-41.
- ⁴⁹**Foweraker, J. E., Laughton, C. R., Brown, D. F. and Bilton, D.** (2005). Phenotypic variability of *Pseudomonas aeruginosa* in sputa from patients with acute infective exacerbation of cystic fibrosis and its impact on the validity of antimicrobial susceptibility testing. *J Antimicrob Chemother* **55**(6): 921-7.
- ⁵⁰**Galimand, M., Courvalin, P. and Lambert, T.** (2003). Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(8): 2565-71.
- ⁵¹**Gibson, R. L., Emerson, J., McNamara, S., Burns, J. L., Rosenfeld, M., Yunker, A., Hamblett, N., Accurso, F., Dovey, M., Hiatt, P., Konstan, M. W., Moss, R., Retsch-Bogart, G., Wagener, J., Waltz, D., Wilmott, R., Zeitlin, P. L. and Ramsey, B.** (2003). Significant microbiological effect of inhaled tobramycin in young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **167**(6): 841-9.
- ⁵²**Gillham, M. I., Sundaram, S., Laughton, C. R., Haworth, C. S., Bilton, D. and Foweraker, J. E.** (2009). Variable antibiotic susceptibility in populations of *Pseudomonas aeruginosa* infecting patients with bronchiectasis. *J Antimicrob Chemother* **63**(4): 728-32.
- ⁵³**Girlich, D., Naas, T. and Nordmann, P.** (2004). Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(6): 2043-8.
- ⁵⁴**Giske, C. G., Buaro, L., Sundsfjord, A. and Wretling, B.** (2008). Alterations of porin, pumps, and penicillin-binding proteins in carbapenem resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist* **14**(1): 23-30.
- ⁵⁵**Giwerzman, B., Lambert, P. A., Rosdahl, V. T., Shand, G. H. and Hoiby, N.** (1990). Rapid emergence of resistance in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis

patients due to in-vivo selection of stable partially derepressed beta-lactamase producing strains. *J Antimicrob Chemother* **26**(2): 247-59.

⁵⁶**Godfrey, A. J., Bryan, L. E. and Rabin, H. R.** (1981). beta-Lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with modified penicillin-binding proteins emerging during cystic fibrosis treatment. *Antimicrob Agents Chemother* **19**(5): 705-11.

⁵⁷**Gotoh, N., Tsujimoto, H., Nomura, A., Okamoto, K., Tsuda, M. and Nishino, T.** (1998). Functional replacement of OprJ by OprM in the MexCD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **165**(1): 21-7.

⁵⁸**Govan, J. R. and Deretic, V.** (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* **60**(3): 539-74.

⁵⁹**Grkovic, S., Brown, M. H. and Skurray, R. A.** (2002). Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**(4): 671-701, table of contents.

⁶⁰**Grosskopf, C., Farriaux, J. P., Vidailhet, M., Briard, M. L., Navarro, J., Turck, D., Travert, G., Belot, V., Bloch, J. and Roussel, P.** (2003). [National neonatal screening program for cystic fibrosis: management and organization]. *Arch Pediatr* **10 Suppl 2**: 364s-369s.

⁶¹**Guan, L., Ehrmann, M., Yoneyama, H. and Nakae, T.** (1999). Membrane topology of the xenobiotic-exporting subunit, MexB, of the MexA,B-OprM extrusion pump in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* **274**(15): 10517-22.

⁶²**Guan, L. and Nakae, T.** (2001). Identification of essential charged residues in transmembrane segments of the multidrug transporter MexB of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**(5): 1734-9.

⁶³**Gunn, J. S., Lim, K. B., Krueger, J., Kim, K., Guo, L., Hackett, M. and Miller, S. I.** (1998). PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol Microbiol* **27**(6): 1171-82.

⁶⁴**Hamzehpour, M. M., Pechere, J. C., Plésiat, P. and Köhler, T.** (1995). OprK and OprM define two genetically distinct multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**(11): 2392-6.

⁶⁵**Hancock, R. E.** (1984). Alterations in outer membrane permeability. *Annu Rev Microbiol* **38**: 237-64.

⁶⁶**Hancock, R. E., Mutharia, L. M., Chan, L., Darveau, R. P., Speert, D. P. and Pier, G. B.** (1983). *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect Immun* **42**(1): 170-7.

⁶⁷**Hancock, R. E. and Wong, P. G.** (1984). Compounds which increase the permeability of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *Antimicrob Agents Chemother* **26**(1): 48-52.

⁶⁸**Hassett, D. J., Cuppoletti, J., Trapnell, B., Lyman, S. V., Rowe, J. J., Yoon, S. S., Hilliard, G. M., Parvatiyar, K., Kamani, M. C., Wozniak, D. J., Hwang, S. H., McDermott, T. R. and Ochsner, U. A.** (2002). Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis

airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Adv Drug Deliv Rev* **54**(11): 1425-43.

⁶⁹**Haussler, S., Lehmann, C., Breselge, C., Rohde, M., Classen, M., Tummeler, B., Vandamme, P. and Steinmetz, I.** (2003). Fatal outcome of lung transplantation in cystic fibrosis patients due to small-colony variants of the *Burkholderia cepacia* complex. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **22**(4): 249-53.

⁷⁰**Haussler, S., Tummeler, B., Weissbrodt, H., Rohde, M. and Steinmetz, I.** (1999). Small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Clin Infect Dis* **29**(3): 621-5.

⁷¹**He, G. X., Kuroda, T., Mima, T., Morita, Y., Mizushima, T. and Tsuchiya, T.** (2004). An H(+)-coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family of transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **186**(1): 262-5.

⁷²**Henrichfreise, B., Wiegand, I., Pfister, W. and Wiedemann, B.** (2007). Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(11): 4062-70.

⁷³**Higgins, C. F.** (1995). P-glycoprotein and cell volume-activated chloride channels. *J Bioenerg Biomembr* **27**(1): 63-70.

⁷⁴**Higgins, M. K., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C. and Koronakis, V.** (2004). Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(27): 9994-9.

⁷⁵**Higgins, P. G., Fluit, A. C., Milatovic, D., Verhoef, J. and Schmitz, F. J.** (2003). Mutations in GyrA, ParC, MexR and NfxB in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* **21**(5): 409-13.

⁷⁶**Hoang, T. T., Karkhoff-Schweizer, R. R., Kutchma, A. J. and Schweizer, H. P.** (1998). A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked

Pseudomonas aeruginosa mutants. *Gene* **212**(1): 77-86.

⁷⁷**Hocquet, D., Nordmann, P., El Garch, F., Cabanne, L. and Plésiat, P.** (2006). Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(4): 1347-51.

⁷⁸**Hocquet, D., Roussel-Delvallez, M., Cavallo, J. D. and Plesiat, P.** (2007). MexAB-OprM- and MexXY-overproducing mutants are very prevalent among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to ticarcillin. *Antimicrob Agents Chemother* **51**(4): 1582-3.

⁷⁹**Hocquet, D., Vogne, C., El Garch, F., Vejux, A., Gotoh, N., Lee, A., Lomovskaya, O. and Plésiat, P.** (2003). MexXY-OprM efflux pump is necessary for a adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(4): 1371-5.

⁸⁰**Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A. and Miller, S. I.** (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* **436**(7054): 1171-5.

- ⁸¹**Hoiby, N.** (1977). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. A survey. Acta Pathol Microbiol Scand Suppl(262): 1-96.
- ⁸²**Holtje, J. V., Kopp, U., Ursinus, A. and Wiedemann, B.** (1994). The negative regulator of beta-lactamase induction AmpD is a N-acetyl-anhydromuramyl-L-alanine amidase. FEMS Microbiol Lett **122**(1-2): 159-64.
- ⁸³**Honore, N., Nicolas, M. H. and Cole, S. T.** (1986). Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* is controlled by a regulatory gene that has been deleted from *Escherichia coli*. EMBO J **5**(13): 3709-14.
- ⁸⁴**Honore, N., Nicolas, M. H. and Cole, S. T.** (1989). Regulation of enterobacterial cephalosporinase production: the role of a membrane-bound sensory transducer. Mol Microbiol **3**(8): 1121-30.
- ⁸⁵**Hooper, D. C.** (2001). Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. Emerg Infect Dis **7**(2): 337-41.
- ⁸⁶**Huang, H. and Hancock, R. E.** (1996). The role of specific surface loop regions in determining the function of the imipenem-specific pore protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol **178**(11): 3085-90.
- ⁸⁷**Huang, H., Jeanteur, D., Pattus, F. and Hancock, R. E.** (1995). Membrane topology and site-specific mutagenesis of *Pseudomonas aeruginosa* porin OprD. Mol Microbiol **16**(5): 931-41.
- ⁸⁸**Hurley, J. C., Miller, G. H. and Smith, A. L.** (1995). Mechanism of amikacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. Diagn Microbiol Infect Dis **22**(4): 331-6.
- ⁸⁹**Islam, S., Jalal, S. and Wretling, B.** (2004). Expression of the MexXY efflux pump in amikacin-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect **10**(10): 877-83.
- ⁹⁰**Islam, S., Oh, H., Jalal, S., Karpati, F., Ciofu, O., Hoiby, N. and Wretling, B.** (2009). Chromosomal mechanisms of aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Infect **15**(1): 60-6.
- ⁹¹**Jacoby, G. A.** (2009). AmpC beta-lactamases. Clin Microbiol Rev **22**(1): 161-82, Table of Contents.
- ⁹²**Jalal, S., Ciofu, O., Hoiby, N., Gotoh, N. and Wretling, B.** (2000). Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. Antimicrob Agents Chemother **44**(3): 710-2.
- ⁹³**Jalal, S. and Wretling, B.** (1998). Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Microb Drug Resist **4**(4): 257-61.
- ⁹⁴**Jeannot, K., Elsen, S., Köhler, T., Attree, I., van Delden, C. and Plesiat, P.** (2008). Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. Antimicrob Agents Chemother **52**(7): 2455-62.
- ⁹⁵**Jeannot, K., Sobel, M. L., El Garch, F., Poole, K. and Plésiat, P.** (2005). Induction of the MexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction. J Bacteriol **187**(15): 5341-6.

- ⁹⁶**Jelsbak, L., Johansen, H. K., Frost, A. L., Thogersen, R., Thomsen, L. E., Ciofu, O., Yang, L., Haagenen, J. A., Hoiby, N. and Molin, S. (2007).** Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. *Infect Immun* **75**(5): 2214-24.
- ⁹⁷**Jo, J. T., Brinkman, F. S. and Hancock, R. E. (2003).** Aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of novel outer membrane proteins. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(3): 1101-11.
- ⁹⁸**Johansen, H. K., Moskowitz, S. M., Ciofu, O., Pressler, T. and Hoiby, N. (2008).** Spread of colistin resistant non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* among chronically infected Danish cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* **7**(5): 391-397.
- ⁹⁹**Juan, C., Macia, M. D., Gutierrez, O., Vidal, C., Perez, J. L. and Oliver, A. (2005).** Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* **49**(11): 4733-8.
- ¹⁰⁰**Juan, C., Moya, B., Perez, J. L. and Oliver, A. (2006).** Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level beta-lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(5): 1780-7.
- ¹⁰¹**Kadurugamuwa, J. L., Lam, J. S. and Beveridge, T. J. (1993).** Interaction of gentamicin with the A band and B band lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa* and its possible lethal effect. *Antimicrob Agents Chemother* **37**(4): 715-21.
- ¹⁰²**Karlowsky, J. A., Hoban, D. J., Zelenitsky, S. A. and Zhanel, G. G. (1997).** Altered *denA* and *anr* gene expression in aminoglycoside adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **40**(3): 371-6.
- ¹⁰³**Karlowsky, J. A., Saunders, M. H., Harding, G. A., Hoban, D. J. and Zhanel, G. G. (1996).** In vitro characterization of aminoglycoside adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**(6): 1387-93.
- ¹⁰⁴**Kieser, T. (1984).** Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* **12**(1): 19-36.
- ¹⁰⁵**Köhler, T., Epp, S. F., Curty, L. K. and Pechere, J. C. (1999).** Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **181**(20): 6300-5.
- ¹⁰⁶**Köhler, T., Michea-Hamzehpour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L. K. and Pechere, J. C. (1997).** Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **23**(2): 345-54.
- ¹⁰⁷**Kong, K. F., Jayawardena, S. R., Del Puerto, A., Wiehlmann, L., Laabs, U., Tummler, B. and Mathee, K. (2005).** Characterization of *poxB*, a chromosomal-encoded *Pseudomonas aeruginosa* oxacillinase. *Gene* **358**: 82-92.
- ¹⁰⁸**Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. and Hughes, C. (2000).** Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* **405**(6789): 914-9.

- ¹⁰⁹**Kwon, D. H. and Lu, C. D.** (2006). Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(5): 1615-22.
- ¹¹⁰**Langaee, T. Y., Gagnon, L. and Huletsky, A.** (2000). Inactivation of the *ampD* gene in *Pseudomonas aeruginosa* leads to moderate-basal-level and hyperinducible AmpC beta-lactamase expression. *Antimicrob Agents Chemother* **44**(3): 583-9.
- ¹¹¹**Legakis, N. J., Tzouvelekis, L. S., Makris, A. and Kotsifaki, H.** (1989). Outer membrane alterations in multiresistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* selected by ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* **33**(1): 124-7.
- ¹¹²**Legaree, B. A., Adams, C. B. and Clarke, A. J.** (2007). Overproduction of penicillin-binding protein 2 and its inactive variants causes morphological changes and lysis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**(14): 4975-83.
- ¹¹³**LeVine, A. M., Kurak, K. E., Bruno, M. D., Stark, J. M., Whitsett, J. A. and Korfhagen, T. R.** (1998). Surfactant protein-A-deficient mice are susceptible to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* **19**(4): 700-8.
- ¹¹⁴**Li, X. Z., Barre, N. and Poole, K.** (2000). Influence of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-oprJ and MexE-MexF-oprN multidrug efflux systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **46**(6): 885-93.
- ¹¹⁵**Li, X. Z., Ma, D., Livermore, D. M. and Nikaido, H.** (1994). Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **38**(8): 1742-52.
- ¹¹⁶**Li, X. Z., Nikaido, H. and Poole, K.** (1995). Role of *mexA-mexB-oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**(9): 1948-53.
- ¹¹⁷**Li, X. Z. and Poole, K.** (2001). Mutational analysis of the OprM outer membrane component of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**(1): 12-27.
- ¹¹⁸**Li, X. Z., Zhang, L. and Poole, K.** (2000). Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **45**(4): 433-6.
- ¹¹⁹**Li, Y., Mima, T., Komori, Y., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T. and Tsuchiya, T.** (2003). A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* **52**(4): 572-5.
- ¹²⁰**Liao, X. and Hancock, R. E.** (1995). Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa pbpB* gene encoding penicillin-binding protein 3. *Antimicrob Agents Chemother* **39**(8): 1871-4.
- ¹²¹**Lindquist, S., Lindberg, F. and Normark, S.** (1989). Binding of the *Citrobacter freundii* AmpR regulator to a single DNA site provides both autoregulation and activation of the inducible *ampC* beta-lactamase gene. *J Bacteriol* **171**(7): 3746-53.
- ¹²²**Livermore, D. M.** (1995). beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* **8**(4): 557-84.

- ¹²³**Llanes, C., Hocquet, D., Vogne, C., Benali-Baitich, D., Neuwirth, C. and Plesiat, P.** (2004). Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(5): 1797-802.
- ¹²⁴**Lomovskaya, O. and Totrov, M.** (2005). Vacuuming the periplasm. *J Bacteriol* **187**(6): 1879-83.
- ¹²⁵**MacLeod, D. L., Nelson, L. E., Shawar, R. M., Lin, B. B., Lockwood, L. G., Dirk, J. E., Miller, G. H., Burns, J. L. and Garber, R. L.** (2000). Aminoglycoside-resistance mechanisms for cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates are unchanged by long-term, intermittent, inhaled tobramycin treatment. *J Infect Dis* **181**(3): 1180-4.
- ¹²⁶**Macrina, F. L., Kopecko, D. J., Jones, K. R., Ayers, D. J. and McCowen, S. M.** (1978). A multiple plasmid-containing *Escherichia coli* strain: convenient source of size reference plasmid molecules. *Plasmid* **1**(3): 417-20.
- ¹²⁷**Magnet, S. and Blanchard, J. S.** (2005). Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev* **105**(2): 477-98.
- ¹²⁸**Mah, T. F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G. C., Stewart, P. S. and O'Toole, G. A.** (2003). A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* **426**(6964): 306-10.
- ¹²⁹**Mahenthiralingam, E., Campbell, M. E., Foster, J., Lam, J. S. and Speert, D. P.** (1996). Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **34**(5): 1129-35.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982). Molecular cloning. Laboratory manual. Cold Spring Harbor, N. Y.
- ¹³¹**Mao, W., Warren, M. S., Black, D. S., Satou, T., Murata, T., Nishino, T., Gotoh, N. and Lomovskaya, O.** (2002). On the mechanism of substrate specificity by resistance nodulation division (RND)-type multidrug resistance pumps: the large periplasmic loops of MexD from *Pseudomonas aeruginosa* are involved in substrate recognition. *Mol Microbiol* **46**(3): 889-901.
- ¹³²**Mariani-Kurkdjian, P. and Bingen, E.** (2003). [Pathogenic bacteria in cystic fibrosis]. *Arch Pediatr* **10 Suppl 2**: 342s-346s.
- ¹³³**Maseda, H., Saito, K., Nakajima, A. and Nakae, T.** (2000). Variation of the *mexT* gene, a regulator of the MexEF-oprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **192**(1): 107-12.
- ¹³⁴**Maseda, H., Sawada, I., Saito, K., Uchiyama, H., Nakae, T. and Nomura, N.** (2004). Enhancement of the mexAB-oprM efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the *mexEF-oprN* efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(4): 1320-8.
- ¹³⁵**Maseda, H., Yoneyama, H. and Nakae, T.** (2000). Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**(3): 658-64.

- ¹³⁶**Masuda, N., Gotoh, N., Ishii, C., Sakagawa, E., Ohya, S. and Nishino, T.** (1999). Interplay between chromosomal beta-lactamase and the MexAB-OprM efflux system in intrinsic resistance to beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **43**(2): 400-2.
- ¹³⁷**Masuda, N., Gotoh, N., Ohya, S. and Nishino, T.** (1996). Quantitative correlation between susceptibility and OprJ production in NfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **40**(4): 909-13.
- ¹³⁸**Masuda, N., Sakagawa, E. and Ohya, S.** (1995). Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**(3): 645-9.
- ¹³⁹**Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H. and Nishino, T.** (2000). Contribution of the MexX-MexY-oprM efflux system to intrinsic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**(9): 2242-6.
- ¹⁴⁰**Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H. and Nishino, T.** (2000). Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **44**(12): 3322-7.
- ¹⁴¹**Matsuo, Y., Eda, S., Gotoh, N., Yoshihara, E. and Nakae, T.** (2004). MexZ-mediated regulation of *mexXY* multidrug efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa* by binding on the *mexZ-mexX* intergenic DNA. *FEMS Microbiol Lett* **238**(1): 23-8.
- ¹⁴²**McCallum, S. J., Corkill, J., Gallagher, M., Ledson, M. J., Hart, C. A. and Walshaw, M. J.** (2001). Superinfection with a transmissible strain of *Pseudomonas aeruginosa* in adults with cystic fibrosis chronically colonised by *P aeruginosa*. *Lancet* **358**(9281): 558-60.
- ¹⁴³**McPhee, J. B., Lewenza, S. and Hancock, R. E.** (2003). Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **50**(1): 205-17.
- ¹⁴⁴**Meier, I., Wray, L. V. and Hillen, W.** (1988). Differential regulation of the Tn10-encoded tetracycline resistance genes *tetA* and *tetR* by the tandem tet operators O1 and O2. *EMBO J* **7**(2): 567-72.
- ¹⁴⁵**Mena, A., Smith, E. E., Burns, J. L., Speert, D. P., Moskowitz, S. M., Perez, J. L. and Oliver, A.** (2008). Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. *J Bacteriol* **190**(24): 7910-7.
- ¹⁴⁶**Mérens, A., Llanes, C., Pourcel, C., Roussel-Delvallez, M., Vergnaud, G., Cavallo, J. D. and Plésiat, P.** (2009). Resistance and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients: a French multi-centre study. *ECCMID Poster* 1505.
- ¹⁴⁷**Middlemiss, J. K. and Poole, K.** (2004). Differential impact of MexB mutations on substrate selectivity of the MexAB-OprM multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **186**(5): 1258-69.
- ¹⁴⁸**Miller, G. H., Sabatelli, F. J., Hare, R. S., Glupczynski, Y., Mackey, P., Shlaes, D., Shimizu, K. and Shaw, K. J.** (1997). The most frequent aminoglycoside resistance

mechanisms--changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? Aminoglycoside Resistance Study Groups. Clin Infect Dis **24 Suppl 1**: S46-62.

¹⁴⁹**Mima, T., Sekiya, H., Mizushima, T., Kuroda, T. and Tsuchiya, T.** (2005). Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Immunol **49**(11): 999-1002.

¹⁵⁰**Mine, T., Morita, Y., Kataoka, A., Mizushima, T. and Tsuchiya, T.** (1999). Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother **43**(2): 415-7.

¹⁵¹**Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y. and Tulkens, P. M.** (1999). Aminoglycosides: activity and resistance. Antimicrob Agents Chemother **43**(4): 727-37.

¹⁵²**Mokhonov, V. V., Mokhonova, E. I., Akama, H. and Nakae, T.** (2004). Role of the membrane fusion protein in the assembly of resistance-nodulation-cell division multidrug efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. Biochem Biophys Res Commun **322**(2): 483-9.

¹⁵³**Moreau-Marquis, S., Stanton, B. A. and O'Toole, G. A.** (2008). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation in the cystic fibrosis airway. Pulm Pharmacol Ther **21**(4): 595-9.

¹⁵⁴**Morita, Y., Cao, L., Gould, V. C., Avison, M. B. and Poole, K.** (2006). *nalD* encodes a second repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol **188**(24): 8649-54.

¹⁵⁵**Morita, Y., Murata, T., Mima, T., Shiota, S., Kuroda, T., Mizushima, T., Gotoh, N., Nishino, T. and Tsuchiya, T.** (2003). Induction of *mexCD-oprJ* operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. J Antimicrob Chemother **51**(4): 991-4.

¹⁵⁶**Morita, Y., Sobel, M. L. and Poole, K.** (2006). Antibiotic inducibility of the MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of the antibiotic-inducible PA5471 gene product. J Bacteriol **188**(5): 1847-55.

¹⁵⁷**Moskowitz, S. M., Ernst, R. K. and Miller, S. I.** (2004). PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. J Bacteriol **186**(2): 575-9.

¹⁵⁸**Mouneimne, H., Robert, J., Jarlier, V. and Cambau, E.** (1999). Type II topoisomerase mutations in ciprofloxacin-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother **43**(1): 62-6.

¹⁵⁹**Moya, B., Juan, C., Alberti, S., Perez, J. L. and Oliver, A.** (2008). Benefit of having multiple *ampD* genes for acquiring beta-lactam resistance without losing fitness and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother **52**(10): 3694-700.

¹⁶⁰**Munck, A., Sahler, C., Briard, M., Vidailhet, M. and Farriaux, J. P.** (2005). [Cystic fibrosis: the French neonatal screening organization, preliminary results]. Arch Pediatr **12**(6): 646-9.

- ¹⁶¹**Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T. and Yamaguchi, A.** (2006). Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* **443**(7108): 173-9.
- ¹⁶²**Nakae, T., Nakajima, A., Ono, T., Saito, K. and Yoneyama, H.** (1999). Resistance to beta-lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay between the MexAB-OprM efflux pump and beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* **43**(5): 1301-3.
- ¹⁶³**Nehme, D., Li, X. Z., Elliot, R. and Poole, K.** (2004). Assembly of the MexAB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of mutations in *mexA* compromising MexA multimerization and interaction with MexB. *J Bacteriol* **186**(10): 2973-83.
- ¹⁶⁴**Nehme, D. and Poole, K.** (2007). Assembly of the MexAB-OprM multidrug pump of *Pseudomonas aeruginosa*: component interactions defined by the study of pump mutant suppressors. *J Bacteriol* **189**(17): 6118-27.
- ¹⁶⁵**Nickel, J. C., Ruseska, I., Wright, J. B. and Costerton, J. W.** (1985). Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrob Agents Chemother* **27**(4): 619-24.
- ¹⁶⁶**Nikaido, H.** (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**(4): 593-656.
- ¹⁶⁷**Normark, S.** (1995). beta-Lactamase induction in gram-negative bacteria is intimately linked to peptidoglycan recycling. *Microb Drug Resist* **1**(2): 111-4.
- ¹⁶⁸**Okazaki, T. and Hirai, K.** (1992). Cloning and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa nfxB* gene, conferring resistance to new quinolones. *FEMS Microbiol Lett* **76**(1-2): 197-202.
- ¹⁶⁹**Oliver, A., Canton, R., Campo, P., Baquero, F. and Blazquez, J.** (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* **288**(5469): 1251-4.
- ¹⁷⁰**Pai, H., Kim, J., Lee, J. H., Choe, K. W. and Gotoh, N.** (2001). Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **45**(2): 480-4.
- ¹⁷¹**Paulsen, I. T., Brown, M. H. and Skurray, R. A.** (1996). Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev* **60**(4): 575-608.
- ¹⁷²**Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. and Dempfle, L.** (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**(9): e36.
- ¹⁷³**Pitt, T. L., Sparrow, M., Warner, M. and Stefanidou, M.** (2003). Survey of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from UK patients with cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents. *Thorax* **58**(9): 794-6.
- ¹⁷⁴**Poole, K.** (2004). Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect* **10**(1): 12-26.
- ¹⁷⁵**Poole, K.** (2005). Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**(2): 479-87.

- ¹⁷⁶**Poole, K., Gotoh, N., Tsujimoto, H., Zhao, Q., Wada, A., Yamasaki, T., Neshat, S., Yamagishi, J., Li, X. Z. and Nishino, T.** (1996). Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **21**(4): 713-24.
- ¹⁷⁷**Poole, K., Heinrichs, D. E. and Neshat, S.** (1993). Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. *Mol Microbiol* **10**(3): 529-44.
- ¹⁷⁸**Poole, K., Krebes, K., McNally, C. and Neshat, S.** (1993). Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol* **175**(22): 7363-72.
- ¹⁷⁹**Poole, K., Tetro, K., Zhao, Q., Neshat, S., Heinrichs, D. E. and Bianco, N.** (1996). Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob Agents Chemother* **40**(9): 2021-8.
- ¹⁸⁰**Quenee, L., Lamotte, D. and Polack, B.** (2005). Combined *sacB*-based negative selection and cre-lox antibiotic marker recycling for efficient gene deletion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biotechniques* **38**(1): 63-7.
- ¹⁸¹**Rahme, L. G., Stevens, E. J., Wolfort, S. F., Shao, J., Tompkins, R. G. and Ausubel, F. M.** (1995). Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* **268**(5219): 1899-902.
- ¹⁸²**Ramsey, B. W.** (1996). Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* **335**(3): 179-88.
- ¹⁸³**Ratjen, F. and Doring, G.** (2003). Cystic fibrosis. *Lancet* **361**(9358): 681-9.
- ¹⁸⁴**Rault, G., Roussey, M., Desrues, B., Turck, D., Perez, T., Wallaert, B., Derelle, J. and Treguer, R.** (2001). [Mucoviscidosis: recommendations for organization of centers and patient care systems]. *Arch Pediatr* **8 Suppl 5**: 802s-817s.
- ¹⁸⁵**Riordan, J. R.** (1993). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Annu Rev Physiol* **55**: 609-30.
- ¹⁸⁶**Rivera, M., Bryan, L. E., Hancock, R. E. and McGroarty, E. J.** (1988). Heterogeneity of lipopolysaccharides from *Pseudomonas aeruginosa*: analysis of lipopolysaccharide chain length. *J Bacteriol* **170**(2): 512-21.
- ¹⁸⁷**Rivera, M., Hancock, R. E., Sawyer, J. G., Haug, A. and McGroarty, E. J.** (1988). Enhanced binding of polycationic antibiotics to lipopolysaccharide from an aminoglycoside-supersusceptible, *tolA* mutant strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **32**(5): 649-55.
- ¹⁸⁸**Rivera, M. and McGroarty, E. J.** (1989). Analysis of a common-antigen lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **171**(4): 2244-8.
- ¹⁸⁹**Rocchetta, H. L., Burrows, L. L. and Lam, J. S.** (1999). Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**(3): 523-53.
- ¹⁹⁰**Rommens, J. M., Iannuzzi, M. C., Kerem, B., Drumm, M. L., Melmer, G., Dean, M., Rozmahel, R., Cole, J. L., Kennedy, D., Hidaka, N. and et al.** (1989).

Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**(4922): 1059-65.

¹⁹¹**Rowe, S. M., Miller, S. and Sorscher, E. J.** (2005). Cystic fibrosis. *N Engl J Med* **352**(19): 1992-2001.

¹⁹²**Saiman, L.** (2007). Clinical utility of synergy testing for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis: 'the motion for'. *Paediatr Respir Rev* **8**(3): 249-55.

¹⁹³**Saiman, L., Burns, J. L., Whittier, S., Krzewinski, J., Marshall, S. A. and Jones, R. N.** (1999). Evaluation of reference dilution test methods for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **37**(9): 2987-91.

¹⁹⁴**Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-7.

¹⁹⁵**Sauer, K.** (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biol* **4**(6): 219.

¹⁹⁶**Sauer, K., Cullen, M. C., Rickard, A. H., Zeef, L. A., Davies, D. G. and Gilbert, P.** (2004). Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J Bacteriol* **186**(21): 7312-26.

¹⁹⁷**Schmidtke, A. J. and Hanson, N. D.** (2008). Role of *ampD* homologs in overproduction of AmpC in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **52**(11): 3922-7.

¹⁹⁸**Schneider, M., Muhlemann, K., Droz, S., Couzinet, S., Casaulta, C. and Zimmerli, S.** (2008). Clinical characteristics associated with isolation of small-colony variants of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **46**(5): 1832-4.

¹⁹⁹**Schweizer, H. P.** (2003). Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res* **2**(1): 48-62.

²⁰⁰**Seeger, M. A., Schiefner, A., Eicher, T., Verrey, F., Diederichs, K. and Pos, K. M.** (2006). Structural asymmetry of AcrB trimer suggests a peristaltic pump mechanism. *Science* **313**(5791): 1295-8.

²⁰¹**Sekiya, H., Mima, T., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T. and Tsuchiya, T.** (2003). Functional cloning and characterization of a multidrug efflux pump, *mexHI-opmD*, from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(9): 2990-2.

²⁰²**Sennhauser, G., Amstutz, P., Briand, C., Storchenegger, O. and Grutter, M. G.** (2007). Drug export pathway of multidrug exporter AcrB revealed by DARPin inhibitors. *PLoS Biol* **5**(1): e7.

²⁰³**Shak, S., Capon, D. J., Hellmiss, R., Marsters, S. A. and Baker, C. L.** (1990). Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(23): 9188-92.

²⁰⁴**Shawar, R. M., MacLeod, D. L., Garber, R. L., Burns, J. L., Stapp, J. R., Clausen, C. R. and Tanaka, S. K.** (1999). Activities of tobramycin and six other

antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* **43**(12): 2877-80.

²⁰⁵**Shigeta, M., Tanaka, G., Komatsuzawa, H., Sugai, M., Suginaka, H. and Usui, T.** (1997). Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a simple method. *Chemotherapy* **43**(5): 340-5.

²⁰⁶**Siegmund, I. and Wagner, F.** (1991). New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth in mineral agar. *Biotechnol Tech* **5**: 265-268.

²⁰⁷**Simon, R., O'Connell, M., Labes, M. and Puhler, A.** (1986). Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Methods Enzymol* **118**(640-59).

²⁰⁸**Smith, A. W. and Iglewski, B. H.** (1989). Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Nucleic Acids Res* **17**(24): 10509.

²⁰⁹**Smith, E. E., Buckley, D. G., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., Miller, S. I., Ramsey, B. W., Speert, D. P., Moskowitz, S. M., Burns, J. L., Kaul, R. and Olson, M. V.** (2006). Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(22): 8487-92.

²¹⁰**Sobel, M. L., Hocquet, D., Cao, L., Plesiat, P. and Poole, K.** (2005). Mutations in *PA3574 (nalD)* lead to increased MexAB-OprM expression and multidrug resistance in laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**(5): 1782-6.

²¹¹**Sobel, M. L., McKay, G. A. and Poole, K.** (2003). Contribution of the MexXY multidrug transporter to aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(10): 3202-7.

²¹²**Sriramulu, D. D., Lunsdorf, H., Lam, J. S. and Romling, U.** (2005). Microcolony formation: a novel biofilm model of *Pseudomonas aeruginosa* for the cystic fibrosis lung. *J Med Microbiol* **54**(Pt 7): 667-76.

²¹³**Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrenner, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S. and Olson, M. V.** (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**(6799): 959-64.

²¹⁴**Su, C. C., Li, M., Gu, R., Takatsuka, Y., McDermott, G., Nikaido, H. and Yu, E. W.** (2006). Conformation of the AcrB multidrug efflux pump in mutants of the putative proton relay pathway. *J Bacteriol* **188**(20): 7290-6.

²¹⁵**Szczepanowski, R., Krahn, I., Linke, B., Goesmann, A., Puhler, A. and Schluter, A.** (2004). Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system. *Microbiology* **150**(Pt 11): 3613-30.

- ²¹⁶**Tabcharani, J. A., Chang, X. B., Riordan, J. R. and Hanrahan, J. W.** (1991). Phosphorylation-regulated Cl⁻ channel in CHO cells stably expressing the cystic fibrosis gene. *Nature* **352**(6336): 628-31.
- ²¹⁷**Taber, H. W., Mueller, J. P., Miller, P. F. and Arrow, A. S.** (1987). Bacterial uptake of aminoglycoside antibiotics. *Microbiol Rev* **51**(4): 439-57.
- ²¹⁸**Takatsuka, Y. and Nikaido, H.** (2006). Threonine-978 in the transmembrane segment of the multidrug efflux pump AcrB of *Escherichia coli* is crucial for drug transport as a probable component of the proton relay network. *J Bacteriol* **188**(20): 7284-9.
- ²¹⁹**Talon, D., Capellier, G., Boillot, A. and Michel-Briand, Y.** (1995). Use of pulsed-field gel electrophoresis as an epidemiologic tool during an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* lung infections in an intensive care unit. *Intensive Care Med* **21**(12): 996-1002.
- ²²⁰**Talon, D., Mulin, B. and Thouverez, M.** (1998). Clonal identification of *Aeromonas hydrophila* strains using randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Eur J Epidemiol* **14**(3): 305-10.
- ²²¹**Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H. and Swaminathan, B.** (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* **33**(9): 2233-9.
- ²²²**Tikhonova, E. B., Wang, Q. and Zgurskaya, H. I.** (2002). Chimeric analysis of the multicomponent multidrug efflux transporters from gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **184**(23): 6499-507.
- ²²³**Trias, J. and Nikaido, H.** (1990). Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **34**(1): 52-7.
- ²²⁴**Trias, J. and Nikaido, H.** (1990). Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. *J Biol Chem* **265**(26): 15680-4.
- ²²⁵**Valenza, G., Tappe, D., Turnwald, D., Frosch, M., Konig, C., Hebestreit, H. and Abele-Horn, M.** (2008). Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* **7**(2): 123-7.
- ²²⁶**Vasseur, P., Soscia, C., Voulhoux, R. and Filloux, A.** (2007). PelC is a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane lipoprotein of the OMA family of proteins involved in exopolysaccharide transport. *Biochimie* **89**(8): 903-15.
- ²²⁷**Vogne, C., Aires, J. R., Bailly, C., Hocquet, D. and Plesiat, P.** (2004). Role of the multidrug efflux system MexXY in the emergence of moderate resistance to aminoglycosides among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(5): 1676-80.
- ²²⁸**Vu-Thien, H., Corbineau, G., Hormigos, K., Fauroux, B., Corvol, H., Clement, A., Vergnaud, G. and Pourcel, C.** (2007). Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for longitudinal survey of sources of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* **45**(10): 3175-83.

- ²²⁹**Wagner, V. E., Frelinger, J. G., Barth, R. K. and Iglewski, B. H.** (2006). Quorum sensing: dynamic response of *Pseudomonas aeruginosa* to external signals. *Trends Microbiol* **14**(2): 55-8.
- ²³⁰**Walters, M. C., 3rd, Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J. and Stewart, P. S.** (2003). Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(1): 317-23.
- ²³¹**Welsh, M. J. and Smith, A. E.** (1993). Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* **73**(7): 1251-4.
- ²³²**Werner, E., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J., Heydorn, A., Molin, S., Pitts, B. and Stewart, P. S.** (2004). Stratified growth in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **70**(10): 6188-96.
- ²³³**Westbrock-Wadman, S., Sherman, D. R., Hickey, M. J., Coulter, S. N., Zhu, Y. Q., Warrenner, P., Nguyen, L. Y., Shawar, R. M., Folger, K. R. and Stover, C. K.** (1999). Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. *Antimicrob Agents Chemother* **43**(12): 2975-83.
- ²³⁴**Whiteley, M., Banger, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S. and Greenberg, E. P.** (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**(6858): 860-4.
- ²³⁵**Wiehlmann, L., Wagner, G., Cramer, N., Siebert, B., Gudowius, P., Morales, G., Köhler, T., van Delden, C., Weinl, C., Slickers, P. and Tummeler, B.** (2007). Population structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(19): 8101-6.
- ²³⁶**Wilke, M. S., Heller, M., Creagh, A. L., Haynes, C. A., McIntosh, L. P., Poole, K. and Strynadka, N. C.** (2008). The crystal structure of MexR from *Pseudomonas aeruginosa* in complex with its antirepressor ArmR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(39): 14832-7.
- ²³⁷**Wilkinson, S. G.** (1996). Bacterial lipopolysaccharides--themes and variations. *Prog Lipid Res* **35**(3): 283-343.
- ²³⁸**Wozniak, D. J., Wyckoff, T. J., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G. A. and Parsek, M. R.** (2003). Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(13): 7907-12.
- ²³⁹**Xiong, Y. Q., Caillon, J., Kergueris, M. F., Drugeon, H., Baron, D., Potel, G. and Bayer, A. S.** (1997). Adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* induced by aminoglycosides and killing kinetics in a rabbit endocarditis model. *Antimicrob Agents Chemother* **41**(4): 823-6.
- ²⁴⁰**Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J.** (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**(1): 103-19.
- ²⁴¹**Yerushalmi, H., Lebendiker, M. and Schuldiner, S.** (1995). EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H⁺ and is soluble in organic solvents. *J Biol Chem* **270**(12): 6856-63.

- ²⁴²**Yokoyama, K., Doi, Y., Yamane, K., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., Yagi, T., Kato, H. and Arakawa, Y.** (2003). Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet* **362**(9399): 1888-93.
- ²⁴³**Yoneyama, H., Maseda, H., Yamabayashi Ta, T. A., Izumi, S. and Nakae, T.** (2002). Secondary-site mutation restores the transport defect caused by the transmembrane domain mutation of the xenobiotic transporter MexB in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* **292**(2): 513-8.
- ²⁴⁴**Yoneyama, H., Ocaktan, A., Gotoh, N., Nishino, T. and Nakae, T.** (1998). Subunit swapping in the Mex-extrusion pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* **244**(3): 898-902.
- ²⁴⁵**Yoshida, H., Nakamura, M., Bogaki, M. and Nakamura, S.** (1990). Proportion of DNA gyrase mutants among quinolone-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **34**(6): 1273-5.
- ²⁴⁶**Yu, E. W., Aires, J. R., McDermott, G. and Nikaido, H.** (2005). A periplasmic drug-binding site of the AcrB multidrug efflux pump: a crystallographic and site-directed mutagenesis study. *J Bacteriol* **187**(19): 6804-15.
- ²⁴⁷**Zannoni, D.** (1989). The respiratory chains of pathogenic pseudomonads. *Biochim Biophys Acta* **975**(3): 299-316.
- ²⁴⁸**Zeng, L. and Jin, S.** (2003). *aph(3')-IIb*, a gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, is under the positive control of surrogate regulator HpaA. *Antimicrob Agents Chemother* **47**(12): 3867-76.
- ²⁴⁹**Zgurskaya, H. I. and Nikaido, H.** (2000). Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Mol Microbiol* **37**(2): 219-25.
- ²⁵⁰**Zhanel, G. G., Karlowsky, J. A., Saunders, M. H., Davidson, R. J., Hoban, D. J., Hancock, R. E., McLean, I. and Nicolle, L. E.** (1995). Development of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Pseudomonas aeruginosa* after serial exposure to fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* **39**(2): 489-95.
- ²⁵¹**Zhao, Q., Li, X. Z., Mistry, A., Srikumar, R., Zhang, L., Lomovskaya, O. and Poole, K.** (1998). Influence of the TonB energy-coupling protein on efflux-mediated multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **42**(9): 2225-31.
- ²⁵²**Ziha-Zarifi, I., Llanes, C., Köhler, T., Pechere, J. C. and Plésiat, P.** (1999). In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob Agents Chemother* **43**(2): 287-91.

PERMIS D'IMPRIMER

THESE POUR OBTENIR LE DIPLOME DE DOCTORAT

DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE

EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

N° 25.09.05

Présentée par

Madame, ~~Monsieur,~~

VETTORETTI Lucie

Né(e) le

19 juillet 1979

et ayant pour titre :

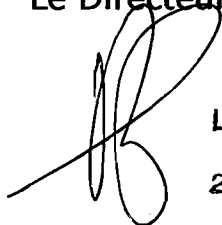
Adaptation des mécanismes de résistance
par efflux actif chez les souches de *Pseudomonas*
aeruginosa dans la mucoviscidose

Vu et permis d'imprimer,

Besançon, le

3/09

Le Directeur de Thèse,



Laboratoire de Bactériologie
CHU - Jean MINUOZ
25030 BESANCON CEDEX
Pr. PLESAT

Le Directeur de l'U.F.R. S.M.P.



Le Professeur E. SAMPAIO



Résumé

Bactérie opportuniste bien connue, *Pseudomonas aeruginosa* est un acteur majeur de l'infection broncho-pulmonaire chronique qui se développe chez les patients atteints de mucoviscidose (CF). Grâce à des mécanismes complexes, ce pathogène parvient à s'implanter dans les voies respiratoires des malades et à résister aux traitements antibiotiques, même les plus agressifs.

L'analyse rétrospective d'une collection de souches du laboratoire de Bactériologie du CHU de Besançon a révélé chez la plupart des porteurs chroniques une diversification parfois extrême des profils de résistance au cours du temps. Les techniques de génotypage par l'analyse des microsatellites (*Multiple-Locus Variable-number tandem-repeat Analysis*), par la détection de *Single Nucleotides Polymorphisms* (puces Clondiag[®]) et par macrorestriction de l'ADN génomique (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*) ont conduit à des résultats similaires pour la comparaison des isolats séquentiels provenant d'un même patient. Aucun clone n'était partagé entre les 6 patients, traduisant l'absence de contamination croisée pendant la période étudiée (1998-2006). Le plus souvent la souche de primo-colonisation évolue pour donner naissance à des sous-populations dont les niveaux de résistance fluctuent. Si certaines d'entre elles évoluent vers la multirésistance, d'autres, au contraire, deviennent hypersensibles à certains antibiotiques. Ainsi, dans près de 30 % des cas et chez près de un patient sur deux, les souches deviennent hypersensibles aux β -lactamines. Nous avons montré que ce phénotype particulier, nommé Tic^{HS}, analysé chez 11 isolats résulte d'un déficit dans le système d'efflux actif MexAB-OprM pouvant impliquer, soit la sous-expression du gène *mexB* (n=2), soit la production d'une protéine MexB (n=2) ou MexA (n=1) altérée. Chez d'autres isolats (n=6), le système MexAB-OprM est *a priori* intact, mais non fonctionnel. Par ailleurs, dans ce travail nous avons mis en évidence, pour la première fois, que *P. aeruginosa* peut s'adapter *in vivo* à la pression exercée par les aminosides en modifiant non plus, la quantité de systèmes d'efflux produite, mais la pompe elle-même. Par exemple, la substitution F1018L dans la protéine MexY du système MexXY(OprM) entraîne une augmentation de la résistance d'un facteur 2 vis-à-vis des substrats de la pompe (aminosides, céfépime, fluoroquinolones). Toutefois, cette substitution n'explique qu'en partie les hauts niveaux de résistance (augmentation des CMI d'un facteur 16) conférés par le système MexXY(OprM) chez certaines souches ce qui suggère la présence de mécanismes additionnels susceptibles de moduler l'efficacité de cette pompe.