

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Ecole Doctorale Environnements-Santé

THESE

Pour obtenir le grade de  
Docteur de l'Université de Bourgogne  
Discipline : Sciences de la Vie

par

**Julien Bador**

Le 18 juin 2013

**Résistance aux antibiotiques par mécanisme d'efflux  
chez *Achromobacter xylosoxidans***

Directeur de thèse

**Pr Catherine Neuwirth**

Jury :

**Dr Sophie de Bentzmann** (rapporteur)

**Pr Christophe de Champs de Saint-Léger** (rapporteur)

**Dr Anne Houzel**

**Dr Catherine Llanes**

**Dr Jacques Covès**

# REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord Catherine Neuwirth de m'avoir proposé ce sujet de recherche et de n'avoir jamais ménagé son temps pour l'encadrement des manipulations, les corrections d'articles et manuscrits, et les déplacements. Merci également de m'avoir permis de réaliser ce travail de recherche en parallèle de l'activité du laboratoire.

J'adresse mes sincères remerciements aux rapporteurs de cette thèse, Sophie de Bentzmann (Directeur de Recherche à l'Institut de Microbiologie de la Méditerranée à Marseille) et Christophe de Champs de Saint-Léger (PUPH de Bactériologie à Reims), qui ont consacré beaucoup de leur temps pour la lecture du manuscrit et qui viennent de loin pour juger ce travail.

Je remercie aussi vivement les membres du jury, Catherine Llanes (Maître de Conférence de Bactériologie à Besançon), Jacques Covès (Directeur de Recherche à l'Institut de Biologie Structurale à Grenoble) et Anne Houzel (Médecin Pédiatre au CHU et au Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose de Dijon) d'avoir accepté de juger ce travail.

Merci à l'équipe du secteur « recherche-épidémio » du labo : Lucie, Eliane, Nath, Véro et Angélique. L'ambiance de travail et l'entre-aide comptent beaucoup.

Un grand merci à toutes les personnes qui ont contribué à ce travail : à Lionel Piroth pour avoir fait partie du comité de suivi de thèse, à Delphine et toute l'équipe de Vivexia pour l'accueil chaleureux à chaque séance d'électroporation, à Hélène, Michelle, Michèle et Céline pour le passage des échantillons à séquencer, à Alain Hartmann pour son aide en biologie moléculaire, à Gaël Belliot pour m'avoir initié à la biologie moléculaire pendant mon internat et qui reste toujours disponible pour ses précieux conseils techniques, aux bisontins Catherine, Cédric, Sophie et Damien qui ont tout fait pour que l'inactivation « propre » fonctionne sur *Achromobacter* (en vain...), à Odile pour les innombrables commandes d'oligos, à Jean-Marie pour son aide dans la détermination des CMI, aux filles de la laverie pour la préparation des géloses et l'autoclavage du matériel, et aux stagiaires ayant travaillé sur le sujet : Anthony, Marie, Augustin, Pierre, Manu et Marie-Charlotte.

Merci à toute l'équipe du laboratoire (qui pense toujours à « mettre de côté les Achromos » de la paillasse) et à mes collègues Nathalie, Lucie, Catherine, Angélique, André et Jean-Marie, toujours très disponibles et arrangeants pour l'organisation du travail.

A mes amis de Dijon et d'ailleurs.

A ma famille.

A Aline et nos deux petits Achromos.

# RESUME

*Achromobacter xylosoxidans* est un bacille à Gram négatif non fermentaire pathogène opportuniste. Il est de plus en plus fréquemment isolé chez les patients atteints de mucoviscidose, colonisant leur arbre bronchique et pouvant être responsable d'une dégradation de la fonction respiratoire.

Il s'agit d'une espèce bactérienne naturellement résistante à de nombreux antibiotiques : aux céphalosporines (hors ceftazidime), à l'aztréonam et aux aminosides. Les résistances acquises sont fréquentes, en particulier dans les souches isolées d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose. Ces résistances acquises concernent des molécules antibiotiques très utilisées pour le traitement des exacerbations respiratoires de la maladie, ce qui conduit parfois à de véritables impasses thérapeutiques.

Au début de notre travail, seuls quelques mécanismes de résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines avaient été décrits, mais aucun mécanisme impliqué dans la multi-résistance naturelle d'*A. xylosoxidans*.

La résistance aux antibiotiques par efflux actif de type Resistance-Nodulation-cell Division (RND) est très répandue chez les bacilles à Gram négatif non fermentaires. Nous avons identifié dans le génome d'*A. xylosoxidans* trois opérons pouvant coder pour des systèmes d'efflux RND. Par une technique d'inactivation génique nous avons montré que les trois systèmes d'efflux (AxyABM, AxyXY-OprZ et AxyCDJ) pouvaient exporter des antibiotiques. Deux d'entre eux participent à l'antibio-résistance naturelle d'*A. xylosoxidans* : AxyABM (résistance à l'aztréonam et à plusieurs céphalosporines) et AxyXY-OprZ (résistance aux aminosides).

## **Mots clés :**

*Achromobacter xylosoxidans*, résistance aux antibiotiques, aminosides, céphalosporines, aztréonam, efflux, RND.

# ABSTRACT

*Achromobacter xylosoxidans* is a nonfermentative Gram-negative bacillus considered to be an opportunistic agent. It is an emerging pathogen in cystic fibrosis (CF), increasingly recovered from the respiratory tract of CF patients. It can cause inflammation and therefore might be involved in the decline of the lung function.

This species is innately resistant to many antibiotics, including cephalosporins (except ceftazidime), aztreonam, and aminoglycosides. Moreover the isolates recovered from CF patient sputum are often resistant to major antimicrobial components usually prescribed to treat pulmonary infections.

There was very little known about acquired resistance and nothing about innate resistance mechanisms when we started this work.

Antibiotic resistance mediated by Resistance-Nodulation-cell Division (RND)-type efflux pumps is widespread among nonfermentative Gram-negative bacilli. We have characterized three putative RND operons in *A. xylosoxidans* genome. By using a gene inactivation technique we have demonstrated that these operons encode efflux systems (AxyABM, AxyXY-OprZ and AxyCDJ) able to export antibiotics. Two of them are strongly involved in *A. xylosoxidans* innate antibiotic resistance: AxyABM (resistance to aztreonam and various cephalosporins) and AxyXY-OprZ (aminoglycoside resistance).

## **Keywords:**

*Achromobacter xylosoxidans*, antibiotic resistance, aminoglycosides, cephalosporins, aztreonam, efflux, RND.

# TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES .....	4
LISTE DES TABLEAUX .....	5
LISTE DES ABREVIATIONS .....	6
INTRODUCTION.....	8
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	11
I. <i>ACHROMOBACTER XYLOSOXIDANS</i> .....	12
1. <i>Généralités</i> .....	12
a. Taxonomie .....	12
b. Caractères culturels et biochimiques.....	13
c. Habitat.....	14
2. <i>Pouvoir pathogène</i> .....	15
a. Hors mucoviscidose .....	15
b. Chez les patients atteints de mucoviscidose.....	15
3. <i>Résistance aux antibiotiques</i> .....	17
a. Résistance naturelle .....	17
b. Résistance acquise .....	18
c. Mécanismes de résistance .....	20
II. SYSTEMES D'EFFLUX BACTERIENS ET RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES .....	21
1. <i>Généralités sur les systèmes d'efflux</i> .....	23
a. Structure et classification des transporteurs d'efflux.....	23
• La famille ATP-Binding Cassette (ABC) .....	25
• La famille Small Multidrug Resistance (SMR).....	26
• La famille Major Facilitator Superfamily (MFS).....	26
• La famille Multidrug And Toxic-compound Extrusion (MATE) .....	28
• La famille Resistance-Nodulation-cell Division (RND) .....	28
• Particularités chez les bactéries à Gram négatif.....	38
b. Spécificité de substrats.....	39
c. Fonctions des systèmes d'efflux .....	39
d. Inhibiteurs d'efflux .....	40
2. <i>Systèmes d'efflux RND impliqués dans la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif non fermentaires (BGN-NF)</i> .....	43
a. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	43
❖ MexAB-OprM .....	43
❖ MexCD-OprJ .....	46
❖ MexEF-OprN.....	46
❖ MexXY/OprM .....	46
❖ Autres systèmes d'efflux RND .....	47
❖ Régulation de l'expression des opérons d'efflux RND de <i>P. aeruginosa</i> .....	48
b. Autres BGN-NF d'intérêt médical .....	52
❖ <i>Burkholderia</i> .....	52
❖ <i>Pseudomonas</i> autres que <i>P. aeruginosa</i> .....	54
❖ <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> .....	55
c. BGN-NF non rencontrés en pathologie humaine .....	56
3. <i>Systèmes d'efflux chez A. xylosoxidans</i> .....	57
4. <i>Conclusion</i> .....	58

<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL .....</b>	<b>59</b>
-----------------------------------	-----------

<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>63</b>
------------------------------------	-----------

I. SOUCHES BACTERIENNES.....	64
II. CULTURES BACTERIENNES.....	65
III. PLASMIDES .....	66
IV. ANTIBIOGRAMMES .....	67
V. DETERMINATION DES CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES (CMI).....	67
VI. UTILISATION D'INHIBITEURS D'EFFLUX.....	68
VII. TECHNIQUES D'EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES BACTERIENS.....	69
1. <i>Extraction d'ADN génomique</i> .....	69
a. Par choc thermique .....	69
b. Par lyse chimique.....	69
2. <i>Extraction d'ADN plasmidique</i> .....	70
a. Extraction de plasmide par la méthode de Kieser .....	70
b. Extraction de plasmide pour clonage et transformation .....	70
3. <i>Extraction des ARN totaux</i> .....	70
VIII. AMPLIFICATION GENIQUE PAR PCR.....	71
IX. ELECTROPHORESE ANALYTIQUE DES ADN.....	71
X. DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES PAR SPECTROPHOTOMETRIE .....	72
XI. SEQUENÇAGE D'ADN.....	72
1. <i>Séquençage des produits de PCR par la méthode de Sanger</i> .....	72
2. <i>Séquençage à haut débit</i> .....	73
XII. MARCHE SUR LE CHROMOSOME.....	73
XIII. INACTIVATION GENIQUE .....	74
1. <i>Inactivation génique par insertion d'un plasmide suicide</i> .....	74
a. Construction du plasmide suicide .....	75
❖ Par une technique de clonage conventionnel .....	75
❖ Par le kit de clonage In-Fusion® HD (Clontech).....	76
b. Transformation d' <i>A. xyloxydans</i> par électroporation.....	76
c. Vérification de l'inactivation du gène par PCR et RT-PCR.....	78
2. <i>Inactivation génique par délétion</i> .....	78
XIV. QUANTIFICATION RELATIVE DE L'EXPRESSION GENIQUE PAR RT-PCR EN TEMPS REEL.....	81
1. <i>Synthèse d'ADN complémentaire (ADNc)</i> .....	81
2. <i>Amplification de l'ADNc</i> .....	81
3. <i>Quantification relative des ARNm</i> .....	82

<b>RESULTATS.....</b>	<b>83</b>
-----------------------	-----------

I. EFFET DES INHIBITEURS D'EFFLUX .....	84
II. SYSTEME AXYABM.....	85
1. <i>Caractérisation génétique de l'opéron axyABM</i> .....	85
a. Détection d'un gène candidat de transporteur RND par PCR consensus .....	85
b. Séquençage de l'opéron entier par marche sur le chromosome.....	86
2. <i>Inactivation du gène axyB</i> .....	87
a. Inactivation d' <i>axyB</i> dans la souche sauvage AXX-A.....	88
b. Inactivation d' <i>axyB</i> dans les souches AXX-D3, AXX-H1 et AXX-H2 .....	90
c. Synthèse des résultats.....	91
3. <i>Inactivation du gène axyR</i> .....	92
4. <i>Comparaison du niveau d'expression d'axyB entre AXX-H1 et AXX-H2</i> .....	92
III. REPERAGE <i>IN SILICO</i> DE CANDIDATS D'EFFLUX RND DANS LE GENOME D'AXX-A .....	93
IV. SYSTEME AXYXY-OPRZ.....	96
1. <i>Caractérisation génétique de l'opéron axyXY-oprZ</i> .....	96
2. <i>Inactivation du gène axyY</i> .....	97
3. <i>Inactivation du gène axyZ</i> .....	99
4. <i>Etude d'un mutant d'AXX-A hautement résistant aux aminosides</i> .....	100
5. <i>Détection d'axyY et d'oprZ chez 36 souches d'Achromobacter</i> .....	100
V. SYSTEME AXYCDJ.....	103
1. <i>Caractérisation génétique de l'opéron axyCDJ</i> .....	103
2. <i>Inactivation du gène axyD</i> .....	103

<b>DISCUSSION .....</b>	<b>106</b>
I. COMPARAISON DES SYSTEMES D'EFFLUX RND DECRITS DANS CE TRAVAIL A CEUX D'AUTRES ESPECES DE BGN-NF .....	107
1. <i>Comparaison des systèmes RND d'A. xylosoxidans à ceux de P. aeruginosa</i> .....	107
2. <i>Comparaison des systèmes RND d'A. xylosoxidans à ceux d'autres BGN-NF</i> .....	108
II. REGULATION DE L'EXPRESSION DES SYSTEMES D'EFFLUX ETUDIES.....	109
III. ROLE DES 3 SYSTEMES D'EFFLUX ETUDIES DANS LA RESISTANCE ACQUISE D'A. XYLOSOXIDANS AUX CARBAPENEMES .....	111
IV. AUTRES SYSTEMES D'EFFLUX CHEZ A. XYLOSOXIDANS .....	112
V. RESISTANCE ACQUISE D'A. XYLOSOXIDANS AUX ANTIBIOTIQUES CHEZ LES PATIENTS ATTEINTS DE MUCOVISCIDOSE.....	114
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>115</b>
<b>ANNEXE 1 : CLASSIFICATION DES ANTIBIOTIQUES .....</b>	<b>119</b>
<b>ANNEXE 2 : AMORCES UTILISEES .....</b>	<b>122</b>
<b>ANNEXE 3 : TABLEAUX DE CMI.....</b>	<b>125</b>
<b>ANNEXE 4 : ARTICLE 1 .....</b>	<b>129</b>
<b>ANNEXE 5 : ARTICLE 2 .....</b>	<b>130</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>131</b>



# LISTE DES FIGURES

Figure 1. Culture d'une souche d' <i>A. xylosoxidans</i> sur milieu gélosé Mueller-Hinton.....	13
Figure 2. Prévalence des principales espèces bactériennes isolées chez les patients atteints de mucoviscidose, par tranches d'âge, aux Etats-Unis en 2011 .....	16
Figure 3. Antibiogramme d'une souche sauvage d' <i>A. xylosoxidans</i> .....	18
Figure 4. Représentation schématique des 4 grands types de mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques.....	21
Figure 5. Sources d'énergie utilisées par les transporteurs d'efflux.....	23
Figure 6. Les 5 familles de transporteurs d'efflux bactériens : ABC, MFS, MATE, SMR et RND. ....	24
Figure 7. Structure d'un transporteur ABC.....	25
Figure 8. Structure d'un transporteur SMR.....	26
Figure 9. Structure d'un transporteur MFS à 12 TMS .....	27
Figure 10. Système d'efflux tripartite (RND) d'une bactérie à Gram négatif.....	29
Figure 11. Organisation en opéron des 3 gènes codant pour un système d'efflux RND.....	30
Figure 12. Structure d'un transporteur RND.....	31
Figure 13. Structure d'un trimère d'AcrB .....	32
Figure 14. Structure d'un trimère de TolC (OMF).....	33
Figure 15. Structure de MexA.....	34
Figure 16. Assemblage tripartite d'un système d'efflux RND.....	35
Figure 17. Modèle d'efflux rotatif du transporteur RND AcrB .....	37
Figure 18. Association de transporteurs chez <i>Escherichia coli</i> .....	38
Figure 19. Les 12 opérons d'efflux RND de <i>P. aeruginosa</i> .....	44
Figure 20. Co-régulation de l'expression d' <i>oprD</i> avec 3 opérons d'efflux différents chez <i>P. aeruginosa</i> . .....	50
Figure 21. Développement de <i>P. aeruginosa</i> dans le micro-environnement hypoxique constitué par les sécrétions muco-purulentes bronchiques au cours de la mucoviscidose .....	51
Figure 22. Principe de la marche sur le chromosome en 2 étapes.....	74
Figure 23. Recombinaison entre le plasmide suicide et le chromosome bactérien. ....	77
Figure 24. Inactivation génique par délétion.....	80
Figure 25. PCR consensus, séquençage du produit de PCR et alignement BLAST. ....	86
Figure 26. Opéron d'efflux <i>axyABM</i> .....	87
Figure 27. Antibiogrammes d'AXX-A et d'AXX-A-ΔB (diffusion en milieu gélosé MH). ....	89
Figure 28. Opéron d'efflux <i>axyXY-oprZ</i> .....	96
Figure 29. Antibiogrammes d'AXX-A et d'AXX-A-ΔY (diffusion en milieu gélosé MH). ....	98
Figure 30. Présence/absence de l'opéron <i>axyXY-oprZ</i> selon les souches d' <i>Achromobacter</i> .....	101
Figure 31. Opéron d'efflux <i>axyCDJ</i> .....	103
Figure 32. Position taxonomique de différents genres bactériens par rapport au genre <i>Achromobacter</i> . .....	108

# LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Résistance aux antibiotiques des souches d' <i>A. xylosoxidans</i> isolées au laboratoire de bactériologie du CHU de Dijon en 2007 et en 2012 (pourcentages) .....	19
Tableau 2. Les 12 systèmes d'efflux RND de <i>P. aeruginosa</i> .....	45
Tableau 3. Systèmes RND chez les BGN-NF d'intérêt médical (hors <i>P. aeruginosa</i> ).....	53
Tableau 4. Souches utilisées (inactivations géniques).....	64
Tableau 5. Plasmides utilisés.....	66
Tableau 6. CMI (mg/l) mesurées par 2 méthodes différentes .....	67
Tableau 7. Diamètres des zones d'inhibition (mm) autour de disques d'antibiotiques en l'absence et en présence de réserpine (souche AXX-A).....	84
Tableau 8. Diamètres des zones d'inhibition (mm) autour de disques d'antibiotiques en l'absence et en présence d'oméprazole (souche AXX-A).....	84
Tableau 9. Résultats obtenus par RT-PCR quantitative pour le gène cible <i>axyB</i> .....	93
Tableau 10. Gènes candidats de transporteurs RND dans le génome d'AXX-A .....	94
Tableau 11. PCR <i>axyY</i> et <i>oprZ</i> réalisées sur 36 souches d' <i>Achromobacter</i> .....	102
Tableau 12. Antibiotiques substrats des 3 systèmes d'efflux étudiés.....	105
Tableau 13. Comparaison des profils de substrats d'AxyABM et d'AxyXY-OprZ avec leurs homologues de <i>P. aeruginosa</i> .....	107

# LISTE DES ABREVIATIONS

**ABC** : ATB-Binding Cassette  
**ADN** : Acide Désoxyribonucléique  
**ADNc** : ADN complémentaire  
**AIA** : Alcool Isoamylique  
**ARN** : Acide Ribonucléique  
**ARNm** : ARN messenger  
**ATP** : Adénosine Triphosphate  
**BGN** : Bacille à Gram Négatif  
**BGN-NF** : BGN Non Fermentaire  
**BPCO** : Bronchopneumopathie Chronique Obstructive  
**BSA** : Bovine Serum Albumin  
**CA-SFM** : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie  
**CCCP** : Carbonyl Cyanide-m-Chlorophenylhydrazone  
**CIP** : Collection de l'Institut Pasteur  
**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice  
**CRCM** : Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose  
**ddNTP** : didésoxyribonucléotide triphosphate  
**DMT** : Drug/Metabolite Transporters  
**dNTP** : désoxyribonucléotide triphosphate  
**DSMZ** : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen  
**EDTA** : Ethylenediaminetetraacetic Acid  
**EPI** : Efflux Pump Inhibitor  
**EPPI** : Eau Pour Préparation Injectable  
**HME-RND** : Heavy Metal Efflux-RND  
**IM** : Inner Membrane  
**kb** : kilobase  
**LB** : Luria Bertani  
**LPS** : Lipopolysaccharide  
**LTTR** : LysR-Type Transcriptional Regulator  
**MATE** : Multidrug an Toxic-compound Extrusion  
**MDR** : Multidrug Resistance  
**MFP** : Membrane Fusion Protein  
**MFS** : Major Facilitator Superfamily  
**MH** : Mueller-Hinton

**OM** : Outer Membrane  
**OMF** : Outer Membrane Factor  
**ORF** : Open Reading Frame  
**PABN** : Phénylalanine Arginine  $\beta$ -Naphthylamide  
**pb** : paire de bases  
**PCR** : Polymerase Chain Reaction  
**PLP** : Protéine Liant la Pénicilline  
**PMF** : Proton Motive Force  
**RND** : Resistance-Nodulation-cell Division  
**RT-PCR** : Reverse Transcription PCR  
**SDS** : Sodium Dodecyl Sulfate  
**SMR** : Small Multidrug Resistance  
**TAE** : Tris Acétate EDTA  
**TMS** : Transmembrane Segment

# INTRODUCTION

---

*Achromobacter xylosoxidans* est un bacille à Gram négatif non fermentaire (BGN-NF), considéré comme pathogène opportuniste. C'est aussi un pathogène respiratoire émergent chez les patients atteints de mucoviscidose : sa fréquence d'isolement dans les expectorations est en augmentation depuis une dizaine d'années (Amoureux *et al.*, 2013; De Baets *et al.*, 2007; Conway *et al.*, 2003; Emerson *et al.*, 2010; Raso *et al.*, 2008; Razvi *et al.*, 2009; Saiman and Siegel, 2004). Les raisons de cette émergence sont inconnues. Bien que son pouvoir pathogène dans la mucoviscidose ait été peu étudié, des données récentes montrent qu'*A. xylosoxidans* peut être à l'origine d'un niveau d'inflammation pulmonaire équivalent à celui observé avec *Pseudomonas aeruginosa* (Hansen *et al.*, 2010), et pourrait par conséquent être responsable d'une altération de la fonction respiratoire.

*A. xylosoxidans* est une espèce bactérienne naturellement résistante à de nombreux antibiotiques : aux céphalosporines (hors ceftazidime), à l'aztréonam et aux aminosides (Aisenberg *et al.*, 2004; Almuzara *et al.*, 2010; Bizet *et al.*, 1989; Glupczynski *et al.*, 1988; Igra-Siegman *et al.*, 1980; Sader and Jones, 2005; Saiman *et al.*, 2001). De plus, les résistances acquises sont fréquentes, notamment dans la mucoviscidose (Amoureux *et al.*, 2013; Lambiase *et al.*, 2006; Magni *et al.*, 2007; Saiman *et al.*, 2001, 2002). Elles concernent des molécules souvent utilisées pour traiter les exacerbations de la maladie, ce qui conduit parfois à de véritables impasses thérapeutiques. La résistance d'*A. xylosoxidans* aux antibiotiques suscite beaucoup d'interrogations chez les bactériologistes et chez les cliniciens. Aucun mécanisme impliqué dans la multi-résistance naturelle de cette espèce bactérienne n'était décrit au début de notre travail.

L'antibio-résistance des bactéries peut être la conséquence de mécanismes d'inactivation enzymatique de l'antibiotique, de modification ou de protection de la cible de l'antibiotique, d'imperméabilité, ou d'efflux actif. L'observation des phénotypes de résistance des souches cliniques d'*A. xylosoxidans* ainsi que nos connaissances actuelles concernant l'antibio-résistance des BGN-NF nous ont conduits vers la recherche de systèmes d'efflux dans cette espèce bactérienne. L'efflux actif, également impliqué dans différentes fonctions métaboliques, permet de limiter l'accumulation des antibiotiques substrats en les exportant activement en dehors de la cellule bactérienne (Alvarez-Ortega *et al.*, 2013; Borges-Walmsley *et al.*, 2003). L'élément responsable de ce transport est une protéine enchassée dans la membrane cytoplasmique et appelée « transporteur » ou « pompe » d'efflux. Les transporteurs d'efflux sont regroupés en 5 familles. Ceux de la famille Resistance-Nodulation-cell Division

(RND), codés par des gènes chromosomiques, participent très fréquemment à la résistance des bacilles à Gram négatif aux antibiotiques.

Nos objectifs étaient donc de détecter dans le génome d'*A. xylooxidans* des gènes candidats pouvant coder pour des systèmes d'efflux RND et d'étudier leur implication dans la résistance naturelle de la bactérie aux antibiotiques.

# SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

---



## I. *Achromobacter xylosoxidans*

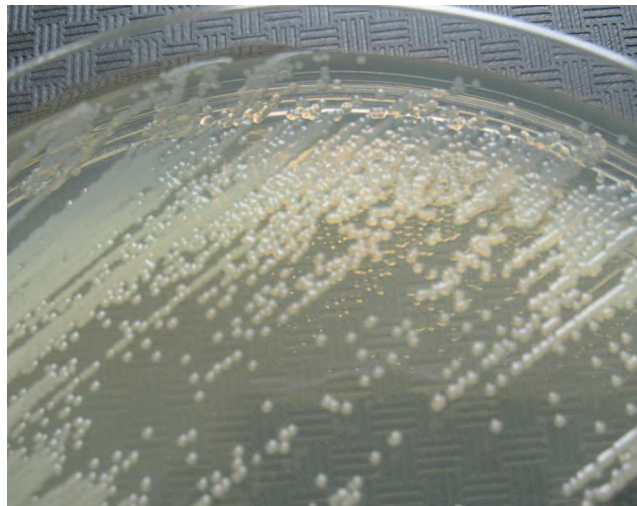
### 1. Généralités

#### a. Taxonomie

*Achromobacter xylosoxidans* a été isolé pour la première fois dans un prélèvement d'otorrhée et décrit en 1971 par Yabuuchi et Oyama (Yabuuchi and Oyama, 1971). Depuis, plusieurs remaniements taxonomiques ont eu lieu, avec pour conséquence des modifications de nomenclature. *A. xylosoxidans* a d'abord été reclassé dans le genre *Alcaligenes* et renommé successivement *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxidans*, *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* et *Alcaligenes xylosoxidans* (Vandamme *et al.*, 1996). Le genre *Achromobacter* a été de nouveau proposé en 1998, l'espèce *xylosoxidans* englobant 2 sous-espèces : *xylosoxidans* et *denitrificans* (Yabuuchi *et al.*, 1998). *A. xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* est le nom scientifique validé en 1998 dans l'International Journal of Systematic Bacteriology et toujours utilisé dans les collections de souches bactériennes telles que la Collection de l'Institut Pasteur (CIP) ou la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Cependant, depuis 2003, *A. xylosoxidans* subsp. *denitrificans* a été renommé *A. denitrificans* (Coenye *et al.*, 2003). Certains taxonomistes considèrent donc qu'*A. xylosoxidans* constitue également une espèce à part entière. C'est sous le nom d'*A. xylosoxidans* que la bactérie est désormais citée dans la littérature. *A. xylosoxidans* fait partie de l'ordre des *Burkholderiales* et de la famille des *Alcaligenaceae*. *A. xylosoxidans* représente à ce jour une des 7 espèces du genre *Achromobacter* avec *A. denitrificans*, *A. piechaudii*, *A. spanius*, *A. ruhlandii*, *A. insolitus* et *A. marplatensis* (Ridderberg *et al.*, 2012; Euzeby <http://www.bacterio.cict.fr/a/achromobacter.html>). Le génome complet d'*A. xylosoxidans* a été séquencé et publié pour la première fois en novembre 2010. Il s'agit du génome de la souche d'*A. xylosoxidans* A8 (numéro d'accèsion GenBank NC\_014640, Strnad *et al.*, 2011) qui comprend un chromosome d'environ 7 millions de paires de bases dans lequel ont été détectés 6459 cadres de lecture ouverts (ou ORFs), et 2 plasmides, pA81 (98 kilobases) déjà séquencé en 2008 (Jencova *et al.*, 2008) et pA82 (248 kilobases). Le contenu en GC est élevé (66%).

## b. Caractères cultureux et biochimiques

*A. xylooxidans* est un bacille à Gram négatif non fermentaire (BGN-NF), aérobic strict, mobile grâce à une ciliature péritriche dégénérée et cultivant sur milieu ordinaire (Igra-Siegman *et al.*, 1980). Sa croissance sur milieu gélosé nécessite 24 à 48 heures selon les souches. Il forme alors de petites colonies lisses non pigmentées (Figure 1) et sans odeur caractéristique. *A. xylooxidans* cultive également sur les milieux gélosés sélectifs des bacilles à Gram négatif dont le milieu de Drigalski et les milieux contenant du cétrimide (un ammonium quaternaire) (Holmes *et al.*, 1977; Newman *et al.*, 1984) couramment utilisés pour la culture sélective de *Pseudomonas aeruginosa*.



**Figure 1.** Culture d'une souche d'*A. xylooxidans* sur milieu gélosé Mueller-Hinton.

Ses principales caractéristiques biochimiques sont les suivantes : catalase et oxydase positives, assimilation du glucose et du xylose, réduction des nitrates en nitrites, absence d'uréase, de tryptophanase, d'arginine dihydrolase et de  $\beta$ -glucosidase.

*A. xylooxidans* partage beaucoup de caractères phénotypiques communs avec *P. aeruginosa* : bacille à Gram négatif ne fermentant pas les sucres (BGN-NF), aérobic strict, mobile, cultivant sur gélose au cétrimide et oxydase positive. Or *P. aeruginosa* est le BGN-NF le plus souvent isolé des prélèvements respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. Ceci

expliquerait les erreurs d'identification entre *A. xylosoxidans* et *P. aeruginosa* rapportées dans la littérature (Kidd *et al.*, 2009; Saiman *et al.*, 2001). Kidd et ses collaborateurs ont étudié 2267 souches bactériennes isolées d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose et identifiées comme *P. aeruginosa* par 17 laboratoires australiens (Kidd *et al.*, 2009). Ils montrent que c'est l'espèce *A. xylosoxidans* qui est la plus fréquemment confondue avec *P. aeruginosa*. Les souches de *P. aeruginosa* des patients atteints de mucoviscidose présentent souvent des caractères atypiques (Ex. croissance lente, perte de la production de pigment) et les auteurs expliquent que la plupart des laboratoires se basent essentiellement sur quelques caractères phénotypiques pour l'identification. Lors d'un contrôle de qualité européen, la souche d'*A. xylosoxidans* proposée n'a été correctement identifiées que par 35% des laboratoires participants (Hogardt *et al.*, 2009). Ces erreurs d'identification conduisent donc probablement à une sous-estimation de la prévalence des infections à *A. xylosoxidans*, en particulier dans la mucoviscidose.

### c. Habitat

Différentes sources de contamination ont été identifiées en milieu hospitalier telles que des solutions antiseptiques (Molina-Cabrillana *et al.*, 2007; Shigeta *et al.*, 1978; Siebor *et al.*, 2007), de l'eau pour hémodialyse (Reverdy *et al.*, 1984) ou des nébuliseurs (Cheron *et al.*, 1994). *A. xylosoxidans* a aussi été isolé à partir de l'environnement extra-hospitalier : dans l'eau d'un puits d'une patiente immunodéprimée présentant une bactériémie à *A. xylosoxidans* (Spear *et al.*, 1988), dans le biofilm d'une piscine (Holmes *et al.*, 1977), en rivière (Wu *et al.*, 2009) ou encore dans des racines de plantes de sols humides (Ho *et al.*, 2012). Il pourrait donc s'agir d'une bactérie ubiquitaire associée à l'environnement hydrique. La présence de la bactérie a également été rapportée dans des environnements pollués (Buckova *et al.*, 2010; Strnad *et al.*, 2011). Mais le réservoir de la bactérie reste encore inconnu.

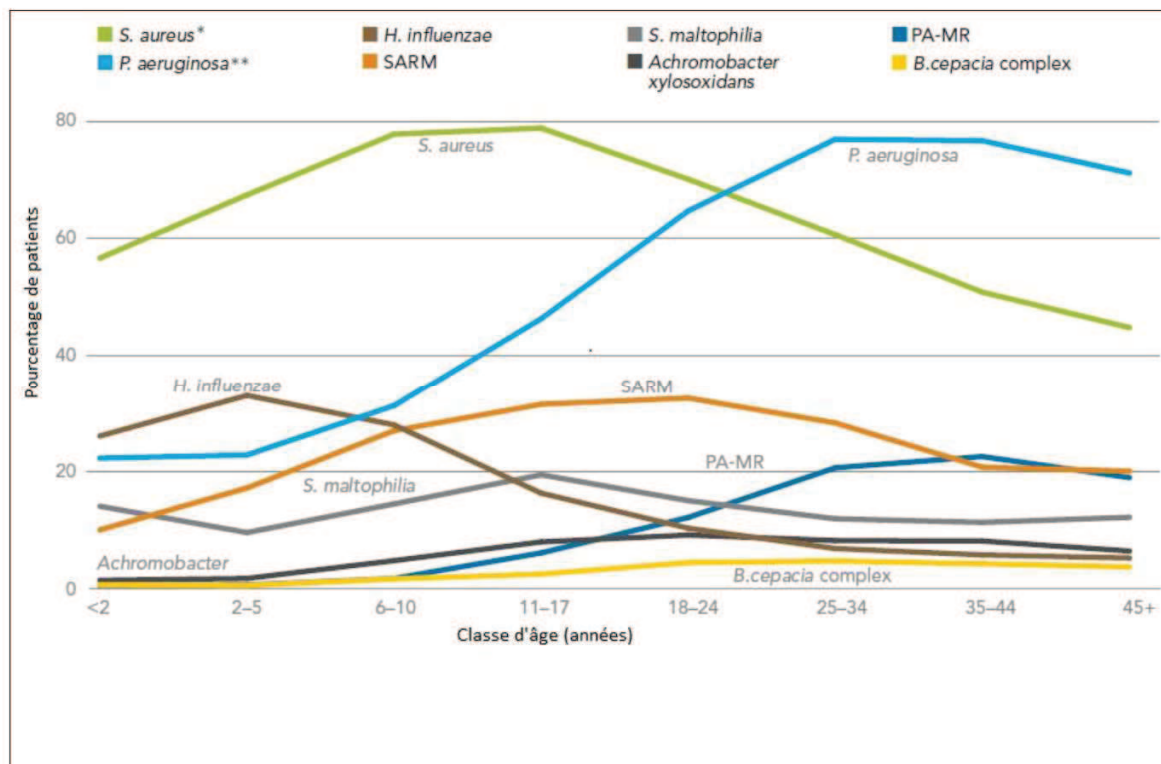
## 2. Pouvoir pathogène

### a. Hors mucoviscidose

*A. xylosoxidans* se comporte comme un agent pathogène opportuniste puisque responsable dans la majorité des cas d'infections chez des patients immunodéprimés (Aisenberg *et al.*, 2004; Atalay *et al.*, 2012; Duggan *et al.*, 1996; Gómez-Cerezo *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2012; Tena *et al.*, 2008). Les infections rapportées dans la littérature sont diverses. Il s'agit notamment de bactériémies (Aisenberg *et al.*, 2004; Gómez-Cerezo *et al.*, 2003), d'infections urinaires (Tena *et al.*, 2008), d'osteomyélites (Ozer *et al.*, 2012), de conjonctivites (Oh *et al.*, 2005) ou encore d'endocardites (Derber *et al.*, 2011).

### b. Chez les patients atteints de mucoviscidose

Les patients atteints de mucoviscidose sont fréquemment colonisés au niveau des voies respiratoires par *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae* (Saiman and Siegel, 2004) (Figure 2, p16). Certains BGN-NF autres que *P. aeruginosa* sont aussi régulièrement retrouvés : *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* complex et *Achromobacter xylosoxidans*. *A. xylosoxidans* est considéré comme émergent chez les patients atteints de mucoviscidose. En effet, au cours de la dernière décennie, une augmentation de sa fréquence d'isolement dans les voies respiratoires a été constatée par de nombreuses équipes européennes et américaines (Amoureux *et al.*, 2013; De Baets *et al.*, 2007; Conway *et al.*, 2003; Emerson *et al.*, 2010; Raso *et al.*, 2008; Razvi *et al.*, 2009; Saiman and Siegel, 2004). Les raisons de cette émergence sont encore inconnues. Le registre français de la mucoviscidose rapporte qu'en 2010, 4,4% des patients suivis par les Centres de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose (CRCM) ont eu au moins une culture positive à *A. xylosoxidans* dans l'année, contre 2,7% en 2001. Ce pourcentage est cependant très variable selon les centres. Au CHU de Dijon, sur 120 patients (adultes et enfants) actuellement suivis au CRCM, 21 (17,5%) ont déjà eu au moins une culture positive à *A. xylosoxidans* (Amoureux *et al.*, 2013). Ce chiffre est comparable à celui rapporté par l'équipe brésilienne de Marques (Pereira *et al.*, 2011).



**Figure 2.** Prévalence des principales espèces bactériennes isolées chez les patients atteints de mucoviscidose, par tranches d'âge, aux Etats-Unis en 2011 (d'après Cystic Fibrosis Foundation, modifié par Blondeau L., laboratoire de bactériologie du CHU de Dijon). **SARM** : *S. aureus* résistant à la méticilline ; **PA-MR** : *P. aeruginosa* multi-résistant.

La colonisation de l'arbre bronchique par *A. xylosoxidans* survient à tout âge contrairement à ce qui est observé avec *P. aeruginosa*. Cette colonisation peut être sporadique, intermittente ou chronique (De Baets *et al.*, 2007; Lambiase *et al.*, 2011). En cas de passage à la chronicité, c'est généralement le même clone qui persiste plusieurs années (Lambiase *et al.*, 2011; Ridderberg *et al.*, 2011). Dans la plupart des cas les patients sont co-colonisés avec un ou plusieurs autres pathogènes (Lambiase *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2011).

Le mode de contamination des patients est inconnu. Les études génotypiques montrent que, la plupart du temps, chaque patient est colonisé avec une souche différente de celles des autres patients. Les transmissions croisées sont rares en dehors des transmissions au sein des fratries (Amoureux *et al.*, 2012). Mais certaines études montrent que des patients peuvent être colonisés par des souches de même génotype, suggérant ainsi la possibilité d'une transmission croisée directe ou bien à partir d'une source de contamination environnementale commune (Ridderberg *et al.*, 2011; Ridderberg *et al.*, 2012).

La pathogénicité d'*A. xylosoxidans* au cours de la mucoviscidose a peu été étudiée. Certains auteurs rapportent que la présence de la bactérie est souvent associée à des exacerbations respiratoires de la maladie (Moissenet *et al.*, 1997; Saiman and Siegel, 2004). Mais les conséquences cliniques exactes de cette colonisation sont difficiles à évaluer car il existe peu de données à ce sujet. De plus, de nombreux patients sont colonisés de façon concomitante par *A. xylosoxidans* et par *P. aeruginosa*. L'implication de chacune de ces bactéries dans la détérioration de la fonction respiratoire devient alors difficile à évaluer. Quoi qu'il en soit, la présence d'*A. xylosoxidans* est régulièrement prise en compte pour adapter l'antibiothérapie dans la mucoviscidose (Parkins and Elborn, 2010; Waters, 2012). Récemment, il a été montré qu'*A. xylosoxidans* pouvait être responsable d'un niveau d'inflammation similaire à celui observé avec *P. aeruginosa* au cours de la maladie (Hansen *et al.*, 2010). Les facteurs de virulence sont encore inconnus mais la cytotoxicité de la bactérie a été récemment démontrée *in vitro* (Mantovani *et al.*, 2012).

### 3. Résistance aux antibiotiques

Les antibiotiques cités dans ce manuscrit sont répertoriés en annexe 1 (p 119) sous la forme d'une classification en familles et sous-familles de molécules.

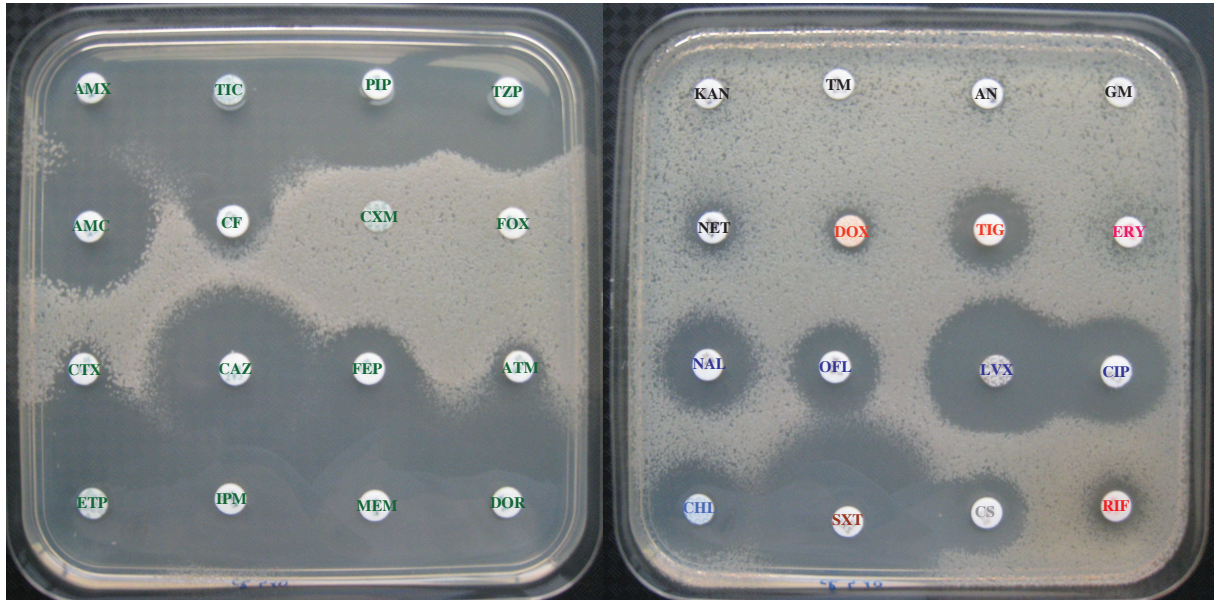
La résistance à un antibiotique est dite « naturelle » (ou « intrinsèque ») lorsqu'elle concerne toutes les souches d'une espèce bactérienne. A l'inverse, une résistance « acquise » ne concerne qu'une partie des souches de l'espèce. L'acquisition de résistance peut être la conséquence de mutations chromosomiques ou bien de l'acquisition de matériel génétique étranger.

#### a. Résistance naturelle

*A. xylosoxidans* est naturellement résistant à de nombreux antibiotiques : aux aminosides, à l'aztréonam et à la plupart des céphalosporines autres que la ceftazidime (Aisenberg *et al.*, 2004; Almuzara *et al.*, 2010; Bizet *et al.*, 1989; Glupczynski *et al.*, 1988; Igra-Siegmán *et al.*, 1980; Sader and Jones, 2005; Saiman *et al.*, 2001). L'érythromycine et les cyclines sont le plus souvent inactives (Figure 3, p 18).



Les pénicillines, la ceftazidime et les carbapénèmes sont les  $\beta$ -lactamines actives sur les souches sauvages d'*A. xylosoxidans*. La lévofloxacine et la ciprofloxacine sont les fluoroquinolones les plus efficaces (Sader and Jones, 2005).



**Figure 3.** Antibiogramme d'une souche sauvage d'*A. xylosoxidans*.

*AMC* : amoxicilline + acide clavulanique ; *AMX* : amoxicilline ; *AN* : amikacine ; *ATM* : aztréonam ; *CAZ* : ceftazidime ; *CF* : céfalotine ; *CHL* : chloramphénicol ; *CIP* : ciprofloxacine ; *CS* : colistine ; *CTX* : céfotaxime ; *CXM* : céfuroxime ; *DOR* : doripénème ; *DOX* : doxycycline ; *ERY* : érythromycine ; *ETP* : ertapénème ; *FEP* : céfépime ; *FOX* : céfoxitine ; *GM* : gentamicine ; *IPM* : imipénème ; *KAN* : kanamycine ; *LVX* : lévofloxacine ; *MEM* : méropénème ; *NAL* : acide nalidixique ; *NET* : nétilmicine ; *OFL* : ofloxacine ; *PIP* : pipéracilline ; *RIF* : rifampicine ; *SXT* : cotrimoxazole ; *TIC* : ticarcilline ; *TIG* : tigécycline ; *TM* : tobramycine ; *TZP* : pipéracilline + tazobactam.

*Une couleur par famille d'antibiotiques.*

#### b. Résistance acquise

Les résistances acquises sont très fréquentes dans les souches cliniques d'*A. xylosoxidans*. Plusieurs études de sensibilité aux antibiotiques indiquent que la pipéracilline associée au tazobactam et les carbapénèmes sont les molécules les plus fréquemment actives sur *A. xylosoxidans* (Almuzara *et al.*, 2010; Magni *et al.*, 2007; Sader and Jones, 2005; Saiman *et al.*, 2001).

Certains antibiotiques sont couramment utilisés pour le traitement des infections pulmonaires au cours de la mucoviscidose puisqu'actifs sur *P. aeruginosa*. Il s'agit en particulier de la ceftazidime, des carbapénèmes et de la ciprofloxacine. La résistance acquise à ces antibiotiques est fréquente chez *A. xylosoxidans* (Aisenberg *et al.*, 2004; Amoureux *et al.*, 2013; Lambiase *et al.*, 2006; Magni *et al.*, 2007; Saiman *et al.*, 2001, 2002; Tena *et al.*, 2008) :

- la ceftazidime est la plus active des céphalosporines sur *A. xylosoxidans* mais le pourcentage de souches résistantes varie de 8 à 66% selon les études,
- le pourcentage de souches résistantes à la ciprofloxacine est particulièrement élevé, de 45 à 98%,
- il est de 7 à 41% en ce qui concerne l'imipénème.

**Tableau 1. Résistance aux antibiotiques des souches d'*A. xylosoxidans* isolées au laboratoire de bactériologie du CHU de Dijon en 2007 et en 2012 (pourcentages).**

Antibiotique	Pourcentages de souches résistantes	
	2007 (n = 35)	2012 (n = 42)
Ticarcilline	14	17
Ticarcilline + acide clavulanique	3	14
Pipéracilline	6	7
Pipéracilline + tazobactam	6	7
Céfalotine	100	100
Céfoxitine	100	100
Céfotaxime	100	100
Ceftazidime	46	55
Céfépime	100	93
Aztréonam	100	100
Imipénème	6	17
Méropénème	18	36
Doripénème	NT	24
Tobramycine	100	100
Acide nalidixique	100	93
Ofloxacine	94	98
Ciprofloxacine	74	95
Doxycycline	82	85
Tigécycline	NT	71
Cotrimoxazole	41	52

NT : non testé.

Une seule souche par patient et par phénotype de résistance a été comptabilisée pour chacune des 2 années. Les souches ont été isolées de tout type de prélèvement, chez des patients atteints ou non de mucoviscidose.



Au CHU de Dijon les pourcentages de résistance des souches d'*A. xylosoxidans* sont conformes à ce qui est décrit dans la littérature (Tableau 1). Nous avons observé entre 2007 et 2012 une augmentation de la résistance qui concerne toutes les familles d'antibiotiques représentées.

### c. Mécanismes de résistance

*A. xylosoxidans* est donc une espèce bactérienne naturellement multi-résistante aux antibiotiques. Les mécanismes de cette multi-résistance étaient inconnus au début de ce travail.

Les seuls mécanismes alors décrits affectaient uniquement les bêta-lactamines et étaient de type enzymatique :

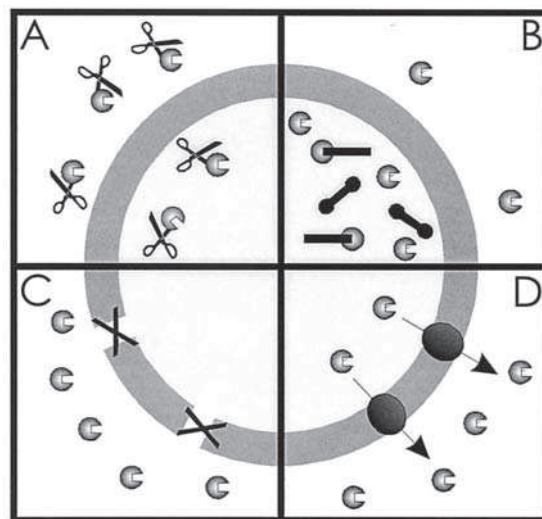
- l'oxacillinase constitutive OXA-114 (Doi *et al.*, 2008) dont la contribution à la résistance aux antibiotiques n'a jamais été démontrée,
- des enzymes acquises : une céphalosporinase plasmidique (Levesque and Roy, 1982), des métallo- $\beta$ -lactamases telles que VIM-1 (Ricchio *et al.*, 2001), VIM-2 (Sofianou *et al.*, 2005), IMP-1 (Shibata *et al.*, 2003), IMP-10 (Iyobe *et al.*, 2002) et IMP-19 (Yamamoto *et al.*, 2012) et une  $\beta$ -lactamase à spectre étendu de type VEB-1 (Neuwirth *et al.*, 2006).

De récents travaux ont montré qu'*A. xylosoxidans* pouvait héberger divers éléments génétiques mobiles porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques : plasmides, séquences d'insertion, intégrons et transposons. *A. xylosoxidans* est donc susceptible d'acquérir des résistances par transfert horizontal de gènes (Traglia *et al.*, 2012).

Mais le peu de connaissances au début de ce travail sur la nature des mécanismes de résistance d'*A. xylosoxidans* aux antibiotiques vient de l'absence de séquence génomique alors disponible dans cette espèce. En effet la résistance naturelle des bactéries aux antibiotiques est essentiellement liée à l'expression de gènes chromosomiques, en particulier lorsqu'il s'agit de modifications de cible, d'imperméabilité ou d'efflux actif. L'efflux actif est très répandu chez les bacilles à Gram négatif non fermentaires. Aucun mécanisme de ce type n'a jamais été rapporté chez *A. xylosoxidans*.

## II. Systèmes d'efflux bactériens et résistance aux antibiotiques

L'efflux actif est le dernier des 4 grands types de mécanismes de résistance aux antibiotiques à avoir été décrit après l'inactivation enzymatique de l'antibiotique, l'imperméabilité et la modification / protection de la cible de l'antibiotique (Figure 4). La première description d'un mécanisme d'efflux impliqué dans l'antibio-résistance bactérienne date de 1980 et concerne l'efflux actif de la tétracycline par *Escherichia coli* (McMurry *et al.*, 1980).



**Figure 4.** Représentation schématique des 4 grands types de mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques (Putman *et al.*, 2000).

*A* : inactivation enzymatique de l'antibiotique ; *B* : modification de la cible bactérienne ;

*C* : imperméabilité ; *D* : efflux actif.

Une première partie de généralités sur les transporteurs d'efflux bactériens permettra d'aborder :

- la classification des transporteurs d'efflux en 5 familles,
- la spécificité de substrats,
- les fonctions des systèmes d'efflux chez les bactéries,
- les principales molécules inhibitrices de ces transporteurs d'efflux.

Une seconde partie détaillera les systèmes d'efflux RND impliqués dans la résistance aux antibiotiques chez les BGN-NF. Les mécanismes de régulation seront abordés dans la partie décrivant les systèmes RND de *P. aeruginosa* qui est le BGN-NF dont la résistance aux antibiotiques par efflux a été la plus étudiée.

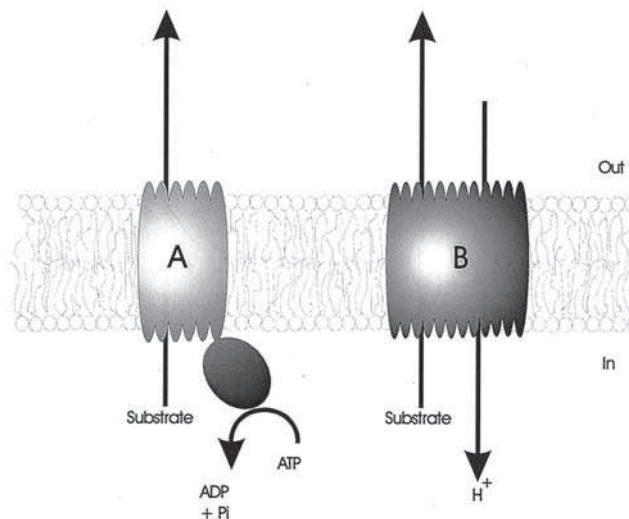
Enfin, nous présenterons les données de la littérature concernant l'efflux actif chez *A. xylooxidans*.

## 1. Généralités sur les systèmes d'efflux

Les systèmes d'efflux participent à l'homéostasie cellulaire en exportant notamment des molécules toxiques ou des déchets du métabolisme. Ils existent non seulement chez de nombreux micro-organismes mais aussi chez les eucaryotes pluricellulaires. Seuls les systèmes d'efflux bactériens seront décrits dans ce travail.

### a. Structure et classification des transporteurs d'efflux

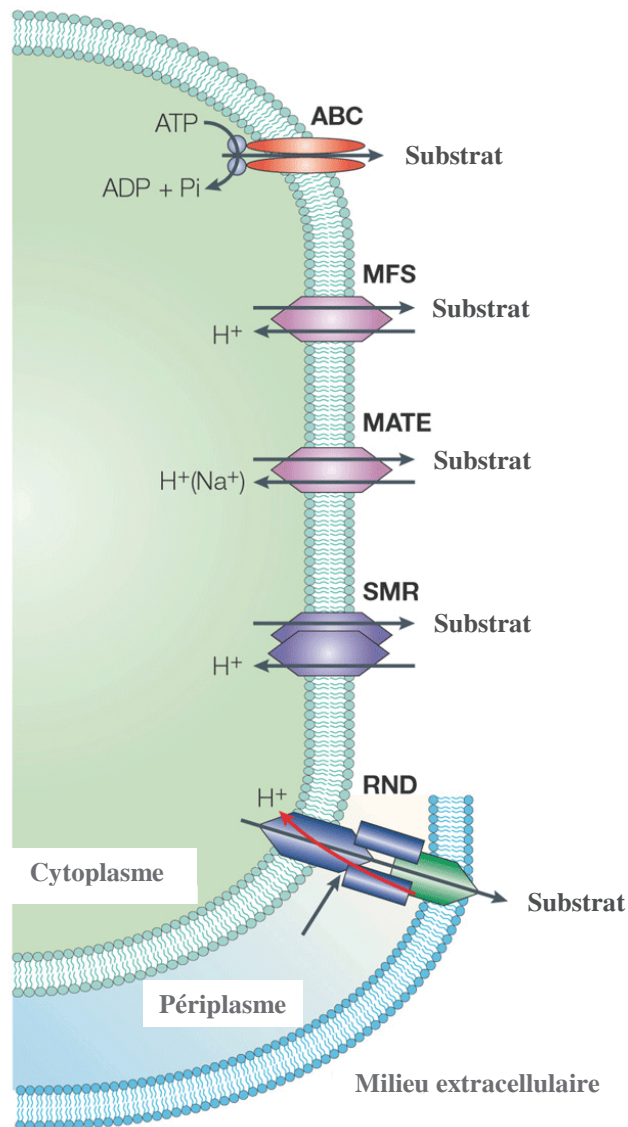
L'élément bactérien responsable d'efflux actif est appelé « transporteur » ou « pompe » d'efflux. C'est un constituant de nature protéique enchâssé dans la membrane cytoplasmique et capable de limiter l'accumulation de certaines molécules substrats en les exportant activement en dehors de la cellule bactérienne. Certains transporteurs utilisent comme source d'énergie l'hydrolyse d'adénosine triphosphate (ATP). D'autres, appelés « transporteurs secondaires », exportent leurs substrats contre un gradient de protons ou d'ions sodium (systèmes « antiport »). La dissipation de ce gradient électro-chimique est appelée « force proton motrice » (Figure 5).



**Figure 5.** Sources d'énergie utilisées par les transporteurs d'efflux (Putman *et al.*, 2000).

*A* : hydrolyse d'adénosine triphosphate (ATP) ; *B* : force proton motrice.

Les transporteurs d'efflux sont regroupés en 5 familles (Figure 6) selon la source d'énergie utilisée et selon des critères de taille et de structure protéique. Certaines bactéries possèdent des systèmes d'efflux de chacune des 5 familles (Ex. *E. coli*).



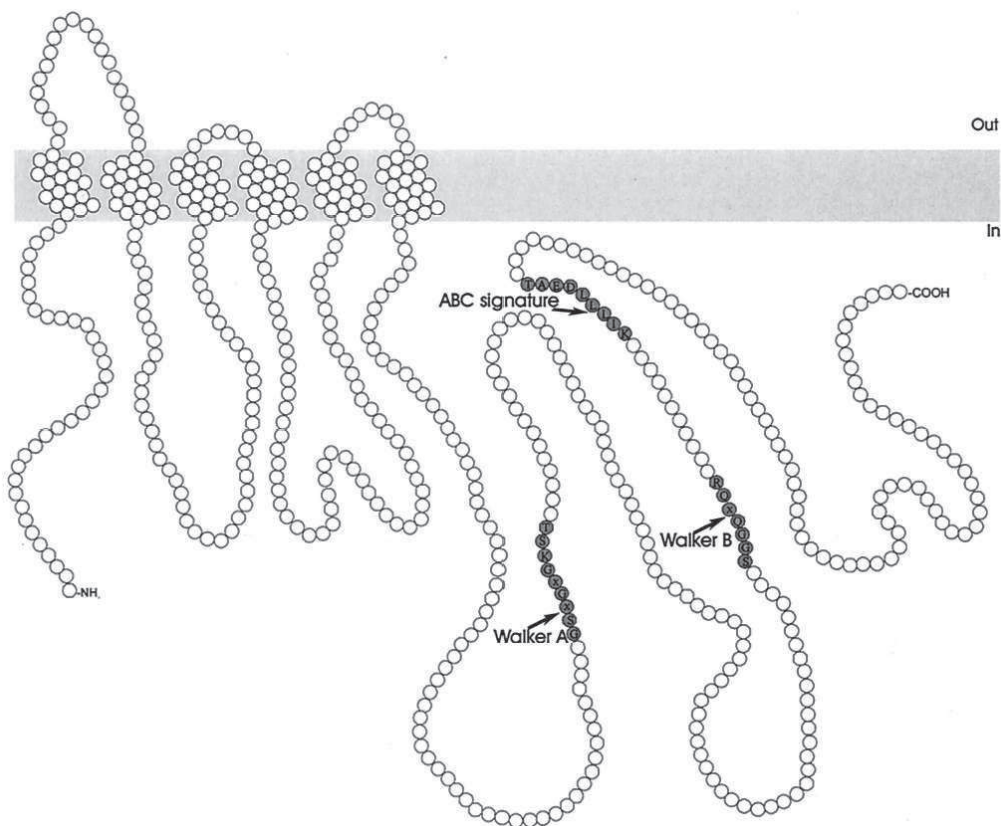
**Figure 6.** Les 5 familles de transporteurs d'efflux bactériens : ABC, MFS, MATE, SMR et RND (d'après Krulwich *et al.*, 2005).

*ABC* : ATP-Binding Cassette; *MATE* : Multidrug And Toxic-compound Extrusion; *MFS* : Major Facilitator Superfamily; *RND* : Resistance-Nodulation-cell Division; *SMR* : Small Multidrug Resistance.

## ⚡ La famille ATP-Binding Cassette (ABC)

C'est la seule famille de transporteurs utilisant l'énergie issue de l'hydrolyse d'ATP. Les transporteurs ABC sont couramment rencontrés dans le monde bactérien mais également très répandus chez les eucaryotes. Certains sont responsables de la résistance de cellules tumorales aux anticancéreux (Gottesman *et al.*, 1996; Umsumarng *et al.*, 2013).

Ce sont des protéines d'environ 600 acides aminés et constituées de 2 domaines (Figure 7). Un domaine hydrophobe, ancré dans la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire de 6 segments transmembranaires, contient les sites de reconnaissance et de transport du (ou des) substrat(s). Un domaine hydrophile intracellulaire contient des régions très conservées dont les motifs « Walker A » et « Walker B » impliqués dans la liaison à l'ATP, et un motif appelé « signature ABC » qui participerait à la transmission de signaux entre les 2 domaines. Ces protéines sont généralement assemblées en dimères voire en tétramères (Borges-Walmsley *et al.*, 2003; Putman *et al.*, 2000).

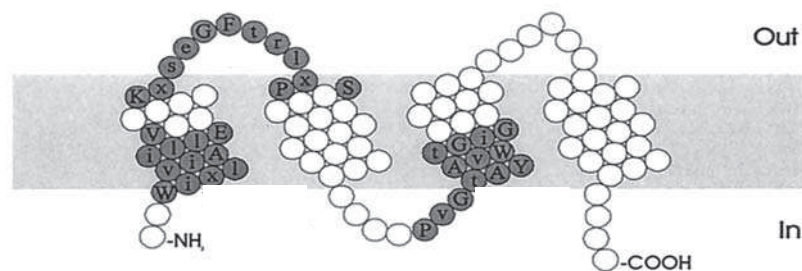


**Figure 7. Structure d'un transporteur ABC (Putman *et al.*, 2000).**

La plupart des transporteurs ABC ont une spécificité de substrat étroite. Certaines résistances bactériennes liées à ce type d'efflux sont observées en bactériologie médicale. C'est le cas de la résistance à la clindamycine et aux streptogramines A conférée par le transporteur Lsa d'*Enterococcus faecalis* (Dina *et al.*, 2003).

#### ⚡ La famille Small Multidrug Resistance (SMR)

Les transporteurs SMR constituent une sous-famille de la famille DMT (Drug/Metabolite Transporters). Il s'agit de petites protéines d'une centaine d'acides aminés et contenant 3 motifs conservés (Figure 8). Elles comportent 4 segments transmembranaires et fonctionnent principalement sous la forme d'homo ou d'hétéro-dimères (Li and Nikaido, 2009). Ces transporteurs sont décrits uniquement chez les procaryotes et exportent des cations lipophiles tels que les ammoniums quaternaires, ou encore certains antibiotiques (Bay *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2003a).



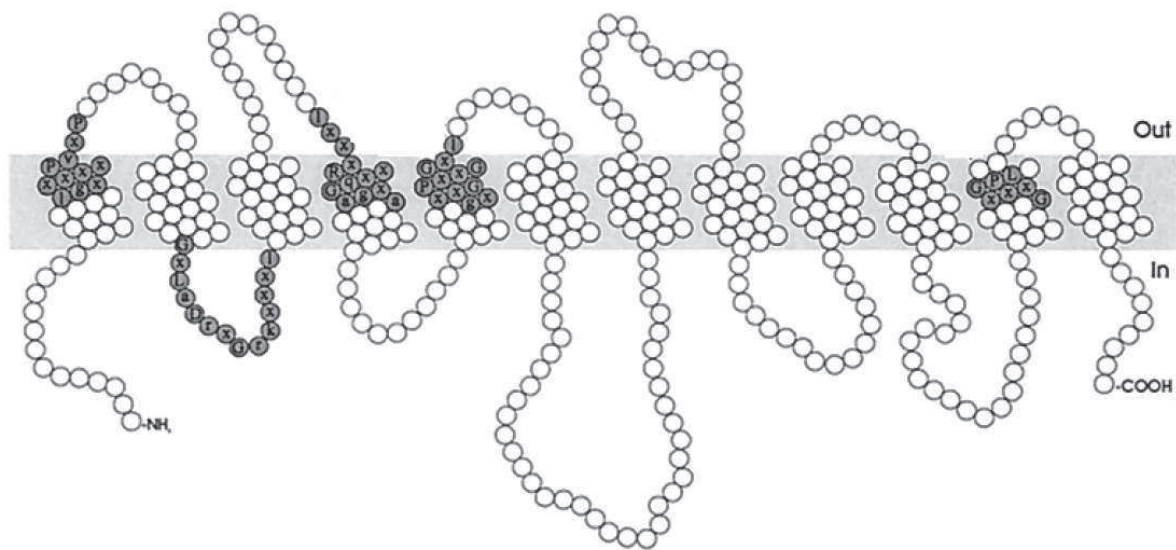
**Figure 8. Structure d'un transporteur SMR (Putman *et al.*, 2000).**

*Résidus colorés en gris : motifs conservés.*

#### ⚡ La famille Major Facilitator Superfamily (MFS)

C'est la famille qui comprend le plus grand nombre de pompes d'efflux actuellement connues. Les transporteurs sont constitués d'environ 400 acides aminés et sont divisés en 2 sous-familles selon le nombre de segments transmembranaires (TMS) : 12 et 14 TMS (Figure 9, p27).





**Figure 9.** Structure d'un transporteur MFS à 12 TMS (d'après Putman *et al.*, 2000).  
*Résidus colorés en gris : motifs conservés.*

Exemples de systèmes d'efflux MFS :

- Le groupe de transporteurs Tet a une spécificité de substrats étroite comprenant uniquement des cyclines. On les retrouve aussi bien chez des bactéries à Gram négatif (TetA) que chez des bactéries à Gram positif (TetK) ou bien encore chez des mycobactéries (TetV) (Poole, 2005; Viveiros *et al.*, 2003). Les gènes *tet* sont presque toujours portés par des éléments génétiques mobiles (Butaye *et al.*, 2003).
- NorA participe à la résistance aux fluoroquinolones chez *Staphylococcus aureus* (Ubukata *et al.*, 1989; Yoshida *et al.*, 1990) et peut aussi prendre en charge le chloramphénicol et la tétracycline (Neyfakh *et al.*, 1993).
- CmlA est un transporteur MFS décrit chez *P. aeruginosa*, codé par un gène plasmidique et capable d'exporter le chloramphénicol (Bissonnette *et al.*, 1991).
- Plus récemment, la pompe d'efflux QepA a été décrite chez *E. coli*. Elle exporte certaines fluoroquinolones utilisées en médecine vétérinaire (enrofloxacin) et humaine (norfloxacin et ciprofloxacin). Son support génétique est plasmidique (Yamane *et al.*, 2007).



#### ‡ La famille Multidrug And Toxic-compound Extrusion (MATE)

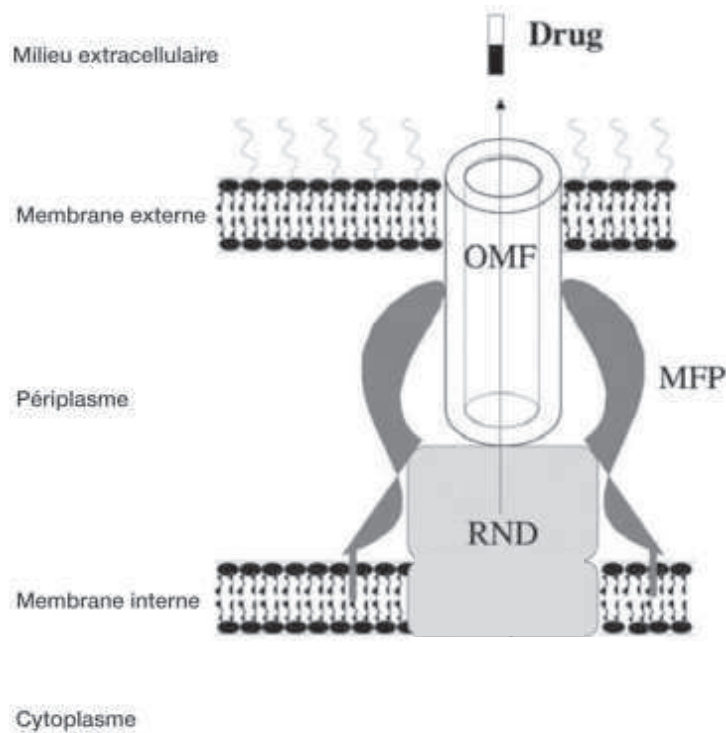
Les transporteurs MATE constituent une famille relativement hétérogène en ce qui concerne la taille (400 à 700 résidus) et le nombre de segments transmembranaires (12 à 13 TMS) (Burger *et al.*, 2011; Omote *et al.*, 2006).

NorM est le premier transporteur de cette famille à avoir été décrit chez *Vibrio parahaemolyticus* (Morita *et al.*, 1998). Malgré une taille et une structure similaires à celles des transporteurs MFS, NorM a été reconnu comme faisant partie d'une nouvelle famille du fait de l'absence d'homologie de séquence avec les membres de la famille MFS. NorM est un des transporteurs MATE fonctionnant en système antiport substrat/Na<sup>+</sup> (Brown *et al.*, 1999; Morita *et al.*, 2000). NorM et son homologue YdhE d'*E. coli* exportent des fluoroquinolones et des aminosides. Le transporteur PmpM de *P. aeruginosa* est capable d'exporter divers substrats dont des fluoroquinolones et des ammoniums quaternaires (He *et al.*, 2004). Les transporteurs MATE ont essentiellement été décrits chez des bactéries à Gram négatif mais il en existe aussi chez des bactéries à Gram positif (Ex. *Staphylococcus aureus*, Kaatz *et al.*, 2005) et chez des organismes eucaryotes (Li and Nikaido, 2009; Otsuka *et al.*, 2005).

#### ‡ La famille Resistance-Nodulation-cell Division (RND)

La plupart des systèmes d'efflux impliqués dans la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif appartiennent à la famille RND. Ils sont capables d'exporter des molécules de structures très différentes, ce qui leur confère une très large spécificité de substrats et la particularité de pouvoir entraîner des résistances multiples aux antibiotiques (Multidrug Resistance, MDR).

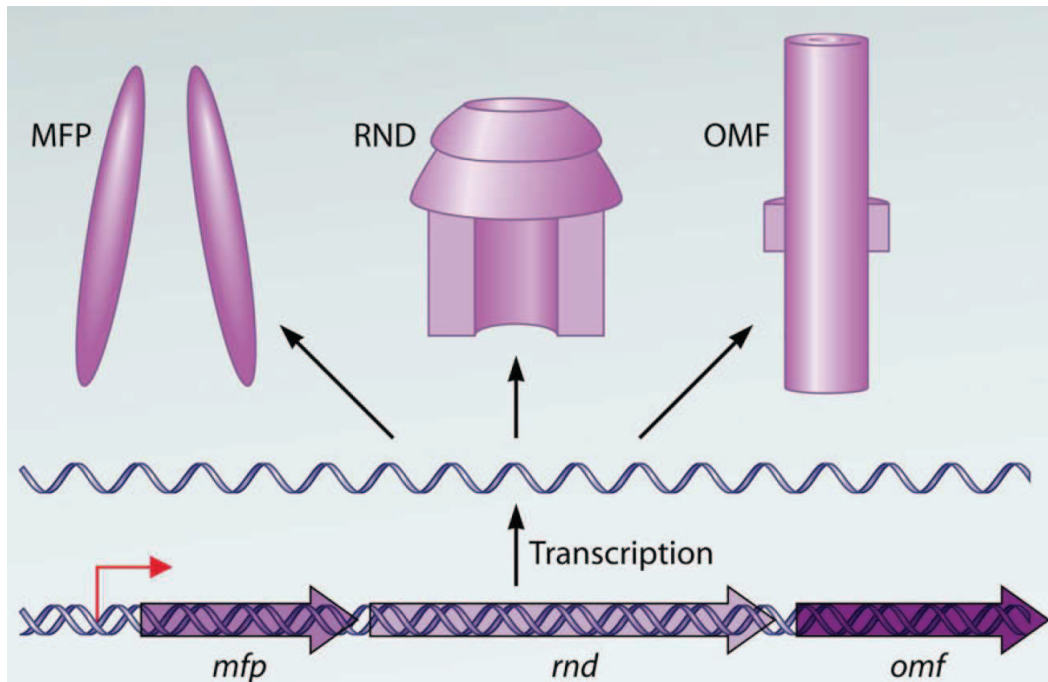
Les transporteurs RND fonctionnent en association avec 2 autres constituants protéiques : une protéine de fusion membranaire intervenant au niveau périplasmique (MFP, Membrane Fusion Protein) et une protéine de membrane externe (OMF, Outer Membrane Factor) (Figure 10, p 29).



**Figure 10.** Système d'efflux tripartite (RND) d'une bactérie à Gram négatif (d'après Pagès *et al.*, 2011).

*RND* : Resistance-Nodulation-cell Division ; *MFP* : Membrane Fusion Protein ;  
*OMF* : Outer Membrane Factor.

Classiquement, les 3 parties des systèmes d'efflux RND sont codées par des gènes regroupés en opéron sur le chromosome bactérien (Figure 11, p 30). Les gènes des systèmes d'efflux RND sont donc chromosomiques. Mais il arrive qu'ils soient portés par des plasmides, comme par exemple *oqxAB* (Hansen *et al.*, 2004).



**Figure 11.** Organisation en opéron des 3 gènes codant pour un système d'efflux RND (d'après Lister *et al.*, 2009).

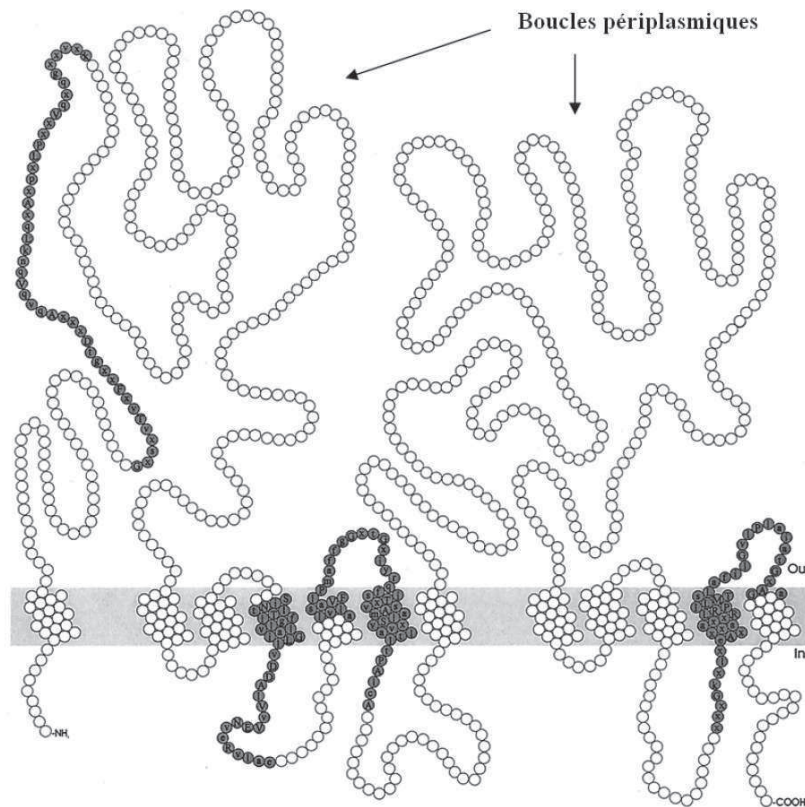
Dans certains cas, le gène codant pour l'OMF n'est pas localisé sur le même opéron que les 2 autres gènes.

Pour le fonctionnement des systèmes d'efflux RND tripartites, la participation de chacun de ces 3 constituants est indispensable (Nikaido, 2011). Cet assemblage tripartite rend ces systèmes plus efficaces que les transporteurs seuls qui exportent leurs substrats dans le périplasma, d'où ils peuvent rediffuser rapidement à travers la membrane cytoplasmique dans la cellule bactérienne.

Les bactéries à Gram négatif résistent naturellement aux macrolides et aux  $\beta$ -lactamines lipophiles (pénicilline G, pénicillines M) à cause d'une mauvaise diffusion de ces molécules à travers la membrane externe. Mais il a été montré que les systèmes RND jouent aussi un rôle important dans cette résistance. L'inactivation d'*acrAB* chez *Salmonella* Typhimurium restaure même la sensibilité à la pénicilline G (Nikaido *et al.*, 1998).

## ❖ Le transporteur RND

Il est constitué de protéines d'environ 1000 acides aminés organisés en 12 TMS et 2 larges boucles périplasmiques (entre les TMS 1 et 2, et les TMS 7 et 8) (Figure 12). Une des boucles périplasmiques du transporteur se prolonge jusqu'à l'OMF (Tamura *et al.*, 2005).



**Figure 12.** Structure d'un transporteur RND (d'après Putman *et al.*, 2000).

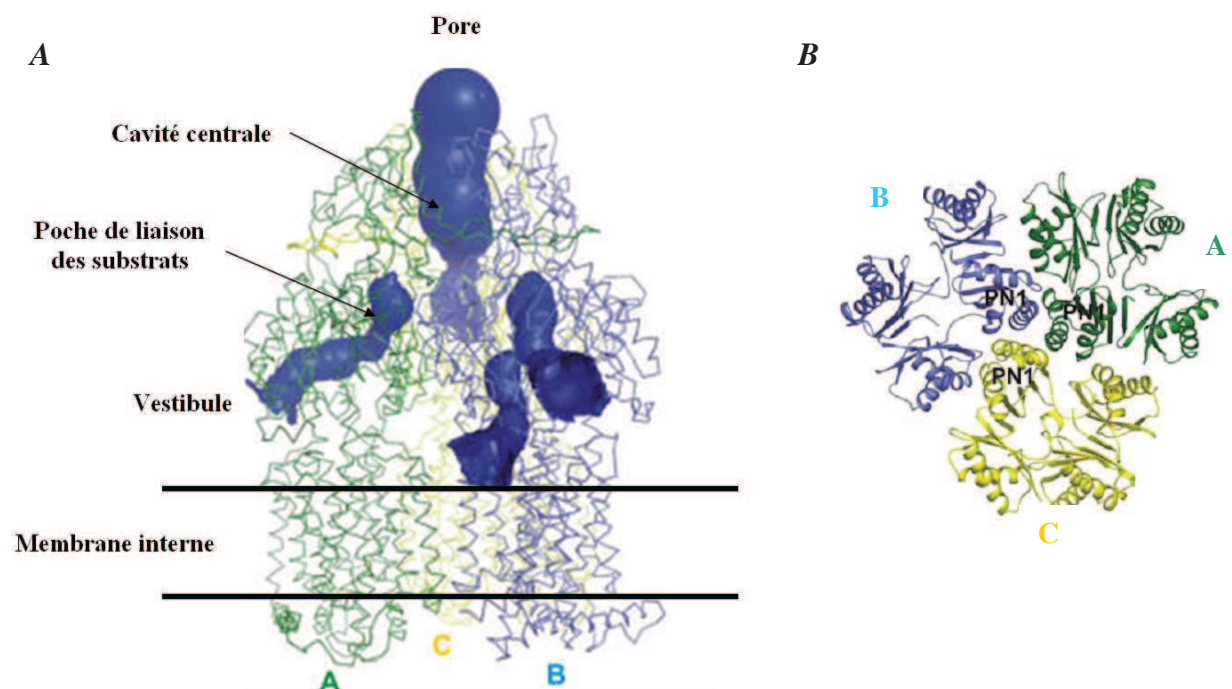
*Résidus colorés en gris : motifs conservés.*

C'est la partie périplasmique du transporteur qui est impliquée dans la reconnaissance des substrats. Si les boucles périplasmiques de 2 transporteurs différents sont interverties la spécificité de substrat se retrouve modifiée, ce qui n'est pas le cas lorsque c'est la partie transmembranaire qui est échangée (Elkins and Nikaido, 2002; Tikhonova *et al.*, 2002). L'étude de mutants résistants montre que les résidus concernés par les mutations font partie du domaine périplasmique (Mao *et al.*, 2002). Les études cristallographiques ont permis d'identifier une zone appelée « poche de liaison des substrats », déterminante dans la spécificité de substrats (Figure 13, p 32). Il existe dans cette poche plusieurs sites de liaison

reconnus par les différents substrats, ce qui explique la polyspécificité de substrats des systèmes RND ainsi que l'inhibition compétitive préférentielle de certains substrats par l'inhibiteur d'efflux phénylalanine arginine  $\beta$ -naphthylamide (Nikaido, 2011; Nikaido and Pagès, 2012; Pagès and Amaral, 2009).

La translocation des protons (force proton motrice) dépend de résidus appartenant aux TMS 4, 10 et 11 (Nikaido and Takatsuka, 2009; Su *et al.*, 2006). C'est cette translocation de protons qui serait à l'origine des modifications conformationnelles permettant le transport des substrats depuis l'espace périplasmique jusqu'à l'OMF.

La plupart des connaissances actuelles sur la structure et le fonctionnement des pompes RND découlent de travaux portant sur AcrB d'*Escherichia coli* et MexB de *P. aeruginosa*. Les données de cristallographie d'AcrB (Murakami *et al.*, 2002) et de MexB (Sennhauser *et al.*, 2009) montrent un assemblage en trimères avec une cavité centrale reliée à l'OMF par une partie en entonnoir centrée par un pore, et au périplasmique par des orifices latéraux entre les protomères appelés « vestibules » (Figure 13).



**Figure 13.** Structure d'un trimère d'AcrB (d'après Sennhauser *et al.*, 2007).

*A.* Vue latérale.

*B.* Vue dans l'axe de la cavité centrale.

*A, B et C :* les 3 protomères d'AcrB.

❖ La protéine de membrane externe (OMF)

L'OMF est également organisé en trimères formant un long tunnel qui traverse la membrane externe (structure en tonneau constituée de feuillettes bêta) et qui s'enfonce profondément dans le périplasma (tunnel formé par des hélices alpha) (Nikaido, 2011) (Figure 14). L'OMF ne serait pas simplement un canal mais une structure dynamique pouvant s'ouvrir pour laisser passer les substrats (Pagès *et al.*, 2011).



**Figure 14.** Structure d'un trimère de TolC (OMF) (d'après Zgurskaya *et al.*, 2009).

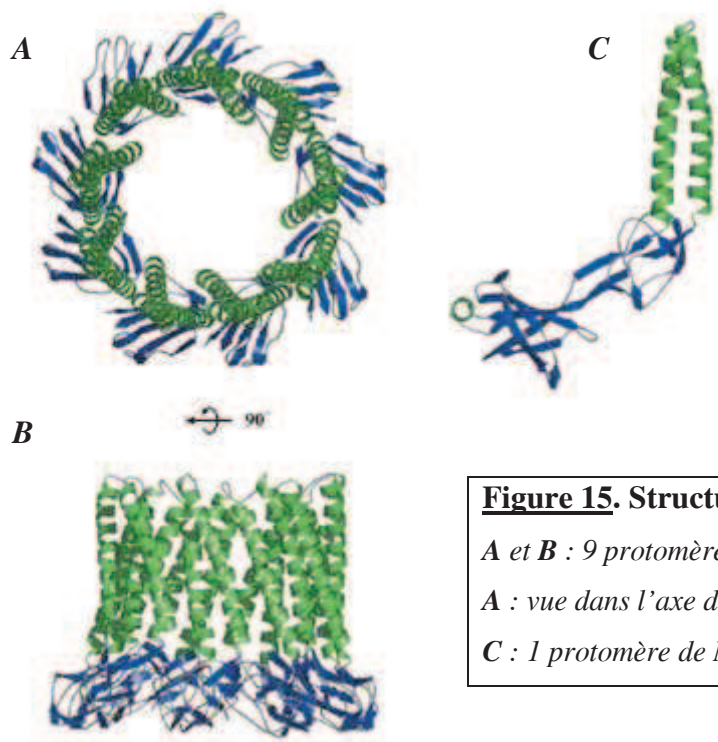
*En rouge* : l'un des 3 protomères.

*OM* : outer membrane (membrane externe).



❖ La protéine de fusion membranaire (MFP)

Cette protéine a pour rôle de stabiliser l'assemblage du complexe transporteur-OMF. La MFP a une structure allongée et flexible (Nikaido, 2011) (Figure 15). Elle interagit avec le transporteur RND (Krishnamoorthy *et al.*, 2008), avec l'OMF et avec la membrane cytoplasmique par son extrémité N-terminal (Zgurskaya *et al.*, 2009) (Figure 16, p 35). La MFP est un assemblage de plusieurs protomères qui entourent le transporteur et l'OMF. Contrairement aux protéines du transporteur et de l'OMF, le niveau d'oligomérisation de la protéine MFP n'est pas établi. L'analyse cristallographique de MexA permet d'observer un assemblage de 13 molécules regroupées en 2 oligomères de 6 et 7 protomères. Plusieurs modèles d'assemblage *in vivo* ont été envisagés pour MexA et AcrA, avec généralement un nombre de protomères multiple de 3 (Akama *et al.*, 2004; Higgins *et al.*, 2004; Pagès *et al.*, 2011; Symmons *et al.*, 2009) (Figure 15). Récemment, la co-cristallisation du transporteur CusA du système CusCBA d'*E. coli* (résistance à l'argent et au cuivre) avec CusB (la MFP) montre qu'un trimère de CusA s'associe avec un hexamère de CusB (Long *et al.*, 2012). La MFP peut aussi être un hétéro-oligomère comme dans le système TriABC-OpmH de *P. aeruginosa* (Mima *et al.*, 2007; Zgurskaya *et al.*, 2009) (Tableau 2, p 45).

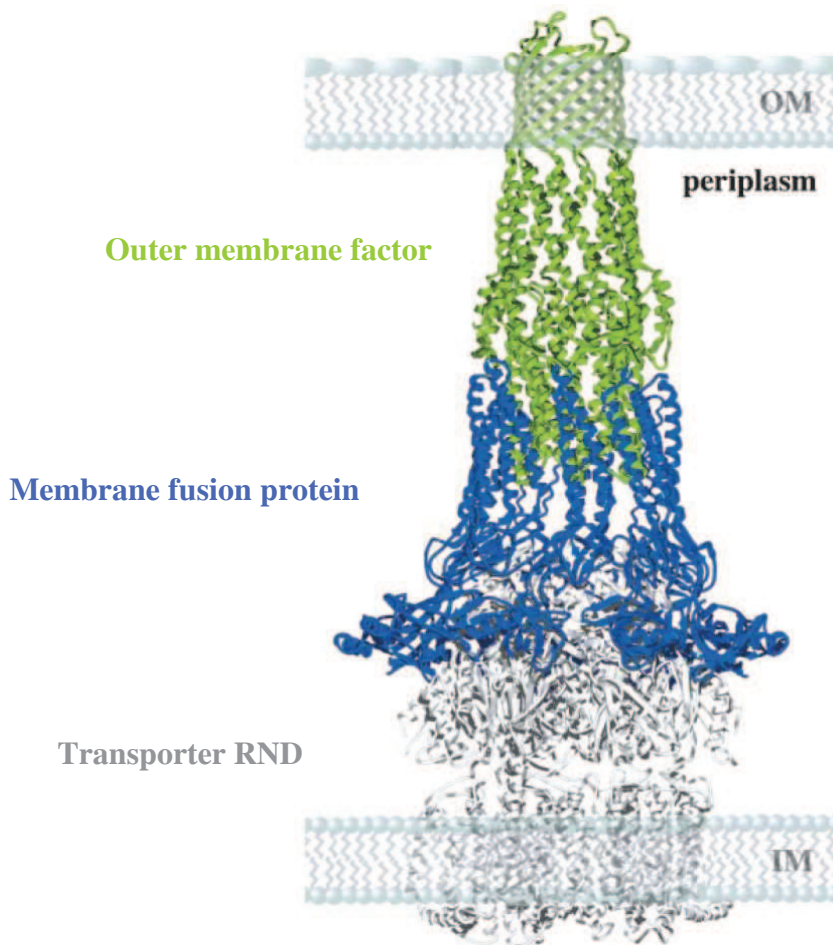


**Figure 15. Structure de MexA (d'après Higgins *et al.*, 2004).**

*A et B* : 9 protomères assemblés en anneau.

*A* : vue dans l'axe de l'anneau ; *B* : vue latérale.

*C* : 1 protomère de MexA.



**Figure 16. Assemblage tripartite d'un système d'efflux RND (Higgins *et al.*, 2004).**

*OM* : outer membrane ; *IM* : inner membrane.

❖ Fonctionnement d'un système d'efflux RND

Il était admis que la capture des substrats pouvait avoir lieu soit depuis le cytoplasme soit depuis l'espace périplasmique (Aires and Nikaido, 2005). La capture des substrats surviendrait en réalité au niveau périplasmique, par les vestibules du transporteur RND situés juste au dessus du feuillet externe de la membrane cytoplasmique (Figure 17, p 37) et qui communiquent avec la cavité centrale de la pompe (Nikaido, 2011). La question ne semble pourtant pas tout à fait élucidée puisqu'une équipe a récemment proposé un modèle de capture de métaux (argent et cuivre) par le transporteur CusA d'*E. coli* soit depuis l'espace périplasmique soit depuis le cytoplasme (Long *et al.*, 2012).



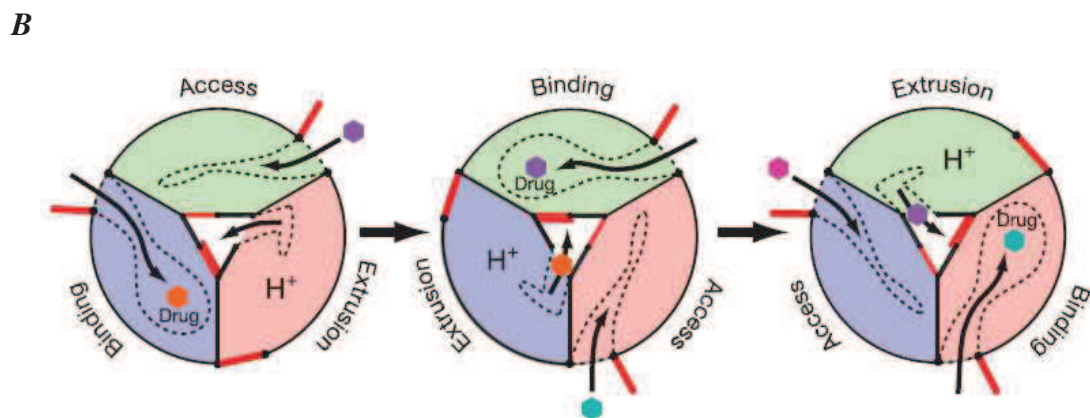
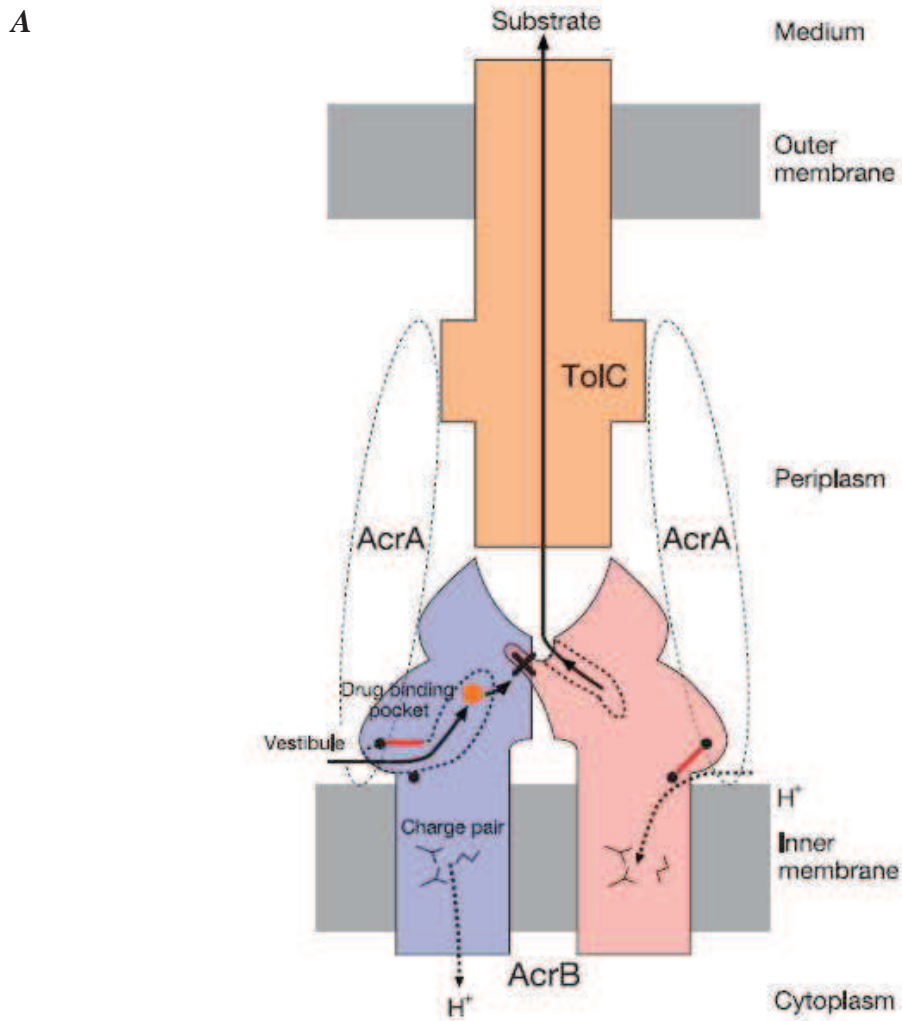
Le transport des substrats est entraîné par des modifications conformationnelles du transporteur RND. Le modèle de fonctionnement qui est désormais admis est le modèle « d'efflux rotatif » proposé en 2006 par 2 équipes différentes (Murakami *et al.*, 2006; Seeger *et al.*, 2006).

Dans ce modèle, chacun des 3 protomères du transporteur passe successivement par 3 états conformationnels (Figure 17) :

- **l'état « access »** : le vestibule d'entrée des substrats est ouvert sur le périplasma mais l'accès à la poche de liaison des substrats est impossible,
- **l'état « binding »** : la poche de liaison sur laquelle s'ouvre le vestibule peut recevoir les substrats, mais n'est pas ouverte sur la cavité centrale située entre les 3 protomères du transporteur,
- **l'état « extrusion »** : la poche de liaison se resserre et la communication avec le vestibule se ferme, ce qui chasse les substrats vers la cavité centrale, en direction de l'OMF (TolC, schéma A de la figure 17).

Dans ce modèle, le fonctionnement d'un transporteur RND est parfois comparé à celui d'une pompe péristaltique.

Ce mécanisme de transport n'est probablement pas celui de tous les systèmes RND. Il a été décrit que la MFP pouvait être à l'origine du transport actif de certains métaux (De Angelis *et al.*, 2010; Bagai *et al.*, 2007; Zgurskaya *et al.*, 2009).



**Figure 17. Modèle d'efflux rotatif du transporteur RND AcrB (Murakami *et al.*, 2006).**

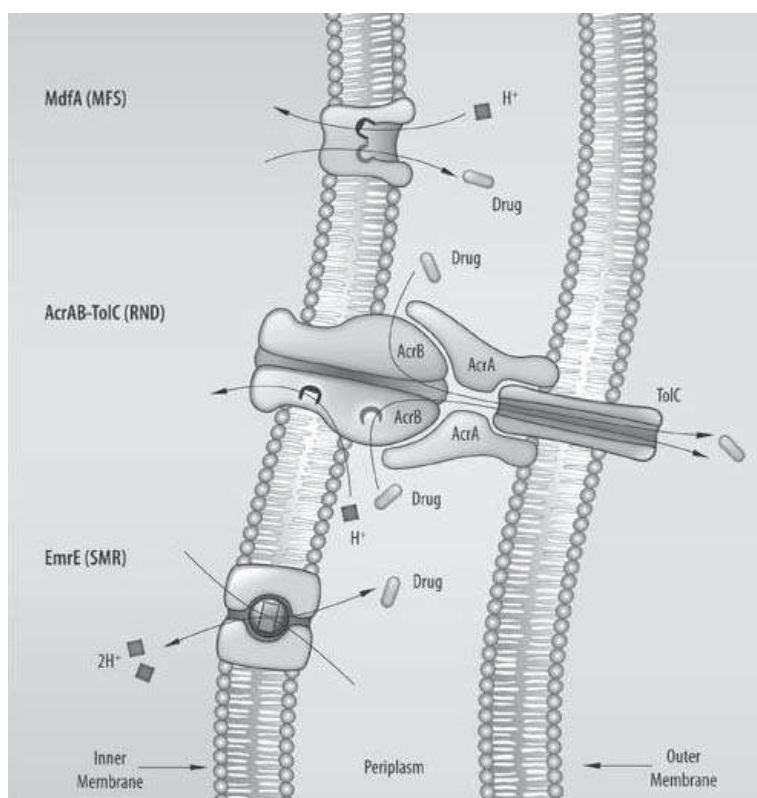
**A** : vue latérale, 2 protomères d'AcrB sont représentés (états « *binding* » et « *extrusion* »).

**B** : vue dans l'axe de la cavité centrale, les 3 protomères d'AcrB dans les 3 états conformationnels.

## ⚡ Particularités chez les bactéries à Gram négatif

Chez les bactéries à Gram négatif la pompe est le plus souvent associée à une protéine de fusion membranaire (MFP) et une protéine de membrane externe (OMF). C'est le mode de fonctionnement des transporteurs de la famille RND mais également dans certains cas de ceux d'autres familles : ABC (Ex. le système MacAB/TolC, Kobayashi *et al.*, 2001) ou MFS (Ex. le système EmrAB/TolC, Borges-Walmsley *et al.*, 2003).

L'implication des 3 constituants est nécessaire au transport des substrats au-delà de la membrane externe. Il existe pourtant chez ces bactéries certains transporteurs non couplés à une MFP et à un OMF. Ils peuvent quand même participer à la résistance aux antibiotiques. En effet, leurs substrats sont exportés dans le périplasma avant d'être pris en charge par un autre système d'efflux tripartite (Figure 18), l'association des 2 systèmes pouvant être synergique (Lee *et al.*, 2000).



**Figure 18.** Association de transporteurs chez *Escherichia coli* (Tal and Schuldiner, 2009).

Les substrats transportés du cytoplasme vers le périplasma par les pompes MdfA et EmrE sont ensuite pris en charge par le système AcrAB-TolC.

## b. Spécificité de substrats

Les systèmes d'efflux peuvent avoir une spécificité de substrat étroite, limitée à une molécule ou à une famille de molécules. D'autres ont un spectre beaucoup plus large et sont susceptibles de prendre en charge des molécules appartenant à différentes familles chimiques. Ces derniers sont largement répandus chez les bactéries à Gram négatifs et beaucoup d'entre eux exportent des molécules antibiotiques. Ils sont codés par des gènes chromosomiques dont l'expression est sous l'influence de gènes régulateurs. Selon leur niveau d'expression basal, ils peuvent contribuer à la résistance intrinsèque aux antibiotiques ou bien ne participer qu'à certaines résistances acquises en cas de dérégulation de l'expression génique.

## c. Fonctions des systèmes d'efflux

La résistance aux antibiotiques par efflux peut correspondre à un mécanisme d'autoprotection chez des micro-organismes producteurs d'antibiotiques (Ex. *Streptomyces*, Dairi *et al.*, 1995; Fierro *et al.*, 1987). Mais la résistance aux antibiotiques n'est qu'une des nombreuses fonctions des systèmes d'efflux dans le monde bactérien. Les gènes codant pour les systèmes d'efflux existaient bien avant l'utilisation des antibiotiques par l'homme. Certains systèmes d'efflux ne possèdent aucun antibiotique connu dans leur panel de substrats (Ex. TriABC-OpmH de *P. aeruginosa*, Mima *et al.*, 2007). Par ailleurs, certains antibiotiques peuvent être substrats de façon « fortuite » en raison de la large spécificité de certains systèmes d'efflux (Neyfakh, 1997). C'est ce qu'illustre l'exemple des fluoroquinolones, antibiotiques de synthèse et pourtant substrats de nombreux systèmes d'efflux (Alvarez-Ortega *et al.*, 2013).

Les systèmes d'efflux joueraient avant tout un rôle dans :

- le maintien de l'homéostasie avec l'élimination de déchets métaboliques (Helling *et al.*, 2002),
- l'adaptation aux conditions environnementales par exportation de substances toxiques : les sels biliaires (Thanassi *et al.*, 1997), des ammoniums quaternaires (Tennent *et al.*, 1989), des métaux (Nies, 2003; Perron *et al.*, 2004) ou encore des isoflavones (Palumbo *et al.*, 1998),
- la virulence par exportation de toxines comme chez *Vibrio cholerae* (Taylor *et al.*, 2012),

- la communication intercellulaire ou quorum sensing (Evans *et al.*, 1998; Minagawa *et al.*, 2012),
- la formation de biofilm (Matsumura *et al.*, 2011; Soto, 2013).

La résistance aux antibiotiques ne serait qu'une fonction secondaire pour certains systèmes d'efflux. C'est le cas du système AcrAB-TolC d'*E. coli* pourtant très étudié pour son implication dans la résistance aux antibiotiques ( $\beta$ -lactamines, acide nalidixique, fluoroquinolones, tétracycline, érythromycine, chloramphénicol, rifampicine, acide fusidique et novobiocine, Cattoir, 2004). Des essais d'inhibition compétitive montrent que les sels biliaires, présents dans l'environnement naturel d'*E. coli*, seraient les substrats préférentiels d'AcrB (Zgurskaya and Nikaido, 1999).

Une bonne connaissance des fonctions des pompes d'efflux doit permettre de comprendre les conditions qui conduisent à leur surexpression et à l'acquisition de résistances aux antibiotiques. Noguchi et ses collaborateurs ont montré que des mutants de *Staphylococcus aureus* sélectionnés par des antiseptiques pouvaient être résistants aux fluoroquinolones par surexpression de NorA (Noguchi *et al.*, 2002).

#### d. Inhibiteurs d'efflux

Les molécules appelées « inhibiteurs d'efflux » ou « EPIs » (Efflux Pump Inhibitors) sont capables d'entraver le fonctionnement de systèmes d'efflux. Certains substrats d'efflux peuvent être eux-mêmes inhibiteurs du système qui les exportent. C'est le cas de la tétracycline capable d'inhiber le système AcrAB-TolC d'*Escherichia coli* (Bohnert *et al.*, 2010).

Certains EPIs sont fréquemment utilisés en recherche fondamentale dans le domaine des efflux ou en recherche thérapeutique :

- Le **carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone (CCCP)** agit comme conducteur de protons induisant une perte de la force proton motrice indispensable au fonctionnement des transporteurs d'efflux secondaires (Nikaido, 2011). Le CCCP est capable d'inhiber des transporteurs MFS, MATE ou RND. Cet EPI est lui-même substrat de certains transporteurs comme EmrB, transporteur MFS d'*Escherichia coli*. Sa toxicité cellulaire rend son utilisation dans un but thérapeutique inenvisageable (Mahamoud *et al.*, 2007).

- Le **2,4-dinitrophénol** agit également sur la force proton motrice pour inhiber des transporteurs MFS (Singh *et al.*, 2011).
- La **réserpine** inhibe des transporteurs MFS tels que NorA de *Staphylococcus aureus* ainsi que des transporteurs ABC (Lomovskaya *et al.*, 2001; Mahamoud *et al.*, 2007). Les concentrations nécessaires à inhiber les systèmes d'efflux bactériens sont neurotoxiques pour l'homme (Mahamoud *et al.*, 2007).
- Le **vérapamil** est utilisé pour le traitement de certaines maladies cardiovasculaires (hypertension artérielle, angor, certains troubles du rythme). Il est capable d'inhiber les transporteurs d'efflux de la famille ABC (Singh *et al.*, 2011).
- Le **phénylalanine arginine  $\beta$ -naphthylamide (PABN)** ou «**MC-207,110**» est un inhibiteur des systèmes d'efflux RND. C'est un peptidomimétique qui est lui-même un substrat de transporteurs RND. Il agit par inhibition compétitive avec les autres substrats de la pompe, conduisant à l'augmentation de leur concentration intracellulaire. Le PABN, substrat de MexAB-OprM, entraîne une diminution significative de la CMI de certaines fluoroquinolones (Ex. ciprofloxacine ou lévofloxacine) chez *P. aeruginosa* (Askoura *et al.*, 2011; Lomovskaya *et al.*, 2001; Pagès and Amaral, 2009). Lomovskaya et ses collaborateurs ont montré que la diminution de la CMI de la lévofloxacine était d'autant plus importante que la CMI de départ était élevée. De plus, la fréquence d'émergence de mutants résistants à la lévofloxacine était nettement diminuée lorsque l'antibiotique était utilisé en combinaison avec le PABN. Le PABN est aussi capable de restaurer l'activité du chloramphénicol et de certains macrolides sur *P. aeruginosa* (Askoura *et al.*, 2011).
- Les **pyridopyrimidines** sont également des peptidomimétiques. Ils seraient de bons candidats en vue d'une utilisation thérapeutique car moins toxiques que le PABN et plus stables en solution. De plus ils semblent efficaces *in vivo* puisqu'ils potentialisent l'activité de certaines fluoroquinolones et  $\beta$ -lactamines dans un modèle animal de pneumonie à *P. aeruginosa* (Yoshida *et al.*, 2006, 2007).
- Les **quinolines** et leurs dérivés sont capables d'inhiber le transport de la norfloxacine et du chloramphénicol par les systèmes d'efflux RND d'entérobactéries (Chevalier *et al.*, 2004).

- Des **dérivés de la pipérazine** sont capables d'augmenter les concentrations intracellulaires de certains antibiotiques chez des entérobactéries (Pagès and Amaral, 2009).
- L'**oméprazole** fait partie des médicaments de la famille des « inhibiteurs de la pompe à protons ». Il est utilisé pour le traitement du reflux gastro-oesophagien et des ulcères gastro-duodénaux. L'oméprazole et certains de ses analogues inhibent la pompe NorA (famille MFS) de *S. aureus* (Aeschlimann *et al.*, 1999).
- Des **phénothiazines** (molécules utilisées comme antipsychotiques) ont été décrites comme inhibitrices d'efflux chez *Burkholderia pseudomallei* (Chan *et al.*, 2007) et *Salmonella enterica* (Bailey *et al.*, 2008).

## 2. Systèmes d'efflux RND impliqués dans la résistance aux antibiotiques chez les bacilles à Gram négatif non fermentaires (BGN-NF)

Les systèmes d'efflux de la famille RND sont les plus fréquemment impliqués dans la résistance aux antibiotiques par efflux chez les BGN-NF. Ils peuvent participer à la résistance intrinsèque ou acquise. De nombreux gènes candidats d'efflux RND sont retrouvés dans les génomes de BGN-NF. Seuls certains d'entre eux ont été étudiés, principalement dans des espèces d'intérêt médical.

### a. *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste multi-résistant aux antibiotiques. Son génome contient 12 opérons d'efflux RND ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)). Chaque opéron est constitué de 2 à 3 gènes : l'un code pour la MFP, un autre pour le transporteur RND et le troisième, lorsqu'il est présent, code pour l'OMF (Figure 19, p 44). Un gène régulateur peut se trouver en amont de l'opéron. Tous ces systèmes d'efflux RND ont désormais été caractérisés. Dix d'entre eux ont des antibiotiques parmi leurs substrats (Tableau 2, p 45).

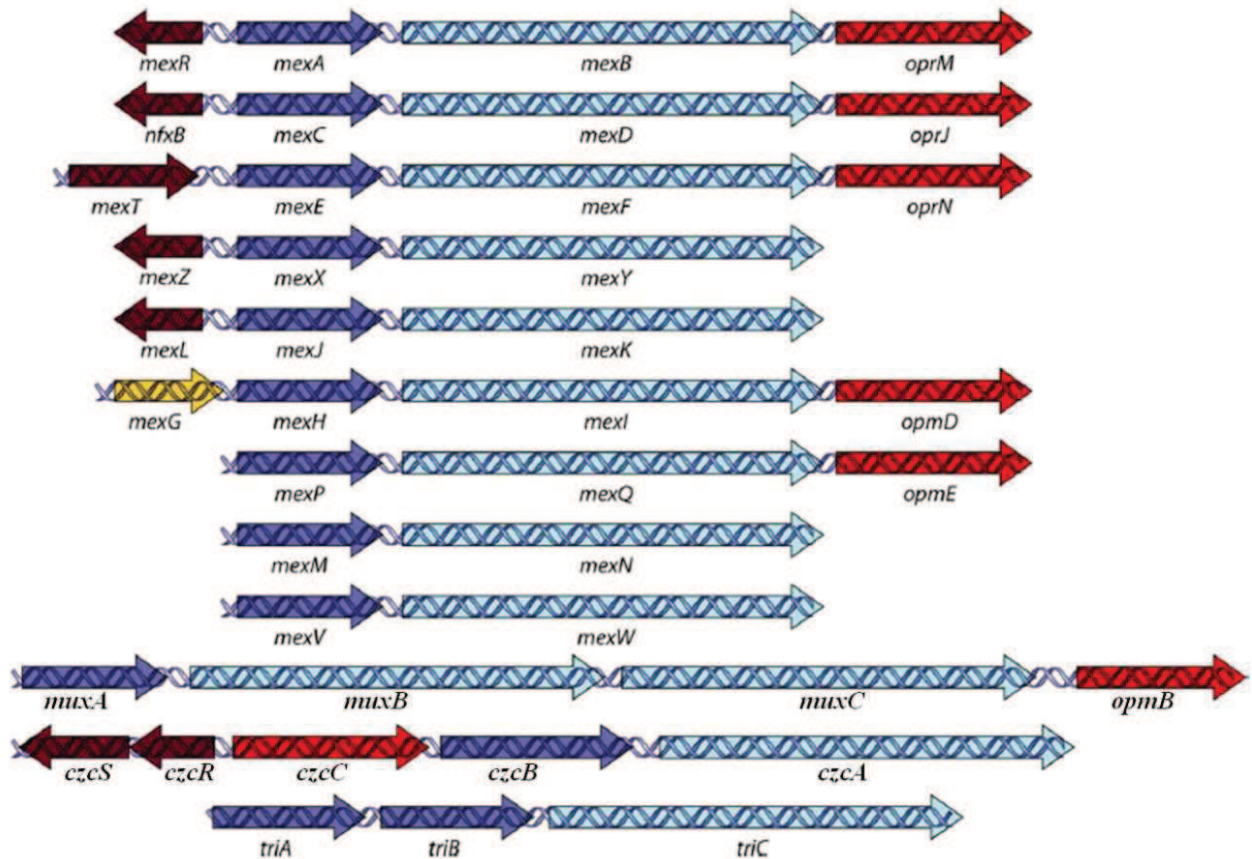
#### ❖ MexAB-OprM

C'est le premier système d'efflux RND décrit chez *P. aeruginosa* (Poole *et al.*, 1993). Il est constitutivement exprimé et participe à la résistance intrinsèque de *P. aeruginosa* aux antibiotiques (Morita *et al.*, 2001). MexAB-OprM a une très large spécificité de substrats antibiotiques, notamment parmi les  $\beta$ -lactamines. Ce système d'efflux est capable d'exporter les 15 céphalosporines étudiées par Masuda et ses collaborateurs (Masuda *et al.*, 2000). La surproduction de MexAB-OprM, à l'origine de résistances acquises, est très fréquente dans les souches cliniques (Hocquet *et al.*, 2007). Trois types de mutants surproducteurs de MexAB-OprM (*nalB*, *nalC* et *nalD*) ont été décrits parmi des souches cliniques multirésistantes aux antibiotiques (Llanes *et al.*, 2004).

Il a été montré que MexAB-OprM pouvait participer de façon indirecte, en association avec un transporteur SMR, et uniquement dans un milieu de faible force ionique, à la résistance aux aminosides de *P. aeruginosa* (Li *et al.*, 2003a).



L'OMF de ce système, OprM, s'associe également avec MexXY (Mine *et al.*, 1999), MexJK (Chuanchuen *et al.*, 2002), MexVW (Li *et al.*, 2003b) et MexMN (Mima *et al.*, 2005). Il a aussi été montré que MexEF pouvait fonctionner avec OprM (Maseda *et al.*, 2000). Il existe un promoteur en amont d'*oprM* (dans le gène *mexB*) qui pourrait permettre la synthèse d'OprM en cas de défaillance d'expression de l'opéron *mexAB-oprM* (Lister *et al.*, 2009).



**Figure 19.** Les 12 opérons d'efflux RND de *P. aeruginosa* (D'après Lister *et al.*, 2009).

*Gènes régulateurs* ; *Gènes de MFP* ; *Gènes de transporteurs RND* ; *Gènes d'OMF* ;  
*Gène de fonction inconnue.*

**Tableau 2. Les 12 systèmes d'efflux RND de *P. aeruginosa*.**

MFP	RND	OMF	Substrats	Références
MexA	MexB	OprM	BL (PG, AMP, TIC, CAR, CLOX, CLAV, Céphalo, ATM, MEM), NAL, FQ (NOR, OFL, SPX, CIP), TC, M (ERY, AZI, SPI), LIN, CHL, SUL, TMP, RIF, AF, NOV	(Köhler <i>et al.</i> , 1996; Li <i>et al.</i> , 1995, 1998; Masuda <i>et al.</i> , 2000; Poole <i>et al.</i> , 1993; Srikumar <i>et al.</i> , 1998)
MexC	MexD	OprJ	BL (PG, AMX, PIP, Céphalo sauf CAZ, MEM), NAL, FQ (NOR, OFL, SPX, CIP), TC, M (ERY, AZI, SPI), CHL, TMP, NOV	(Gotoh <i>et al.</i> , 1998; Masuda <i>et al.</i> , 2000; Okamoto <i>et al.</i> , 2002; Poole <i>et al.</i> , 1996; Srikumar <i>et al.</i> , 1998)
MexE	MexF	OprN	FQ (SPX, CIP), TC, CHL, TMP	(Köhler <i>et al.</i> , 1997, 1999; Llanes <i>et al.</i> , 2011)
MexX	MexY	OprA / OprM	BL (PG, AMX, PIP, FEP, MEM), NAL, FQ (NOR, OFL, SPX, CIP), AG (KAN, TM, AN, GM, NET, ISP, SM, NEO), TC, TIG, M (ERY, SPI), LIN, CHL	(Aires <i>et al.</i> , 1999; Dean <i>et al.</i> , 2003; Hocquet <i>et al.</i> , 2006; Masuda <i>et al.</i> , 2000; Mine <i>et al.</i> , 1999; Morita <i>et al.</i> , 2012a; Okamoto <i>et al.</i> , 2002; Westbrook-Wadman <i>et al.</i> , 1999)
MexJ	MexK	OprM / OpmH	TC, ERY	(Chuanchuen <i>et al.</i> , 2002, 2005)
MexH	MexI	OpmD	NOR	(Sekiya <i>et al.</i> , 2003)
MexP	MexQ	OpmE	FQ, TC, CHL, M	(Mima <i>et al.</i> , 2005)
MexM	MexN	OprM	CHL	(Mima <i>et al.</i> , 2005)
MexV	MexW	OprM	CPO, FQ (NOR, OFL), TC, ERY, CHL	(Li <i>et al.</i> , 2003b)
MuxA	MuxB MuxC	OpmB	ATM, TC, M et NOV	(Mima <i>et al.</i> , 2009; Yang <i>et al.</i> , 2011)
TriA TriB	TriC	OpmH	Aucun des antibiotiques étudiés	(Mima <i>et al.</i> , 2007)
CzcB	CzcA	CzcC	Aucun des antibiotiques étudiés	(Hassan <i>et al.</i> , 1999; Perron <i>et al.</i> , 2004)

**AF** : acide fusidique ; **AG** : aminosides ; **AMP** : ampicilline ; **AMX** : amoxicilline ; **AN** : amikacine ; **ATM** : aztréonam ; **AZI** : azithromycine ; **BL** :  $\beta$ -lactamines ; **CAR** : carbénicilline ; **CAZ** : ceftazidime ; **Céphalo** : céphalosporines ; **CHL** : chloramphénicol ; **CIP** : ciprofloxacine ; **CLAV** : acide clavulanique ; **CLOX** : cloxacilline ; **CPO** : ceftpirome ; **ERY** : érythromycine ; **FEP** : céfépime ; **FQ** : fluoroquinolones ; **GM** : gentamicine ; **IPM** : imipénème ; **ISP** : isépacine ; **KAN** : kanamycine ; **LIN** : lincomycine ; **MEM** : méropénème ; **M** : macrolides ; **NAL** : acide nalidixique ; **NEO** : néomycine ; **NET** : nétilmicine ; **NOR** : norfloxacine ; **NOV** : novobiocine ; **OFL** : ofloxacine ; **PG** : pénicilline G ; **PIP** : pipéracilline ; **RIF** : rifampicine ; **SM** : streptomycine ; **SPI** : spiramycine ; **SPX** : sparfloxacine ; **SUL** : sulfaméthoxazole ; **TC** : tétracycline ; **TIC** : ticarcilline ; **TIG** : tigécycline ; **TM** : tobramycine ; **TMP** : triméthoprime.

#### ❖ MexCD-OprJ

Son spectre de substrats est étendu mais un peu moins que celui de MexAB-OprM en ce qui concerne les  $\beta$ -lactamines. MexCD-OprJ n'exporte pas la carbénicilline, la ceftazidime et l'aztréonam. En revanche les céphalosporines telles que le céfépime ou le ceftiprome sont de bons substrats de MexCD-OprJ (Gotoh *et al.*, 1998; Masuda *et al.*, 2000; Poole *et al.*, 1996; Srikumar *et al.*, 1998). Les mutants *nfxB* surproduisant MexCD-OprJ ont des niveaux de résistance au céfépime et à la ciprofloxacine plus élevés que les souches sauvages. Ces mutants sont relativement rares parmi les souches cliniques mais peuvent être sélectionnés en cas de monothérapie prolongée par une fluoroquinolone, en particulier la ciprofloxacine (Jeannot *et al.*, 2008).

#### ❖ MexEF-OprN

Bien que considéré comme non exprimé dans les souches sauvages (Köhler *et al.*, 1997), il a été récemment démontré que MexEF-OprN était l'un des mécanismes fréquemment en cause dans l'acquisition de la résistance de souches cliniques à la ciprofloxacine (Llanes *et al.*, 2011).

#### ❖ MexXY/OprM

L'opéron *mexXY* est dépourvu de gène codant pour un OMF. Mais MexX et MexY peuvent s'associer à OprM (Aires *et al.*, 1999), voire même à d'autres OMF comme OpmB (Murata *et al.*, 2002) pour constituer le système d'efflux tripartite. Certaines souches (dont PA7) possèdent le gène *oprA*, codant pour un OMF, en aval de *mexXY*. MexX et MexY peuvent alors fonctionner avec OprA (Morita *et al.*, 2012a). Chez les souches dépourvues du gène *oprA*, il existe cependant un reliquat de ce gène (Morita *et al.*, 2012b), indiquant qu'une délétion s'est probablement produite au cours de l'évolution.

MexXY/OprM a une très large spécificité de substrats mais possède la particularité d'être le seul système RND de *P. aeruginosa* à exporter les aminosides. Les souches sauvages de *P. aeruginosa* sont catégorisées « sensibles » aux aminosides (sauf kanamycine) en vue d'une utilisation thérapeutique. Certains aminosides tels que la tobramycine font d'ailleurs partie de l'arsenal thérapeutique anti-pyocyanique. MexYX/OprM confère toutefois un certain niveau

de résistance intrinsèque puisque la CMI des aminosides est très diminuée par l'inactivation de ce système d'efflux dans la souche sauvage PAO1 (Westbrock-Wadman *et al.*, 1999).

Dans les souches cliniques, 3 types de mutants surproducteurs de MexXY ont été décrits : *agrZ*, *agrW1* et *agrW2* (Guénard *et al.*, 2013; Llanes *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2011). Le niveau de résistance élevé aux aminosides chez ces mutants peut compromettre l'utilisation thérapeutique de cette famille d'antibiotiques. La prévalence des souches cliniques surproduisant MexXY est élevée (Hocquet *et al.*, 2008; Llanes *et al.*, 2013). Dans les souches des patients atteints de mucoviscidose la surproduction de MexXY représente le mécanisme prépondérant dans la résistance acquise aux aminosides (Morita *et al.*, 2012a).

#### ❖ Autres systèmes d'efflux RND

Huit systèmes RND de *P. aeruginosa* sont présentés dans cette partie. Certains sont capables d'exporter des antibiotiques mais leur rôle dans la résistance de souches cliniques aux antibiotiques n'a jamais été démontré.

**MexJK** peut fonctionner soit avec OprM soit avec OpmH. Selon l'OMF impliqué dans le système d'efflux les substrats exportés ne sont pas les mêmes : l'érythromycine avec OprM et le triclosan (composé organochloré) avec OpmH (Chuanchuen *et al.*, 2002, 2005).

**MexHI-OpmD** a été initialement (et est encore souvent) nommé MexGHI-OpmD en raison de la présence d'un ORF (*mexG*) appartenant au même opéron que les gènes d'efflux (Aendekerk *et al.*, 2002). La fonction de *mexG* est inconnue et il n'y a aucune homologie de séquence avec des gènes d'efflux. Il a été démontré que les gènes *mexH*, *mexI* et *opmD* étaient suffisants pour le fonctionnement de ce système d'efflux dont la norfloxacine est le seul substrat antibiotique connu (Sekiya *et al.*, 2003).

**MexPQ-OpmE** et **MexMN/OprM** ont été décrits en même temps (Mima *et al.*, 2005). Ils sont capables d'exporter des antibiotiques mais peu de données existent quant à leur rôle dans la résistance de souches cliniques.

**MexVW/OprM** a été caractérisé à partir d'un mutant résistant à la norfloxacine surexprimant *mexV* (Li *et al.*, 2003b). Ce système serait donc susceptible d'entraîner des résistances acquises aux fluoroquinolones.

**MuxABC-OpmB** possède la particularité de comporter 2 composants RND, MuxB et MuxC, tous les 2 indispensables au fonctionnement du système d'efflux. C'est un homologue de MdtABC-TolC d'*E. coli* dont le transporteur est constitué d'un hétérotrimère de 2 protomères de MdtB et d'un protomère de MdtC (Kim *et al.*, 2010; Mima *et al.*, 2009).

**CzcCBA**, initialement nommé CzcCBA (Hassan *et al.*, 1999), peut exporter certains métaux (cobalt, zinc et cadmium) mais aucun des antibiotiques étudiés (ticarcilline, carbénicilline, acide nalidixique, ciprofloxacine, norfloxacine, tétracycline, amikacine, chloramphénicol et polymyxine B) (Perron *et al.*, 2004). Le gène codant pour l'OMF (*czcC*) se situe en amont des gènes codant pour la MFP (*czcB*) et pour le transporteur RND (*czcA*).

**TriABC-OpmH** tient son nom de son seul substrat actuellement connu, le triclosan. Aucun des antibiotiques étudiés (ciprofloxacine, gentamicine, tétracycline, érythromycine, chloramphénicol et triméthoprime) n'est substrat de ce système. Les 2 MFP codées par les gènes *triA* et *triB* sont nécessaires pour son fonctionnement (Mima *et al.*, 2007).

❖ Régulation de l'expression des opérons d'efflux RND de *P. aeruginosa*

Les mécanismes de régulation de l'expression des opérons d'efflux RND sont nombreux et complexes, probablement en raison de leur implication dans le métabolisme bactérien (Alvarez-Ortega *et al.*, 2013). Seuls certains d'entre eux sont présentés ici à titre d'exemple.

Le niveau d'expression des opérons d'efflux RND dépend d'une régulation :

- **Locale** : des activateurs ou des répresseurs transcriptionnels sont codés par des gènes situés en amont de la plupart des opérons d'efflux RND. Ces régulateurs transcriptionnels sont nombreux et regroupés en familles. Les niveaux d'expression des 4 principaux systèmes d'efflux RND de *P. aeruginosa* dépendent de régulateurs locaux de 4 familles différentes : les familles MarR (MexR régulant *mexAB-oprM*), LacI/GalR (NfxB régulant *mexCD-oprJ*), LysR (MexT régulant *mexEF-oprN*) et TetR

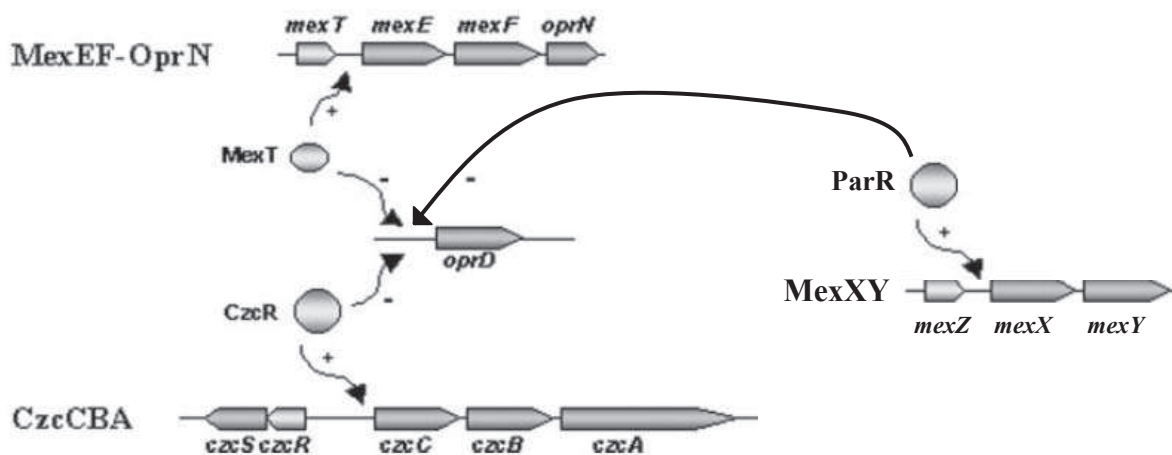
(MexZ régulant *mexXY*) (Grkovic *et al.*, 2002). MexT stimule l'expression de *mexEF-oprN* tandis que MexR, NfxB et MexZ répriment celle de *mexAB-oprM*, *mexCD-oprJ* et *mexXY*, respectivement, en se fixant sur la région contenant le promoteur de l'opéron (Lister *et al.*, 2009; Matsuo *et al.*, 2004; Saito *et al.*, 1999). Des mutations dans les gènes codant pour ces régulateurs peuvent entraîner des modifications de niveau d'expression des opérons RND. Par exemple, des mutations dans *mexZ* (« mutants *agrZ* ») sont associées à la surexpression de *mexXY* (Llanes *et al.*, 2004; Vogne *et al.*, 2004).

- **Globale** : certains mutants surproduisant MexXY (« mutants *agrW* ») ne présentent pas de mutation dans le gène *mexZ*. D'autres mécanismes de régulation influencent donc l'expression de *mexXY*. C'est le cas du système à 2 composants ParRS (Muller *et al.*, 2011). Un autre exemple permet d'illustrer la régulation globale : la régulation de l'expression de *mexEF-oprN* dépend de celle de *mexT* qui dépend elle-même d'un autre intervenant : MexS (probable oxydoréductase/déshydrogénase). Des mutations dans *mexS* entraîneraient une accumulation de certains métabolites, ce qui activerait l'expression de *mexT* et par conséquent celle de *mexEF-oprN* pour la prise en charge des métabolites accumulés (Lister *et al.*, 2009).

**Co-régulation.** Le niveau de production d'un système d'efflux RND peut être co-régulé avec celui d'autres protéines non impliquées dans l'efflux actif.

La porine OprD de *P. aeruginosa* est la porte d'entrée des carbapénèmes dans la cellule bactérienne (Trias and Nikaido, 1990). Des mutations dans le gène *oprD* peuvent entraîner des anomalies dans la synthèse de la porine et par conséquent une acquisition de résistance aux carbapénèmes par imperméabilité (Pirnay *et al.*, 2002; Rodríguez-Martínez *et al.*, 2009). Mais cette résistance peut aussi être liée à une diminution de l'expression d'*oprD*. L'expression du gène *oprD* est sous la dépendance de différents régulateurs dont certains sont aussi régulateurs de l'expression d'opérons d'efflux RND (Figure 20, p 50). MexT, activateur de l'expression de *mexEF-oprN*, réprime l'expression d'*oprD* (Köhler *et al.*, 1997, 1999). CzcR, qui régule localement l'expression de *czcCBA*, réprime également l'expression d'*oprD* (Perron *et al.*, 2004). Et plus récemment, il a été démontré qu'*oprD* était aussi co-régulé avec *meXY* par l'intermédiaire du système à 2 composants ParRS (Muller *et al.*, 2011). La résistance de *P. aeruginosa* aux carbapénèmes par défaut de production d'OprD peut donc être associée à la résistance à d'autres antibiotiques par efflux actif.



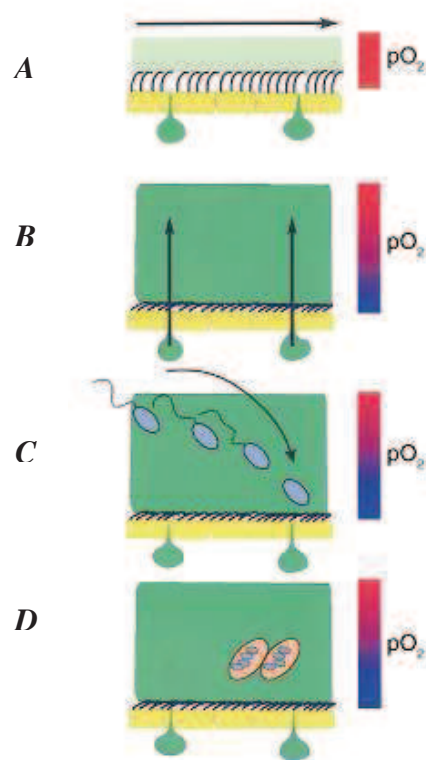


**Figure 20.** Co-régulation de l'expression d'*oprD* avec 3 opérons d'efflux différents chez *P. aeruginosa* (D'après Muller *et al.*, 2011; Perron *et al.*, 2004).

Les facteurs à l'origine de modifications de l'expression des systèmes d'efflux sont variés.

- Induction par les substrats de la pompe** : l'expression de *mexXY* est inductible en présence d'antibiotiques agissant au niveau du ribosome : chloramphénicol, tétracycline, tigécycline, érythromycine et aminosides (Hocquet *et al.*, 2003; Jeannot *et al.*, 2005; Vogne *et al.*, 2004). Des concentrations sub-inhibitrices de tobramycine peuvent provoquer l'augmentation de l'expression de *mexXY* de plusieurs dizaines de fois (Kindrachuk *et al.*, 2011). De la même façon l'exposition au zinc conduit à l'acquisition de résistances aux métaux substrats de CzcCBA. Du zinc pourrait être relargué par certaines sondes urinaires à des concentrations suffisantes pour induire l'expression de *czcCBA* mais aussi pour réprimer *oprD* et ainsi entraîner une résistance aux carbapénèmes (Perron *et al.*, 2004).
- Induction par le stress oxydatif** : l'exposition prolongée au peroxyde d'hydrogène induit une résistance aux aminosides chez *P. aeruginosa* par surexpression de *mexXY* (Fraud and Poole, 2011). De plus, l'oxydation de MexR, qui est le répresseur transcriptionnel de *mexAB-oprM*, altère sa capacité à se fixer à l'ADN ce qui entraîne une dérégulation de l'opéron d'efflux et une augmentation du niveau de résistance aux antibiotiques substrats de MexAB-OprM (Chen *et al.*, 2008).

- **Modification de l'expression des gènes d'efflux RND en condition d'hypoxie :** *P. aeruginosa* peut se développer dans des sécrétions muco-purulentes épaisses qui constituent un micro-environnement hypoxique dans les bronches des patients atteints de mucoviscidose (Figure 21) (Worlitzsch *et al.*, 2002). Récemment, Schaible a mis en évidence le rôle probable de l'hypoxie dans l'augmentation des niveaux de résistance aux antibiotiques par efflux chez *P. aeruginosa* (Schaible *et al.*, 2012).



**Figure 21.** Développement de *P. aeruginosa* dans le micro-environnement hypoxique constitué par les sécrétions muco-purulentes bronchiques au cours de la mucoviscidose (d'après Worlitzsch *et al.*, 2002).

*A* : épithélium bronchique normal. La fine couche de mucus (en vert clair) permet une clairance muco-ciliaire normale.

*B* : le mucus épais et visqueux produit par les glandes sous-muqueuses des patients mucoviscidosiques adhère aux cellules épithéliales et n'est plus éliminé normalement. Un gradient de pression en oxygène ( $pO_2$ ) se forme dans l'épaisseur du mucus (rouge :  $pO_2$  normale ; bleu :  $pO_2$  faible).

*C* et *D* : *P. aeruginosa* pénètre dans le mucus, colonise les zones hypoxiques et augmente sa production d'alginate (en rose pâle).



- **Modification de l'expression des gènes d'efflux RND dans le biofilm** : la colonisation chronique des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose par *P. aeruginosa* s'accompagne de la formation de biofilm. Il a été montré que la bactérie en biofilm pouvait devenir plus résistante, mais parfois aussi plus sensible, à certains antibiotiques (de Bentzmann *et al.*, 2012; Gillis *et al.*, 2005; Zhang and Mah, 2008). La résistance de *P. aeruginosa* en biofilm à l'azithromycine est associée à la surexpression d'opérons d'efflux RND (Gillis *et al.*, 2005).
- **Influence de la phase de croissance bactérienne et du quorum sensing** : c'est à la fin de la phase de croissance exponentielle et au début de la phase stationnaire, alors que la densité bactérienne est la plus importante, que *mexAB-oprM* est le plus exprimé. Certaines molécules du quorum sensing influencent le niveau d'expression de cet opéron d'efflux (Evans and Poole, 1999; Maseda *et al.*, 2004).

#### b. Autres BGN-NF d'intérêt médical

Le tableau 3 (p 53) répertorie les systèmes d'efflux RND qui ont été étudiés chez des BGN-NF d'intérêt médical hors *P. aeruginosa*. La majorité de ces systèmes ont des antibiotiques comme substrats. Les systèmes d'efflux putatifs décrits uniquement à partir de l'analyse de séquences génomiques (Ex. SmeGH, Crossman *et al.*, 2008) ne figurent pas dans le tableau.

#### ❖ *Burkholderia*

*Burkholderia cenocepacia* est un pathogène rencontré chez les patients atteints de mucoviscidose, chez qui il est responsable d'une altération de la fonction respiratoire (Coutinho *et al.*, 2011). L'analyse de son génome révèle la présence de 16 candidats d'efflux RND, nommés RND-1 à RND-16 (Bazzini *et al.*, 2011), dont 5 sont capables d'exporter des antibiotiques. RND-9 n'est pas constamment présent chez *B. cenocepacia*. Son absence ne semble donc pas affecter le métabolisme bactérien, ce qui pourrait s'expliquer par une redondance des fonctions des nombreux systèmes RND dans cette espèce bactérienne. CeoAB-OpcM, décrit en 2004 (Nair *et al.*, 2004), correspond au système RND-10 de Buroni et ses collaborateurs (Buroni *et al.*, 2009; Perrin *et al.*, 2010).

**Tableau 3. Systèmes RND chez les BGN-NF d'intérêt médical (hors *P. aeruginosa*).**

MFP	RND	OMF	Antibiotiques substrats	Références
<b><u>Burkholderia cenocepacia</u></b>				
CeoA	CeoB	OpcM	CIP, CHL, TMP	(Nair <i>et al.</i> , 2004)
	RND-1		Aucun des antibiotiques étudiés	(Buroni <i>et al.</i> , 2009)
	RND-2		NAL, FQ (NOR, OFL, CIP), SM	(Gugliera <i>et al.</i> , 2006)
	RND-3		NAL	(Buroni <i>et al.</i> , 2009)
	RND-4		ATM, NAL, FQ (NOR, LVX, SPX, CIP), AG (TM, GM), CHL	(Bazzini <i>et al.</i> , 2011; Buroni <i>et al.</i> , 2009)
	RND-9		ATM, TM, FQ (LVX, SPX)	(Bazzini <i>et al.</i> , 2011)
<b><u>Burkholderia pseudomallei</u></b>				
AmrA	AmrB	OprA	AG, M (ERY, CLA)	(Moore <i>et al.</i> , 1999)
BpeA	BpeB	OprB	FQ (NOR, OFL, CIP), TC, M, CHL	(Chan <i>et al.</i> , 2004; Mima and Schweizer, 2010)
BpeE	BpeF	OprC	CHL, TMP	(Kumar <i>et al.</i> , 2006)
<b><u>Pseudomonas fluorescens</u></b>				
EmhA	EmhB	EmhC	NAL, CIP, CHL	(Hearn <i>et al.</i> , 2003, 2006)
<b><u>Pseudomonas putida</u></b>				
TtgA	TtgB	TtgC	AMP, CAR, NAL, TC, CHL	(Ramos <i>et al.</i> , 1998; Teran <i>et al.</i> , 2003)
TtgD	TtgE	TtgF	Aucun des antibiotiques étudiés	(Mosqueda and Ramos, 2000; Rojas <i>et al.</i> , 2001)
TtgG	TtgH	TtgI	AMP, CAR, TC	(Guazzaroni <i>et al.</i> , 2004; Rojas <i>et al.</i> , 2001, 2003)
ArpA	ArpB	ArpC	CAR, SM, TC, ERY, CHL, NOV	(Kieboom and de Bont, 2001)
MepA	MepB	MepC	Péni (PG, AMP), TC, ERY, NOV	(Fukumori <i>et al.</i> , 1998)
SrpA	SrpB	SrpC	Non étudié	(Kieboom <i>et al.</i> , 1998)
<b><u>Pseudomonas stutzeri</u></b>				
TbtA	TbtB	TbtM	NAL, CHL, SUL	(Jude <i>et al.</i> , 2004)
<b><u>Stenotrophomonas maltophilia</u></b>				
SmeA	SmeB	SmeC	Aucun des antibiotiques étudiés	(Li <i>et al.</i> , 2002)
SmeD	SmeE	SmeF	NAL, FQ (NOR, OFL, MXF, CIP), TC, DOX, M (ERY, AZI), CHL, NOV	(Alonso and Martínez, 2000; Alonso and Martínez, 2001; Zhang <i>et al.</i> , 2001)
SmeI	SmeJ, SmeK		CIP, AG (AN, GM), TC, MIN	(Chen <i>et al.</i> , 2011; Crossman <i>et al.</i> , 2008)
SmeY	SmeZ		AG	(Crossman <i>et al.</i> , 2008)
SmeV	SmeW	SmeX	NAL, MFX, TC, DOX, CHL	(Chen <i>et al.</i> , 2011)

**AG** : aminosides ; **AMP** : ampicilline ; **AN** ; amikacine ; **ATM** : aztréonam ; **AZI** : azithromycine ; **CAR** : carbénicilline ; **CHL** : chloramphénicol ; **CIP** : ciprofloxacine ; **CLA** : clarithromycine ; **DOX** : doxycycline ; **ERY** : érythromycine ; **FQ** : fluoroquinolones ; **GM** : gentamicine ; **LVX** : lévofloxacine ; **MIN** : minocycline ; **M** : macrolides ; **MXF** : moxifloxacine ; **NAL** : acide nalidixique ; **NOR** : norfloxacine ; **NOV** : novobiocine ; **OFL** : ofloxacine ; **Péni** : pénicillines ; **PG** : pénicilline G ; **SM** : streptomycine ; **SPX** : sparfloxacine ; **SUL** : sulfaméthoxazole ; **TC** : tétracycline ; **TIC** : ticarcilline ; **TM** : tobramycine ; **TMP** : triméthoprime.

*Burkholderia pseudomallei* est l'agent d'une zoonose, la mélioïdose, endémique en Asie du sud-est et dans le nord de l'Australie. Les formes cliniques humaines sont variées et le taux de mortalité avoisine les 30% en l'absence de traitement (Currie *et al.*, 2010). Dans cette espèce, 3 systèmes d'efflux RND ont été décrits :

- AmrAB-OprA (homologue de MexXY), responsable de la résistance intrinsèque aux aminosides (Moore *et al.*, 1999),
- BpeAB-OprB (homologue de MexAB-OprM) décrit initialement comme participant à la résistance aux aminosides (Chan *et al.*, 2004), mais le contraire a été démontré par la suite (Mima and Schweizer, 2010),
- BpeEF-OprC dont l'implication dans l'antibio-résistance est limitée (Kumar *et al.*, 2006),

*Burkholderia thailandensis*, pathogène opportuniste, est génétiquement proche de *B. pseudomallei*. Par analyse protéomique, il a été démontré que des mutants de *B. thailandensis* résistants à divers antibiotiques (chloramphénicol, fluoroquinolones, cyclines) surproduisaient les protéines homologues de BpeA, BpeB, OprB et OprC de *B. pseudomallei*, suggérant l'implication de 2 systèmes d'efflux RND dans l'augmentation du niveau de résistance des mutants (Biot *et al.*, 2011). Cependant, aucun travail expérimental n'a été réalisé pour le démontrer et pour préciser les substrats de chaque système.

#### ❖ *Pseudomonas* autres que *P. aeruginosa*

Il s'agit de pathogènes opportunistes peu fréquemment responsables d'infections chez l'homme. Des systèmes d'efflux RND ayant des antibiotiques parmi leurs substrats ont été caractérisés dans les espèces *P. fluorescens* (Hearn *et al.*, 2003), *P. putida* (Fukumori *et al.*, 1998; Kieboom and de Bont, 2001; Ramos *et al.*, 1998) et *P. stutzeri* (Jude *et al.*, 2004).

### ❖ *Stenotrophomonas maltophilia*

Comme *A. xylosoxidans*, *S. maltophilia* est un pathogène opportuniste, responsable d'infections chez des personnes immunodéprimées (Brooke, 2012). C'est également un pathogène émergent dans la mucoviscidose (Parkins and Elborn, 2010; Pompilio *et al.*, 2011). Plusieurs systèmes d'efflux ont été décrits dans cette espèce.

**SmeABC** ne semble pas intervenir dans l'efflux d'antibiotiques. Pourtant l'inactivation du gène *smeC* (codant pour l'OMF) entraîne une diminution de la CMI de nombreux antibiotiques (notamment des  $\beta$ -lactamines et des aminosides), mais pas la délétion des 2 autres gènes, indiquant que SmeC pourrait intervenir comme OMF dans d'autres systèmes d'efflux (Li *et al.*, 2002).

**SmeDEF** exporte un large panel de substrats et participe à la résistance intrinsèque de *S. maltophilia* à de nombreux antibiotiques (Li *et al.*, 2002).

**SmeIJK** possède 2 composants RND (SmeJ et SmeK). L'OMF de ce système est inconnu (Crossman *et al.*, 2008).

**SmeYZ**, dont l'OMF n'est pas connu, participe à la résistance intrinsèque aux aminosides (Crossman *et al.*, 2008). Mais l'inactivation du gène *smeZ* (transporteur) ne restaure que partiellement l'activité des aminosides. La résistance aux aminosides de *S. maltophilia* est également enzymatique (Lambert *et al.*, 1999).

**SmeVWX** est codé par l'opéron *smeUI-smeV-smeW-smeU2-smeX*. Même si l'inactivation des ORFs *smeUI* et *smeU2* a un retentissement sur le phénotype de résistance aux antibiotiques de *S. maltophilia*, leur rôle dans le système d'efflux reste indéterminé. Ce système possède une autre particularité : sa surexpression entraîne une augmentation de la sensibilité aux aminosides. Il a été montré que cette augmentation de sensibilité était uniquement liée à la surexpression de *smeX* (codant pour l'OMF) (Chen *et al.*, 2011).

### c. BGN-NF non rencontrés en pathologie humaine

Divers systèmes d'efflux RND ont été décrits chez des bacilles à Gram négatifs non rencontrés en pathologie humaine.

*Cupriavidus metallidurans* (*ex-Alcaligenes eutrophus* et *ex-Ralstonia metallidurans*) est une espèce possédant différents systèmes d'efflux qui lui permettent de se développer dans des environnements à fortes concentrations en métaux (Mergeay *et al.*, 2003; Pompidor *et al.*, 2007; von Rozycki and Nies, 2009). Douze systèmes d'efflux RND susceptibles d'exporter des métaux ont été identifiés dans le génome de la souche *C. metallidurans* CH34 (De Angelis *et al.*, 2010; Mergeay *et al.*, 2003). Ces 12 systèmes putatifs appartiendraient à la sous-famille HME-RND (Heavy Metal Efflux-RND) dont les transporteurs exportent des métaux. Des travaux portant sur les systèmes CzcCBA (Nies *et al.*, 1987, 1989), CnrCBA (Liesegang *et al.*, 1993) et ZneCAB (De Angelis *et al.*, 2010) ont permis d'identifier différents métaux comme substrats (cobalt, zinc, cadmium et nickel). Le transport d'antibiotiques par ces systèmes d'efflux n'a pas été étudié.

Des espèces bactériennes phytopathogènes possèdent des systèmes d'efflux RND. Ils ont généralement un rôle essentiel dans la colonisation des plantes. *Agrobacterium tumefaciens* peut se protéger, par efflux actif (système IfeAB), contre les isoflavones produits par une luzerne (Palumbo *et al.*, 1998). *Burkholderia glumae*, qui est un phytopathogène du riz, produit une toxine (la toxoflavine) dont le transport extracellulaire requiert le système d'efflux ToxGHI (Kim *et al.*, 2004).

Certains des systèmes RND caractérisés dans des espèces phytopathogènes sont capables d'exporter des antibiotiques :

- L'inactivation d'*ameC* d'*Agrobacterium tumefaciens* modifie les CMI de certains antibiotiques (novobiocine et carbénicilline). L'efflux de ces molécules ne semble cependant pas être directement lié au système putatif AmeABC puisqu'aucune variation de CMI n'est entraînée par l'inactivation des gènes candidats *ameA* et *ameB*. Un autre système d'efflux pourrait fonctionner avec l'OMF AmeC (Peng and Nester, 2001).

- Chez *Pseudomonas syringae*, 2 systèmes d'efflux exportant des antibiotiques ont été décrits, dont un homologue de MexAB-OprM (Kang and Gross, 2005; Stoitsova *et al.*, 2008).
- Un homologue d'AcrAB (d'*E. Coli*) existe chez *Ralstonia solanacearum*. Ce système intervient dans la virulence envers les plantes que la bactérie est capable de coloniser, mais est aussi capable d'exporter l'ampicilline, la céphalexine et l'acide nalidixique. L'opéron possède un gène candidat d'OMF (Brown *et al.*, 2007).
- *Sinorhizobium meliloti*, symbiote de la luzerne, comporte au moins 3 systèmes RND capables d'exporter des molécules antibiotiques (Eda *et al.*, 2011).

### 3. Systèmes d'efflux chez *A. xylosoxidans*

Deux systèmes d'efflux impliqués dans la résistance à certains métaux ont été initialement décrits par Schmidt et Schlegel dans une souche d'*A. xylosoxidans* (*Alcaligenes xylosoxidans* 31A) isolée d'un environnement riche en cuivre (Schmidt and Schlegel, 1994). Cependant, cette souche d'*Alcaligenes xylosoxidans* 31A a été depuis identifiée *Ralstonia metallidurans* 31A (actuel *Cupriavidus metallidurans*) (Goris *et al.*, 2001; Mergeay *et al.*, 2003). Cette souche est résistante au nickel, au cobalt, au zinc, au cadmium et au cuivre. Les gènes des systèmes d'efflux responsables de cette résistance sont plasmidiques (plasmide pTOM9) :

- l'opéron *nccYXHCBAN* (accession L31363) dont les gènes *nccC*, *nccB* et *nccA* présentent une très forte homologie de séquence avec les gènes du système d'efflux RND CnrCBA et dans une moindre mesure avec ceux du système CzcCBA de *Cupriavidus metallidurans* CH34 (*ex-Alcaligenes eutrophus*),
- l'opéron *nreAB* (accession L31491) dont le gène *nreB* code pour un transporteur MFS (Grass *et al.*, 2001).

Les seuls transporteurs connus dans la famille des *Alcaligenaceae* sont des transporteurs MFS : TetC (Speakman *et al.*, 1997), AlcS (Brickman and Armstrong, 2005), FlorR et CmlB1 (Kadlec *et al.*, 2007). Ils ont été décrits au sein du genre *Bordetella*.

#### 4. Conclusion

Les systèmes d'efflux interviennent dans différentes fonctions physiologiques bactériennes et sont également utilisés comme mécanismes de protection vis-à-vis de l'environnement (détoxification). Leur panel de substrats est très variable et certains de ces systèmes sont impliqués dans la résistance bactérienne aux antibiotiques. Les systèmes d'efflux de la famille RND sont largement répandus chez les BGN-NF : certains n'exportent pas d'antibiotique alors que d'autres prennent en charge de nombreuses molécules couramment utilisées en thérapeutique. Les niveaux de résistance aux antibiotiques conférés par les systèmes d'efflux RND sont variables. C'est ainsi que, à l'état basal, AmrAB-OprA confère une résistance naturelle de haut niveau aux aminosides chez *B. pseudomallei* (CMI  $\geq 16$  mg/l chez la souche sauvage 1026b, Moore *et al.*, 1999) alors que MexXY/OprM ne confère que de bas niveaux de résistance aux aminosides chez *P. aeruginosa* (CMI  $\leq 4$  mg/l chez la souche sauvage PAO1, Aires *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2011).

# OBJECTIFS DU TRAVAIL

---



Aucun mécanisme impliqué dans la résistance naturelle d'*Achromobacter xylosoxidans* aux antibiotiques n'avait jamais été décrit au début de ce travail. Notre objectif était d'étudier les mécanismes responsables de cette résistance. Le choix d'orienter nos recherches vers la résistance par efflux a été guidé par l'observation des profils de résistance des souches cliniques isolées au laboratoire et par les connaissances actuelles concernant l'antibio-résistance des BGN-NF :

1) *A. xylosoxidans* résiste naturellement à tous les aminosides habituellement testés en bactériologie médicale (kanamycine, tobramycine, amikacine, gentamicine et nétilmicine). De façon générale, la résistance des bactéries aux aminosides peut être liée à des mécanismes :

- d'inactivation des aminosides par des enzymes modificatrices,
- de modification de la cible ribosomale (ARN16S) par méthylation,
- de modifications des lipopolysaccharides membranaires (LPS) empêchant les aminosides de franchir la membrane externe,
- d'efflux.

Cependant, les enzymes modificatrices habituellement produites par les BGN ne confèrent pas une résistance simultanée à tous les aminosides.

La méthylation de l'ARN16S n'est pas responsable de résistance naturelle aux aminosides chez les BGN-NF. Il s'agit d'un mécanisme de résistance acquise, médié par des gènes originaires de bactéries appartenant à l'ordre des *Actinomycetales* ou actinomycètes (Doi and Arakawa, 2007).

Les modifications des LPS n'entraînent que de faibles augmentations de CMI chez *P. aeruginosa* (El'Garch *et al.*, 2007).

En revanche, différents systèmes d'efflux sont connus pour être impliqués dans la résistance bactérienne aux aminosides. C'est le cas de MexXY/OprM de *P. aeruginosa* (résistance intrinsèque de bas niveau et résistance acquise) et d'AmrAB-OprA de *B. pseudomallei* (résistance naturelle à tous les aminosides). Même si les aminosides peuvent être substrats de pompes appartenant aux familles SMR (EmrE chez *P. aeruginosa*), ABC (LmrA chez *Lactococcus lactis*) ou MATE (NorM chez *Vibrio parahaemolyticus*), les principaux systèmes d'efflux impliqués dans la résistance aux aminosides chez les BGN-NF appartiennent à la famille RND.

2) *A. xylosoxidans* résiste aussi naturellement à certaines  $\beta$ -lactamines dont l'aztréonam et la plupart des céphalosporines. La résistance aux  $\beta$ -lactamines peut être la conséquence :

- d'une inactivation enzymatique (hydrolyse par des  $\beta$ -lactamases),
- d'une imperméabilité (défaut de franchissement de la membrane externe),
- de cibles (protéines liant la pénicilline ou PLP) présentant peu d'affinité pour les  $\beta$ -lactamines,
- d'efflux.

L'implication de  $\beta$ -lactamases dans la résistance naturelle d'*A. xylosoxidans* semble peu probable car les souches de phénotype sauvage sont résistantes à la plupart des céphalosporines mais sensibles à l'amoxicilline.

Les phénomènes d'imperméabilité sont du domaine de la résistance acquise plutôt que de celui de la résistance naturelle.

Les PLP d'*A. xylosoxidans* pourraient avoir peu d'affinité pour les céphalosporines ou l'aztréonam et cette hypothèse doit être envisagée.

Mais nous savons aussi que chez les BGN-NF de nombreux systèmes d'efflux sont capables d'exporter des  $\beta$ -lactamines. Parmi les 12 systèmes d'efflux RND de *P. aeruginosa*, 4 possèdent des  $\beta$ -lactamines dans leur panel de substrats.

**Ce faisceau d'arguments nous a donc conduits à rechercher spécifiquement la présence de systèmes d'efflux RND et à étudier leur implication dans la résistance naturelle d'*A. xylosoxidans* aux antibiotiques.**

**La stratégie que nous avons mise en œuvre est la suivante :**

**1) Détection de gènes candidats d'efflux RND chez *A. xylooxidans*, par 2 approches différentes :**

- au début de notre travail et avant que la première séquence génomique complète d'*A. xylooxidans* ne soit publiée : PCR consensus et marche sur le chromosome,
- séquençage du génome d'une souche d'*A. xylooxidans* de notre collection (souche AXX-A) puis recherche de gènes candidats par analyse bioinformatique.

**2) Etude de l'implication des gènes candidats dans la résistance naturelle d'*A. xylooxidans* aux antibiotiques.** Pour ceci nous avons utilisé une technique d'inactivation génique.

# MATERIELS ET METHODES

---

## I. Souches bactériennes

Toutes les souches d'*A. xylosoxidans* isolées au laboratoire depuis 1995 sont conservées. Les souches d'*A. xylosoxidans* utilisées pour ce travail proviennent pour la plupart de notre collection qui compte actuellement plus de 1000 souches. 4 souches proviennent de la collection de l'Institut Pasteur.

**Tableau 4. Souches utilisées (inactivations géniques).**

Souche	Description	Provenance
<b><i>Achromobacter xylosoxidans</i></b>		
AXX-A	Souche clinique (prélèvement d'oreille). Phénotype de résistance aux antibiotiques : sauvage sauf AMX <sup>I</sup> (TIC <sup>S</sup> et PIP <sup>S</sup> ).	Laboratoire
AXX-D3	Souche clinique (aspiration trachéale, patient présentant une BPCO et des séquelles restrictives de tuberculose). CIP <sup>R</sup> , CAZ <sup>R</sup> .	Laboratoire
AXX-H1	Souche clinique (expectoration, mucoviscidose). CIP <sup>R</sup> , CAZ <sup>R</sup> .	Laboratoire
AXX-H2	Souche isolée du même prélèvement qu'AXX-H1 (isogéniques, même profil génotypique ECP). Niveaux de résistance plus élevés qu'AXX-H1 à CIP, CAZ et carbapénèmes (IPM, MEM et DOR).	Laboratoire
AXX-A-ΔB	Recombinant suicide d'AXX-A, gène <i>axyB</i> inactivé ( <i>axyB</i> ::Tic).	Ce travail
AXX-A-ΔR	Recombinant suicide d'AXX-A, gène <i>axyR</i> inactivé ( <i>axyR</i> ::Tic).	Ce travail
AXX-A-ΔY	Recombinant suicide d'AXX-A, gène <i>axyY</i> inactivé ( <i>axyY</i> ::Tic).	Ce travail
AXX-A-ΔZ	Recombinant suicide d'AXX-A, gène <i>axyZ</i> inactivé ( <i>axyZ</i> ::Tic).	Ce travail
AXX-A-HRA	Mutant d'AXX-A obtenu sur gélose à la streptomycine, Hautement Résistant aux Aminosides.	Ce travail
AXX-A-ΔD	Recombinant suicide d'AXX-A, gène <i>axyD</i> inactivé ( <i>axyD</i> ::Tic).	Ce travail
AXX-D3-ΔB	Recombinant suicide d'AXX-D3, gène <i>axyB</i> inactivé ( <i>axyB</i> ::Tic).	Ce travail
AXX-D3-ΔY	Recombinant suicide d'AXX-D3, gène <i>axyY</i> inactivé ( <i>axyY</i> ::Tic).	Ce travail
AXX-H1-ΔB	Recombinant suicide d'AXX-H1, gène <i>axyB</i> inactivé ( <i>axyB</i> ::Tic).	Ce travail
AXX-H2-ΔB	Recombinant suicide d'AXX-H2, gène <i>axyB</i> inactivé ( <i>axyB</i> ::Tic).	Ce travail
AXX-H2-ΔY	Recombinant suicide d'AXX-H2, gène <i>axyY</i> inactivé ( <i>axyY</i> ::Tic).	Ce travail
AXX-H2-ΔD	Recombinant suicide d'AXX-H2, gène <i>axyD</i> inactivé ( <i>axyD</i> ::Tic).	Ce travail
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH5α	Souche utilisée pour la construction de plasmides suicide.	Invitrogen
Stellar <sup>TM</sup>	Souche utilisée pour la construction de plasmides suicide (kit In-Fusion <sup>®</sup> HD).	Clontech

**AMX** : amoxicilline ; **BPCO** : bronchopneumopathie chronique obstructive ; **CAZ** : ceftazidime ; **CIP** : ciprofloxacine ; **DOR** : doripénème ; **ECP** : électrophorèse en champs pulsé ; **IPM** : imipénème ; **MEM** : méropénème ; **PIP** : pipéracilline ; **TIC** : ticarcilline ; <sup>S</sup> : sensible ; <sup>I</sup> : intermédiaire ; <sup>R</sup> : résistant.

D'autres souches bactériennes ont été utilisées ponctuellement durant ce travail de thèse :

- des **souches cliniques** d'*A. xylosoxidans* et d'*A. denitrificans* isolées, pour la plupart, d'expectorations de patients du CRCM de Dijon, et pour certaines, d'autres types de prélèvement (hors mucoviscidose),
- des **souches environnementales** d'*A. xylosoxidans* isolées sur le CHU de Dijon : AXX-ENV1 (fauteuil dentaire) et AXX-ENV2 (évier),
- des **souches de la Collection de l'Institut Pasteur** (CIP) : *A. xylosoxidans* (4 souches : AXX-CIP71.32T, AXX-CIP101.902, AXX-CIP102.062 et AXX-CIP102.236), *A. denitrificans* (AXD-CIP77.15T), *A. insolitus* (AI-CIP108.202T), *A. piechaudii* (AP-CIP60.75T), *A. ruhlandii* (AR-CIP77.26T) et *A. spanius* (AS-CIP108.199T).

Toutes les souches d'*Achromobacter xylosoxidans* utilisées ont été identifiées par galerie biochimique 20NE (bioMérieux) et par séquençage de 1483 nucléotides du gène *rrs* codant pour l'ARN ribosomique 16S.

## II. Cultures bactériennes

Les milieux de culture Luria Bertani (Tryptone 10g, extrait de levure 5g, NaCl 10g, eau distillée qsp 1 litre) et Mueller-Hinton Broth (Oxoid) sont utilisés pour les cultures bactériennes en milieu liquide.

Le milieu Mueller-Hinton Agar (Oxoid) est utilisé pour les cultures bactériennes en milieu gélosé.

Toutes les cultures sont incubées à 37°C, en étuve pour les milieux gélosés et au bain-marie avec agitation pour les milieux liquides.

### III. Plasmides

**Tableau 5. Plasmides utilisés.**

<b>Plasmide</b>	<b>Description</b>	<b>Référence</b>
<b>pUC18</b>	Vecteur de clonage multicopies. Taille = 2686 pb. Porte un gène codant pour une pénicillinase : <i>bla</i> (Amp <sup>R</sup> ).	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
<b>pUC19</b>	Séquence et taille identiques à pUC18 mais la séquence du site de clonage multiple (MCS) est inversée.	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
<b>pJDB2</b>	Plasmide extrait d'une souche clinique d' <i>Aeromonas caviae</i> . Taille = 35 kb.	(Neuwirth <i>et al.</i> , 2007)
<b>pINA-axyB-AXX-A</b> (= pINAP1 de l'article 1)	Plasmide suicide pour l'inactivation d' <i>axyB</i> dans AXX-A. Fragment interne à <i>axyB</i> (977 pb) cloné dans pUC18.	Ce travail
<b>pINA-axyB-AXX-D3</b>	Plasmide suicide pour l'inactivation d' <i>axyB</i> dans AXX-D3. Fragment interne à <i>axyY</i> (977 pb) cloné dans pUC18.	Ce travail
<b>pINA-axyB-AXX-H</b>	Plasmide suicide pour l'inactivation d' <i>axyB</i> dans AXX-H1 et AXX-H2. Fragment interne à <i>axyY</i> (977 pb) cloné dans pUC18.	Ce travail
<b>pINA-axyR-AXX-A</b>	Plasmide suicide pour l'inactivation d' <i>axyR</i> dans AXX-A. Fragment interne à <i>axyR</i> (837 pb) cloné dans pUC18.	Ce travail
<b>pINA-axyY-AXX-A</b>	Plasmide suicide pour l'inactivation d' <i>axyY</i> dans AXX-A. Fragment interne à <i>axyY</i> (755 pb) cloné dans pUC19.	Ce travail
<b>pINA-axyY-AXX-D3</b>	Plasmide suicide pour l'inactivation d' <i>axyY</i> dans AXX-D3. Fragment interne à <i>axyY</i> (755 pb) cloné dans pUC19.	Ce travail
<b>pINA-axyY-AXX-H2</b>	Plasmide suicide pour l'inactivation d' <i>axyY</i> dans AXX-H2. Fragment interne à <i>axyY</i> (755 pb) cloné dans pUC19.	Ce travail
<b>pINA-axyZ-AXX-A</b>	Plasmide suicide pour l'inactivation d' <i>axyZ</i> dans AXX-A. Fragment d' <i>axyZ</i> et de la séquence intergénique entre <i>axyZ</i> et <i>axyX</i> (669 pb) cloné dans pUC19.	Ce travail
<b>pINA-axyD-AXX-A</b>	Plasmide suicide pour l'inactivation d' <i>axyD</i> dans AXX-A. Fragment interne à <i>axyD</i> (727 pb) cloné dans pUC18.	Ce travail
<b>pINA-axyD-AXX-H2</b>	Plasmide suicide pour l'inactivation d' <i>axyD</i> dans AXX-H2. Fragment interne à <i>axyD</i> (922 pb) cloné dans pUC19.	Ce travail

#### IV. Antibiogrammes

Les antibiogrammes sont réalisés par la méthode de diffusion en milieu gélosé Mueller-Hinton (MH). La gélose estensemencée par inondation à partir d'une suspension bactérienne (en eau stérile) équivalente au standard McFarland 0,5 diluée au 1/1000. Les disques d'antibiotiques (Bio-Rad) sont ensuite déposés sur la gélose. La lecture des diamètres des zones d'inhibition est réalisée après 24 heures d'incubation à 37°C en aérobiose. Les diamètres critiques définis par le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM) sont utilisés pour l'interprétation.

#### V. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les premières déterminations de CMI de ce travail ont été effectuées par la méthode de microdilution en milieu liquide (MH). Mais celle-ci s'est révélée inappropriée pour l'étude des souches recombinantes (inactivation génique par insertion d'un plasmide suicide). La lecture des CMI était en effet perturbée par une croissance bactérienne correspondant à des révertants spontanés.

Nous avons retenu la méthode du E-test, après vérification de la concordance des résultats obtenus par cette méthode et par la méthode de dilution en milieu gélosé (Tableau 6). De plus, l'utilisation de bandelettes E-test a été rapportée pour l'étude du système d'efflux AdeABC-like dans le genre *Acinetobacter* (Roca *et al.*, 2011).

**Tableau 6. CMI (mg/l) mesurées par 2 méthodes différentes.**

	E-test	Dilution en milieu gélosé (MH)
<b><u>Souche CIP 7132T</u></b>		
Ceftazidime	6	8
Tobramycine	≥256	512
Ciprofloxacine	32	16
<b><u>Souche AXX-A</u></b>		
Ceftazidime	4	4
Tobramycine	16	32
Ciprofloxacine	0,75	1



Les bandelettes antibiotiques E-test (bioMérieux) sont déposées sur gélose MH ensemencée par inondation avec une suspension bactérienne (en eau stérile) équivalente au standard McFarland 1 diluée au 1/1000. La lecture est réalisée après 48 heures d'incubation à 37°C en aérobiose. Ces conditions ont été retenues suite à des essais sur plusieurs souches dont certaines de croissance difficile. La technique d'inondation des géloses a été retenue par rapport à la technique d'écouvillonnage en raison d'une meilleure précision de lecture des CMI et après vérification de la concordance des résultats entre ces 2 techniques. Les mesures sont réalisées en double à partir de 2 suspensions différentes. Une troisième mesure est réalisée lorsqu'il y a un écart entre les 2 premières. L'écart entre 2 mesures est généralement inférieur ou égal à une graduation de bandelette (bonne reproductibilité). Le milieu MH utilisé pour les souches recombinantes (plasmide suicide) est supplémenté par 50 mg/l de ticarcilline afin de prévenir l'apparition de colonies de révertants spontanés pouvant gêner la lecture des CMI.

## VI. Utilisation d'inhibiteurs d'efflux

L'effet de 4 inhibiteurs d'efflux sur le phénotype de résistance d'*A. xylooxidans* a été étudié. Chacun des EPIs est incorporé en gélose MH. Les concentrations choisies correspondent à ce qui a été décrit dans la littérature (Brenwald *et al.*, 1997; Everett *et al.*, 1996; Peleg *et al.*, 2007; Tran *et al.*, 2009; Vidaillac *et al.*, 2007). Ces concentrations sont considérées non inhibitrices de croissance bactérienne :

- réserpine : 10 mg/l
- oméprazole : 130 mg/l
- CCCP : 100 µM
- PABN : 30 mg/l

Des antibiogrammes sont réalisés en parallèle sur gélose MH additionnée d'EPI et sur gélose MH sans EPI. Les diamètres des zones d'inhibition sont comparés après 24 heures d'incubation.

## VII. Techniques d'extraction des acides nucléiques bactériens

### 1. Extraction d'ADN génomique

#### a. Par choc thermique

Une suspension bactérienne en eau pour préparation injectable (EPPI) est centrifugée (20000 g, 5 min, 4°C). Le culot, repris dans 300 µl d'EPPI, est porté à ébullition pendant 10 min puis refroidi 10 min dans la glace. Après centrifugation, le surnageant contenant l'ADN bactérien est recueilli. Les tubes d'ADN sont conservés à -20°C.

#### b. Par lyse chimique

Cette technique d'extraction entraîne peu d'altérations de l'ADN. Elle a été utilisée pour extraire l'ADN de la souche AXX-A en vue du séquençage complet de son génome.

Une culture de la souche dans 50 ml de milieu liquide MH (16 h à 37°C sous agitation) est centrifugée (3000 g, 10 min, 4°C). Le culot est repris dans 1 ml de tampon TES (Tris 25 mM, EDTA 10 mM, sucrose 600 mM, pH8) et 280 µl de lysozyme (solution à 20 mg/ml en TES, reconstituée extemporanément) et incubé 1 heure à 37°C. 200 µl de SDS (à 20% dans de l'eau), 240 µl d'EDTA (250 mM) et 2 mg de protéinase K sont ajoutés. Le mélange est incubé une nuit à 37°C. L'élimination des protéines est réalisée par extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (AIA) (24/24/1), volume à volume. Après agitation douce par retournements puis centrifugation (16000 g, 10 min, 15°C) la phase supérieure est transférée dans un nouveau tube. Un second traitement au phénol/chloroforme/AIA puis 2 traitements au chloroforme-AIA sont réalisés. La phase supérieure contenant l'ADN est récupérée. L'ADN est précipité à l'isopropanol, récupéré avec une pipette Pasteur en verre, rincé à l'éthanol à 70% et repris dans 200 µl d'EPPI.

## 2. Extraction d'ADN plasmidique

### a. Extraction de plasmide par la méthode de Kieser

Cette technique d'extraction d'ADN plasmidique décrite par Kieser (Kieser, 1984) est utilisée uniquement pour détecter la présence de plasmides dans des souches bactériennes. A partir d'une culture de la souche en milieu gélosé, 5 à 6 colonies sont ajoutées à 500 µl de solution de Kieser (sucrose 300 mM, Tris pH8 25 mM, EDTA pH8 25 mM, vert de bromocrésol 0,02%) et lysées par 250 µl de solution de lyse (NaOH 200 mM, SDS 2%). Après une incubation de 30 min à 55°C, les protéines sont précipitées par l'ajout de 250 µl de phénol-chloroforme (1/1). Après centrifugation (10 min, 17000 g, 4°C), 20 µl de la phase supérieure sont migrés par électrophorèse en gel d'agarose à 0,8% en tampon TAE (Tris acétate 40 mM, EDTA 1 mM).

### b. Extraction de plasmide pour clonage et transformation

L'ADN plasmidique est extrait, à partir d'une culture de la nuit en milieu LB additionné d'antibiotique, avec le kit Plasmid Midi (Qiagen) selon les recommandations du fabricant.

## 3. Extraction des ARN totaux

Une pré-culture de la souche en milieu liquide LB est repiquée dans 20 ml du même milieu et incubée à 37°C sous agitation jusqu'à une densité optique de 1 (à 600 nm) (milieu de phase exponentielle). La valeur de l'absorbance au moment de l'arrêt de la culture doit être toujours la même car le niveau d'expression de nombreux gènes, dont des gènes d'efflux, dépend de la phase de croissance (Evans and Poole, 1999; Stoitsova *et al.*, 2008). 0,5 ml de cette culture est traité avec 1 ml de RNAlprotect<sup>®</sup> Bacteria Reagent (Qiagen). L'ARN est extrait avec le kit RNeasy Mini (Qiagen) avec une élution finale dans 60 µl d'eau RNase free. L'éluat est traité avec 20 unités de DNase RNase free (Promega). L'ARN est précipité par l'ajout de 2 volumes d'éthanol absolu froid et 1/10 volume d'acétate de sodium, et placé à -20°C pour la nuit. Le culot de centrifugation (15 min, 15000 g, 4°C) est lavé 2 fois avec de l'éthanol à 70% puis repris dans 30 µl d'eau RNase free. La réaction de reverse transcription (RT) est réalisée immédiatement après la mesure de la concentration en ARN par spectrophotométrie.

## VIII. Amplification génique par PCR

Mélange réactionnel (concentrations finales entre crochets) :

- dNTP [0,2 mM]
- amorces [0,25  $\mu$ M chacune]
- tampon de Taq [1X]
- MgCl<sub>2</sub> [1,5 mM]
- Taq polymérase (Fermentas) : 2,5 U
- DMSO [5%]
- ADN : 1  $\mu$ l
- EPPI : qsp 50  $\mu$ l

L'ajout de DMSO favorise la dénaturation de l'ADN chromosomique d'*A. xylooxidans* dont le contenu en GC est élevé (65 à 70%). Le DMSO n'est pas utilisé pour les PCR réalisées sur de l'ADN d'*E. coli* ou de l'ADN plasmidique.

Conditions d'amplification (thermocycleur T3, Biometra) :

- 94°C, 10 min
  - 94°C, 1 min
  - Th, 1 min 30 s
  - 72°C, 1 min 30 s
  - 72°C, 10 min
- } 30 cycles

*Th* : température d'hybridation des amorces.

Toutes les amorces utilisées dans ce travail sont répertoriées dans l'annexe 2 (p 122).

## IX. Electrophorèse analytique des ADN

Les produits de PCR, les produits de digestion enzymatique et les plasmides sont analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 1% en tampon TAE (Tris acétate 40 mM, EDTA 1 mM). La migration est réalisée à 130 volts. La lecture est effectuée sous ultra-violets après coloration par le bromure d'éthidium. Les marqueurs de taille 100 pb DNA Ladder et 1 kb DNA Ladder (New England BioLabs) sont utilisés pour déterminer la taille des ADN. Le marqueur Low DNA Mass Ladder permet d'estimer la concentration en ADN.

## X. Dosage des acides nucléiques par spectrophotométrie

Les concentrations en ADN (produits de PCR à séquencer et produits de digestion enzymatique avant ligation) et en ARN (extraits d'ARN totaux avant reverse transcription) sont mesurées avec le spectrophotomètre NanoDrop<sup>®</sup> ND1000 (Labtech).

## XI. Séquençage d'ADN

### 1. Séquençage des produits de PCR par la méthode de Sanger

Les produits de PCR sont purifiés avec le kit Amicon Ultra (Millipore). Ils sont ensuite séquencés selon la méthode décrite par Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Il s'agit d'une méthode de séquençage par synthèse. L'élongation des brins d'ADN par la polymérase est stoppée de façon aléatoire suite à l'incorporation d'un didésoxyribonucléotide triphosphate (ddNTP). Chacun des 4 ddNTP, présent en faible proportion par rapport au dNTP correspondant, est marqué par un fluorochrome spécifique.

Mélange réactionnel :

- tampon de BigDye : 3  $\mu$ l
- BigDye v1.1 (dNTP, ddNTP et ADN polymérase) (Applied Biosystems) : 2  $\mu$ l
- amorce [0,25  $\mu$ M]
- ADN (2 ng pour 100 pb à séquencer)
- EPPI : qsp 20  $\mu$ l

Conditions d'élongation (thermocycleur T3, Biometra) :

- 96°C, 1 min
  - 96°C, 10 s
  - 50°C, 5 s
  - 60°C, 4 min
- } 25 cycles

Les produits de séquençage sont par la suite purifiés par ajout de 1/10 V d'acétate de sodium (3M pH5,2), 1/10 V d'EDTA (125 mM) et 2,5 V d'éthanol absolu glacé, et incubés 15 min à température ambiante. Les culots de centrifugation (15 min, 15000 g, 4°C) sont lavés par 70  $\mu$ l d'éthanol à 70% (centrifugation 10 min dans les mêmes conditions) puis séchés à l'air.

Enfin ils sont repris dans 10 µl de formamide et conservés à -20°C avant passage dans le séquenceur à capillaires ABI PRISM® 3100 (Applied Biosystems).

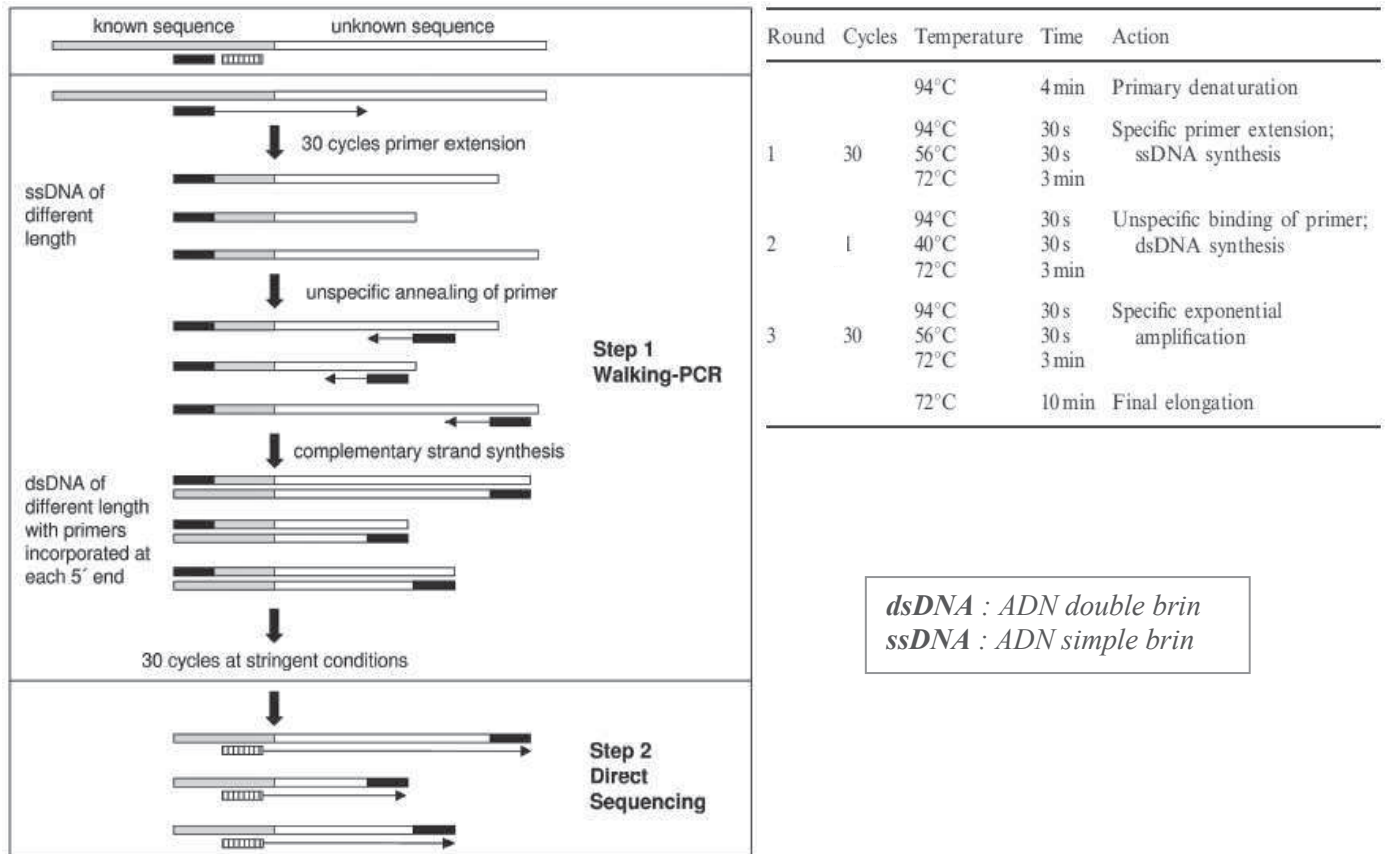
## 2. Séquençage à haut débit

Le séquençage du génome de la souche AXX-A a été réalisé par la société Genoscreen. Un séquençage en shotgun et 2 séquençages en paired-end (8 kb et 20 kb) ont été réalisés avec l'appareil de pyroséquençage GS-FLX (Roche). Le pyroséquençage est une méthode de séquençage par synthèse. Les dNTP sont ajoutés successivement. Lorsqu'un dNTP est incorporé dans le brin en cours de synthèse, un pyrophosphate est libéré, et l'action d'une sulfurylase puis d'une luciférase entraîne l'émission d'un signal lumineux.

Il s'agissait d'un séquençage « *de novo* » car aucun génome d'*A. xylooxidans* n'avait été publié auparavant. Le logiciel GSAssembler a été utilisé pour l'assemblage *de novo*. Pour l'annotation du génome, nous avons eu recours à l'outil « Prokaryotic Genomes Annotation Pipeline » du National Center for Biotechnology Information (NCBI).

## XII. Marche sur le chromosome

La technique de « marche sur le chromosome » permet d'amplifier et de séquencer les régions adjacentes (inconnues) d'une séquence nucléotidique connue. Nous avons utilisé la méthode de « marche sur le chromosome en 2 étapes » (Figure 22, p 74) décrite par Pilhofer (Pilhofer *et al.*, 2007) jusqu'à la publication de la première séquence génomique d'*A. xylooxidans* (AXX-A8). Chaque nouvelle séquence obtenue par cette méthode est vérifiée par PCR et séquençage avec d'autres amorces que celles utilisées pour la marche.



**Figure 22. Principe de la marche sur le chromosome en 2 étapes (Pilhofer *et al.*, 2007).**

*La première étape permet, à l'aide d'une seule amorce (■), la synthèse de fragments d'ADN constitués de l'extrémité de la séquence connue suivie de la séquence adjacente inconnue. La synthèse du brin complémentaire est possible par hybridation non spécifique de l'amorce à 40°C dans la partie inconnue.*

*La seconde étape consiste à séquencer la partie inconnue à l'aide d'une 2<sup>ème</sup> amorce (□).*

### XIII. Inactivation génique

#### 1. Inactivation génique par insertion d'un plasmide suicide

Les vecteurs pUC18 et pUC19 sont utilisés pour la construction des plasmides suicide. La sélection des transformants et des recombinants s'opère sur gélose additionnée de ticarcilline car pUC18 et pUC19 portent le gène *bla*(Amp<sup>R</sup>) qui code pour une pénicillinase. L'absence de répllication de ces vecteurs chez *A. xylosoxidans* a été vérifiée lors d'essais d'électroporation conduits selon le protocole décrit dans la partie XIII.1.b (p 76).

#### a. Construction du plasmide suicide

##### ❖ Par une technique de clonage conventionnel

- Amplification par PCR d'un fragment de 0,5 à 1 kb du gène à inactiver :

Les amorces utilisées sont flanquées d'une séquence contenant un site de restriction (EcoRI pour l'amorce sens et HindIII pour l'amorce anti-sens). Au produit de PCR sont ajoutés 1/10V d'acétate de sodium 3M pH5,2 et 2 V d'éthanol absolu glacé. Le tube est placé une nuit à -20°C. Après centrifugation (30 min, 15000 g, 4°C) le surnageant est éliminé. Le culot d'ADN est séché et repris dans 30 µl d'EPPI.

- Double digestion du produit de PCR et du plasmide pUC18 :

Un mélange contenant 5 µl d'ADN plasmidique ou 16 µl de produit de PCR purifié, 2 µl de tampon [1X], 2 µl de BSA [100 µg/ml], 1 µl d'enzyme EcoRI, 1 µl d'enzyme HindIII (New England BioLabs), sous un volume total de 20 µl complété avec de l'EPPI est incubé 3 h à 37°C. Les produits de digestion sont purifiés de la même façon que le produit de PCR précédent puis l'ADN est quantifié au spectrophotomètre.

- Ligation de l'insert et du plasmide pUC18 digérés :

Pour la ligation, un mélange réactionnel contenant 60 ng de pUC18 digéré, 70 ng de produit de PCR digéré (insert) (rapport insert/plasmide : 3/1), 2 µl de tampon de ligation et 1 µl de ligase (T4 DNA ligase, Roche) est incubé une nuit à 4°C.

- Transformation :

La souche d'*E. coli* DH5α est rendue compétente par 2 lavages successifs (dans le froid) avec une solution de chlorure de calcium à 50 mM (dans ½ volume puis dans ¼ volume) et reprise avec cette même solution dans un volume final égal au 1/20 du volume de culture initiale. La souche compétente (100 µl) est transformée avec le produit de la ligation (5 µl) par choc thermique : le mélange est placé 30 min dans la glace, 1 min à 42°C puis 10 min dans la glace.



Les transformants sont sélectionnés sur gélose MH contenant 50 mg/l de ticarcilline et 40 mg/l de X-Gal. Un criblage blanc / bleu (gène *lacZ* du pUC18) permet de repérer les clones contenant la construction attendue. Une PCR (amorces M14F / M14R) et un séquençage permettent de vérifier la construction.

❖ Par le kit de clonage In-Fusion<sup>®</sup> HD (Clontech)

● Préparation de la construction plasmidique :

Un fragment de 0,5 à 1 kb du gène à inactiver est amplifié par PCR. Les amorces utilisées sont flanquées de 15 nucléotides identiques aux extrémités du plasmide pUC19 linéarisé (fourni dans le kit). 2 µl du réactif « cloning enhancer » sont ajoutés à 5 µl du produit de PCR. Le mélange est incubé 15 min à 37°C. Une réaction faisant intervenir le mélange enzymatique du kit, l'insert et le plasmide pUC19 linéarisé (rapport 2 pour 1) a lieu pendant 15 min à 50°C.

● Transformation :

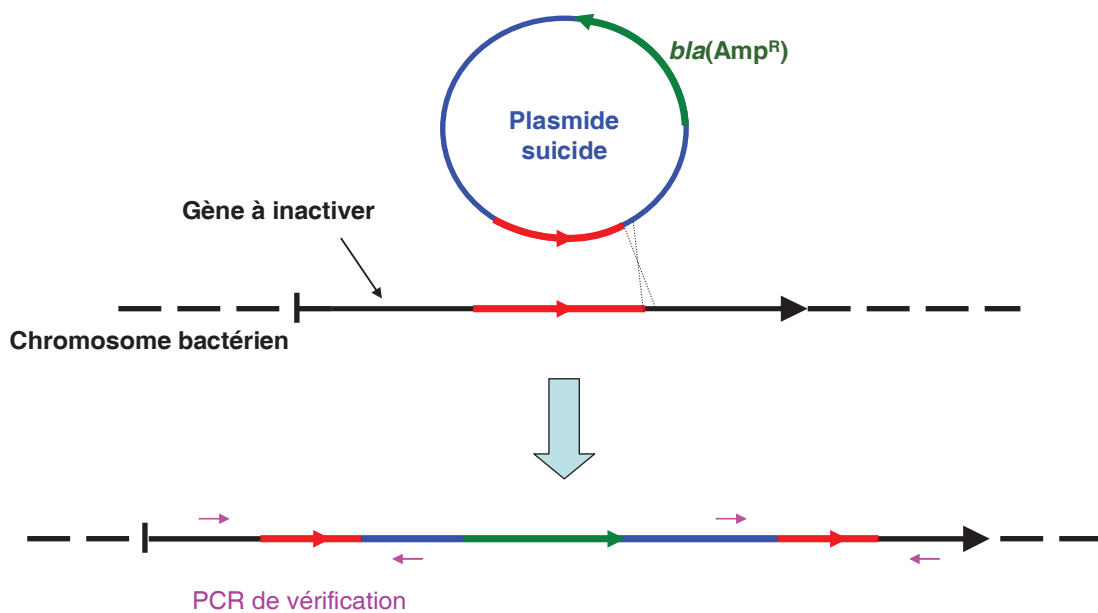
Les cellules compétentes *E. coli* Stellar fournies dans le kit sont traitées par choc thermique en présence de 2,5 µl de la réaction précédente. Les transformants sont sélectionnés sur gélose MH contenant 50 mg/l de ticarcilline. Une PCR (amorces M14F / M14R) et un séquençage permettent de vérifier la construction.

b. Transformation d'*A. xylooxidans* par électroporation

Les cellules bactériennes sont électroporées selon la méthode décrite par Smith et Iglewski pour la transformation de *P. aeruginosa* (Smith and Iglewski, 1989). Un travail préalable de mise au point a permis son adaptation chez *A. xylooxidans*. Le plasmide pJDB2 supposé « large spectre » (extrait d'une souche clinique d'*Aeromonas caviae* et se répliquant chez *Escherichia coli*, Neuwirth *et al.*, 2007) a été introduit dans AXX-A par électroporation. Une extraction de plasmide par la méthode de Kieser a ensuite démontré le succès de la transformation.

La souche d'*A. xylosoxidans* est rendue compétente par une succession de 2 lavages (dans le froid) avec une solution de sucrose à 300 mM (dans 1 volume puis dans ½ volume) et reprise avec cette même solution dans un volume final égal au 1/100 du volume de culture initiale. 5µl d'ADN plasmidique (concentration > 100 ng/µl) sont ajoutés à 60 µl de bactéries compétentes. Le mélange est transféré dans une cuvette Bio-Rad de 0,1 cm. Après 10 min d'incubation dans la glace, le mélange est soumis à un choc électrique de 15 kV/cm (appareil MicroPulser™, Bio-Rad) puis repris dans 1 ml de bouillon LB.

Une recombinaison homologue se produit entre la séquence génique insérée dans la construction plasmidique et la séquence identique sur le chromosome bactérien. L'incorporation du plasmide dans le gène permet son inactivation (Figure 23).



**Figure 23. Recombinaison entre le plasmide suicide et le chromosome bactérien.**

Le plasmide suicide contient **une séquence** issue du **gène à inactiver**. La recombinaison se produit au niveau de cette séquence commune. L'insertion du plasmide au milieu du gène est **vérifiée par PCR et séquençage** des zones de recombinaison. **bla(Amp<sup>R</sup>)** : gène codant pour une pénicillinase.

### c. Vérification de l'inactivation du gène par PCR et RT-PCR

Le séquençage des zones de recombinaison permet de vérifier l'insertion du plasmide suicide dans le gène cible.

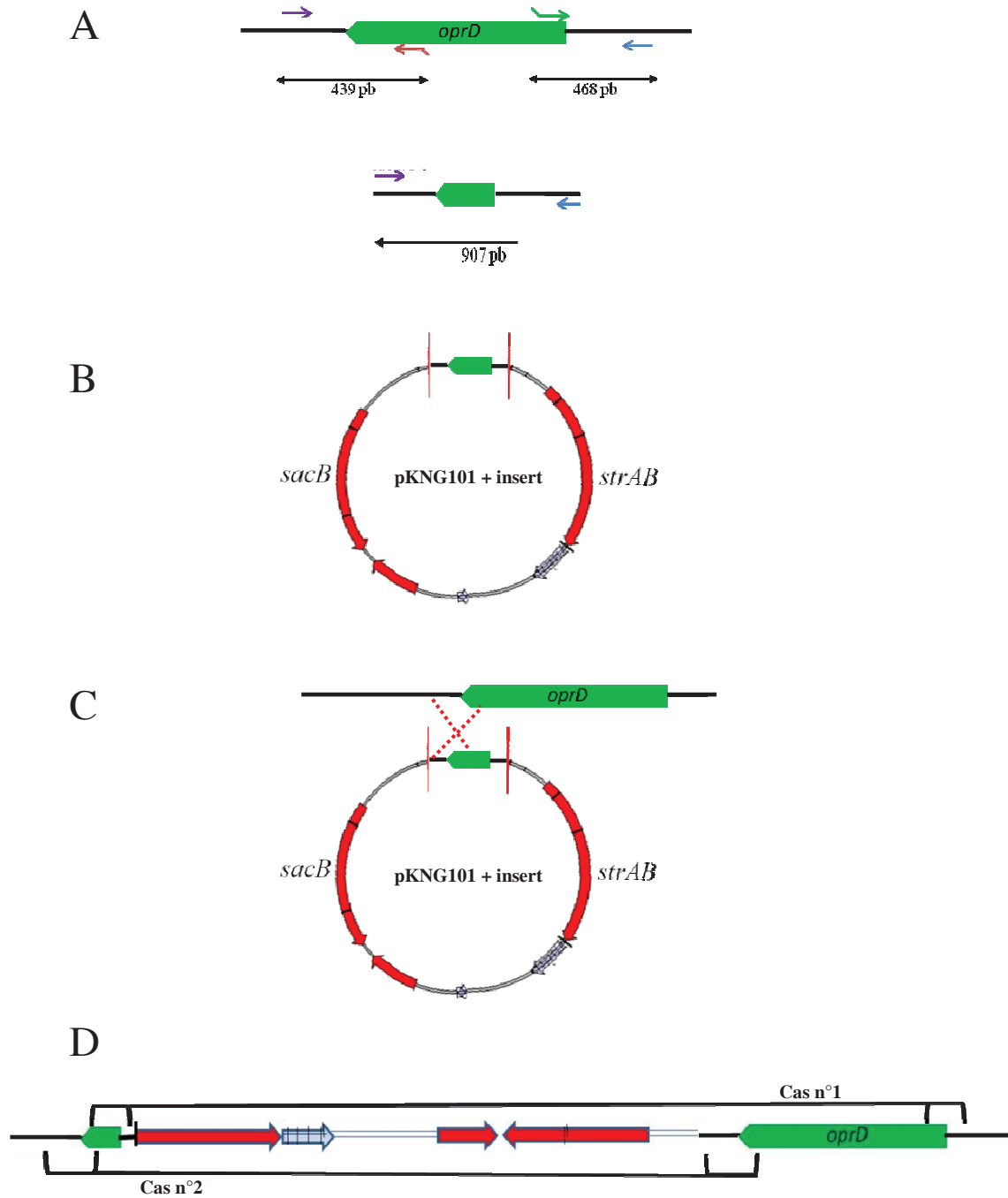
L'absence d'expression du gène inactivé dans la souche recombinante est vérifiée par reverse transcription-PCR (RT-PCR). La souche d'origine sert de témoin positif. Les ARN totaux de la souche d'origine et du recombinant sont extraits et traités par une DNase. La synthèse d'ADNc est réalisée à partir d'1 µg d'ARN par reverse transcription avec le kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) selon les recommandations du fabricant et en utilisant une amorce anti-sens s'hybridant en aval du site de recombinaison sur le gène inactivé. Les paliers de température utilisés sont : 5 min à 25°C, 30 min à 42°C, 30 min à 50°C et 15 min à 70°C. 5 µl du produit de RT sont utilisés dans une réaction de PCR avec l'amorce anti-sens de la RT couplée à une amorce sens s'hybridant en amont du site de recombinaison sur le gène inactivé. Une RT-PCR ciblant le gène de ménage *rpsL* sert de témoin positif. De plus, un contrôle sans transcriptase inverse permet de vérifier l'absence d'ADN génomique résiduel. La négativité de la RT-PCR chez le recombinant (et une RT-PCR positive chez la souche d'origine) témoigne de l'absence d'expression du gène.

## 2. Inactivation génique par délétion

Une autre stratégie d'inactivation génique a été décrite par Kaniga et ses collaborateurs dans l'espèce *Yersinia enterocolitica* (Kaniga *et al.*, 1991), et utilisée depuis pour *P. aeruginosa* (Muller *et al.*, 2011). Elle consiste à amplifier 2 régions du gène à inactiver et à les fusionner par une réaction de PCR chevauchante (Figure 24, p 80). Ce produit de PCR chevauchante est cloné dans le plasmide suicide pKNG101. Ce plasmide contient les gènes *strA* et *strB* codant pour la streptomycine phosphotransférase et le gène *sacB* dont l'expression est létale en présence de saccharose. La construction plasmidique est introduite dans la souche étudiée par conjugaison et s'insère au niveau du gène à inactiver par recombinaison homologue. Les recombinants, sélectionnés sur milieu additionné de 2000 mg/l de streptomycine, sont ensuite cultivés sur milieu additionné de 5% de saccharose, conduisant à l'excision du plasmide suicide. Deux événements génétiques différents (de recombinaison) peuvent conduire à cette excision. Un de ces 2 événements conduit à la délétion du gène d'intérêt (fragment situé entre les 2 régions amplifiées initialement).

Par rapport à la technique d'inactivation génique par insertion d'un plasmide suicide, cette technique présente plusieurs avantages :

- la résistance introduite (à la streptomycine) disparaît au moment de l'excision du plasmide. La souche recombinante finale ne contient donc pas de gène de résistance (de sélection) susceptible d'interférer sur le phénotype de résistance aux antibiotiques,
- elle permet l'inactivation successive de plusieurs gènes dans une même souche.



**Figure 24.** Inactivation génique par délétion (d'après Fournier D., laboratoire de bactériologie du CHU de Besançon).

*A* : Amplification et fusion des 2 extrémités du gène par PCR chevauchante.

*B* : Insertion du produit de PCR chevauchante dans le plasmide *pKNG101*.

*C* : Recombinaison homologue entre le plasmide et le chromosome bactérien.

*D* : Exposition de la bactérie au saccharose et excision du plasmide (2 évènements génétiques possibles). Dans le cas n°1, l'excision s'accompagne de l'inactivation du gène.

#### XIV. Quantification relative de l'expression génique par RT-PCR en temps réel

##### 1. Synthèse d'ADN complémentaire (ADNc)

La synthèse d'ADNc est réalisée à partir d'1 µg d'ARN total, par reverse transcription avec le kit ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) selon les recommandations du fabricant et en utilisant les amorces aléatoires du kit. Les paliers de température utilisés sont : 5 min à 25°C, 60 min à 42°C et 15 min à 70°C. Un contrôle sans transcriptase inverse permet de vérifier l'absence d'ADN génomique (les échantillons d'ARN sont préalablement traités par une DNase). Des dilutions des ADNc sont réalisées (1/10, 1/100 et 1/1000) et réparties en aliquotes de 5 µl. Les tubes d'ADNc sont conservés à -20°C jusqu'à amplification.

##### 2. Amplification de l'ADNc

La PCR quantitative est réalisée sur un appareil LightCycler® 2.0 (Roche). Le mélange réactionnel comprend 4 µl de MasterMix du kit LightCycler® FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I (Roche), 1 µl de chaque amorce (dilutions à 10 µM) et 4 µl d'ADNc. Le volume final est ajusté à 20 µl avec de l'eau. L'amplification comprend 40 cycles. Chaque série comprend la gamme de dilutions d'ADNc (1/10, 1/100 et 1/1000), le témoin négatif de RT (sans transcriptase inverse) et un témoin négatif (eau à la place de l'ADNc). Pour chaque souche une série ciblant le gène de ménage *rpsl* (codant pour une protéine ribosomique) est réalisée, en parallèle des autres gènes cibles. Au terme de l'amplification les courbes de fusion attestent de la spécificité des réactions.

### 3. Quantification relative des ARNm

La méthode décrite par Pfaffl permet de calculer la quantité relative d'un ARNm dans une souche donnée par rapport à une souche de référence (Pfaffl, 2001). Il s'agit d'un ratio dont le calcul est le suivant :

$$\text{Ratio} = (E_{\text{cible}})^{\Delta CT_{\text{cible}}(A-B)} / (E_{\text{rpsl}})^{\Delta CT_{\text{rpsl}}(A-B)}$$

*A* : souche de référence ; *B* : souche étudiée ; *E* : efficacité de la PCR ; **cible** : gène dont on veut mesurer le niveau d'expression relatif ; **rpsl** : gène de ménage ; **CT** : cycle threshold.

Le calcul de l'efficacité d'une PCR (pour un couple d'amorces donné) tient compte de la pente d'une droite-étalon obtenue avec une gamme de dilutions d'ADN (1/10, 1/100 et 1/1000).

Le CT correspond au nombre de cycles nécessaires à l'obtention d'une augmentation significative d'intensité de fluorescence (phase exponentielle).

# RESULTATS

---



## I. Effet des inhibiteurs d'efflux

Nous avons étudié l'effet d'inhibiteurs d'efflux sur le phénotype de résistance aux antibiotiques de la souche AXX-A. Une augmentation de diamètre des zones d'inhibition autour de certains disques d'antibiotiques a été observée en présence de réserpine ou d'oméprazole (Tableaux 7 et 8).

**Tableau 7. Diamètres des zones d'inhibition (mm) autour de disques d'antibiotiques en l'absence et en présence de réserpine (souche AXX-A).**

	Sans réserpine	Avec réserpine
Céfépime	6	11
Cefsulodine	15	20
Ofloxacine	15	22
Ciprofloxacine	31	37
Doxycycline	12	18
Tigécycline	17	21
Sulfadiazine	45	54

*Pas de différence pour les pénicillines, la céfalotine, la céfoxitine, le céfotaxime, la ceftazidime, le cefpirome, l'aztréonam, les carbapénèmes, les aminosides, l'acide nalidixique et la colistine.*

**Tableau 8. Diamètres des zones d'inhibition (mm) autour de disques d'antibiotiques en l'absence et en présence d'oméprazole (souche AXX-A).**

	Sans oméprazole	Avec oméprazole
Pipéracilline	45	48
Céfalotine	9	12
Ceftazidime	27	30
Cefsulodine	14	20
Imipénème	31	36
Méropénème	42	45
Sulfadiazine	45	55

*Pas de différence pour l'amoxicilline, la ticarcilline, la céfoxitine, le céfotaxime, le céfépime, le cefpirome, l'aztréonam, les aminosides, l'acide nalidixique, les fluoroquinolones, les cyclines et la colistine.*

Très peu de différences ont été observées lors de l'utilisation du CCCP. Une augmentation de diamètre a été notée seulement pour la sulfadiazine (4 mm). Le PABN n'a entraîné aucune modification de diamètre des zones d'inhibition.

Ces premiers résultats ont conforté l'hypothèse de la production de systèmes d'efflux susceptibles d'exporter des antibiotiques par *A. xylosoxidans*.

## II. Système AxyABM

La description du système d'efflux AxyABM a fait l'objet de l'article 1 (Annexe 4, p 129) intitulé « First description of an RND-type multidrug efflux pump in *Achromobacter xylosoxidans*, AxyABM » dans la revue *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (Bador *et al.*, 2011).

### 1. Caractérisation génétique de l'opéron *axyABM*

*axyABM* est le premier opéron d'efflux RND que nous ayons caractérisé chez *A. xylosoxidans*. Nous l'avons séquencé avant que la première séquence génomique complète d'*Achromobacter xylosoxidans* n'ait été déposée, en novembre 2010 (*A. xylosoxidans* A8, numéro d'accèsion GenBank NC\_014640, Strnad *et al.*, 2011), et avant le séquençage du génome de notre souche AXX-A (achevé en janvier 2011, séquence annotée déposée en juillet 2011, numéro d'accèsion GenBank AFRQ01000000).

#### a. Détection d'un gène candidat de transporteur RND par PCR consensus

Les séquences géniques conservées de *mexA*, *mexB* et *oprM* codant pour le système MexAB-OprM de *P. aeruginosa* ont été repérées par alignement multiple de chacun des gènes avec leurs homologues d'autres systèmes RND (à l'aide du logiciel ClustalW2, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Nous avons choisi sept couples d'amorces ciblant des régions conservées de chacun des 3 gènes (logiciel Oligonucleotide Properties Calculator, <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>).

L'une des réactions de PCR consensus (amorces *mexB2-F* et *mexB2-R* ciblant le gène *mexB* de *P. aeruginosa*) réalisées sur la souche AXX-A a permis d'obtenir un produit d'amplification d'une taille proche de celle du produit obtenu chez *P. aeruginosa* (témoin positif de la PCR) (Figure 25, p 86). La séquence de ce produit de PCR présente une forte homologie avec un fragment du gène *acrB* (82% d'identité), candidat d'un transporteur RND chez *Bordetella bronchiseptica* (souche RB50, accèsion = BX640444, locus\_tag = BB2528), espèce bactérienne proche d'*A. xylosoxidans* (famille des *Alcaligenaceae*). Le pourcentage d'identité en acides aminés est de 77%.



**Figure 25. PCR consensus, séquençage du produit de PCR et alignement BLAST.**

*A* : AXX-A ; *B* : AXX-B ; *C* : AXX-C ; *D* : AXX-D ; *E* : AXX-E ; ➔ 5 souches cliniques d'*A. xylooxidans* isolées au laboratoire ; AXX-B, AXX-C, AXX-D et AXX-E n'ont pas été utilisées pour la suite du travail.

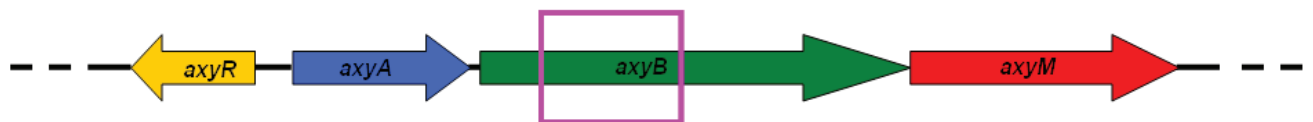
*P* : témoin positif *P. aeruginosa* (taille attendue du produit de PCR = 1100 paires de bases) ;

*N* : témoin négatif (eau) ; *M* : marqueur de taille 100 pb DNA Ladder.

#### b. Séquençage de l'opéron entier par marche sur le chromosome

En utilisant la technique de marche sur le chromosome en 2 étapes, nous avons séquencé les régions adjacentes au fragment de séquence obtenu par PCR consensus (Figure 26, p 87). Nous avons pu séquencer l'intégralité d'un candidat d'opéron d'efflux constitué des gènes *axyA* (candidat MFP), *axyB* (candidat RND) et *axyM* (candidat OMF) dont les codons « start » et « stop » ont été repérés à l'aide du logiciel GeneMark v2.4. En amont et en sens inverse nous avons séquencé un gène, *axyR*, pouvant coder pour un régulateur transcriptionnel de la famille LysR. La séquence de cet opéron d'efflux, « *axyABM* », a été déposée dans GenBank sous le numéro d'accèsion JF514544. Nous avons séquencé l'opéron *axyABM* d'une seconde souche clinique d'*A. xylooxidans*, AXX-C. Nous avons aligné les séquences

protéiques d'AxyA, d'AxyB et d'AxyM des souches AXX-A, AXX-C et AXX-A8 ainsi que de leurs homologues chez *A. piechaudii* ATCC-43553 (accession NZ\_ADMS01000000), *Bordetella bronchiseptica* RB50 (accession NC\_002927) et *P. aeruginosa* PAO1 (accession NC\_002516). Les pourcentages d'identité (en acides aminés) sont présentés sous forme de tableaux dans la figure 1 de l'article 1. AxyABM présente une forte homologie avec MexAB-OprM, avec notamment 72% d'identité de séquence entre les transporteurs AxyB et MexB. En revanche, *axyR* ne présente aucune homologie avec *mexR*, gène codant pour le régulateur transcriptionnel local de l'opéron *mexAB-oprM* de *P. aeruginosa*.



**Figure 26. Opéron d'efflux *axyABM*.**

Le fragment de séquence d'*axyB* délimité par le rectangle rose correspond à la partie amplifiée par la PCR consensus. Les séquences adjacentes ont été obtenues par marche sur le chromosome.

Les gènes *axyB* et *axyM* se chevauchent de 4 nucléotides.

2. Inactivation du gène *axyB*

Nous avons étudié par inactivation génique le rôle potentiel de l'opéron *axyABM* dans la résistance aux antibiotiques d'*A. xylosoxidans*. Parmi les 3 gènes candidats de l'opéron d'efflux *axyABM*, c'est le gène *axyB* que nous avons choisi d'inactiver. Le transporteur représente en effet l'élément clef dans le fonctionnement d'un système d'efflux RND, en particulier dans la reconnaissance des substrats. L'inactivation génique a été réalisée par insertion d'un plasmide suicide comme décrit précédemment (recombinaison homologue entre le plasmide suicide et le gène cible). Les nombreuses tentatives d'inactivation génique par délétion ont malheureusement échoué.

Dans un premier temps, afin d'observer l'éventuelle implication d'AxyABM dans la résistance **naturelle** d'*A. xylooxidans* aux antibiotiques, nous avons inactivé *axyB* dans la souche AXX-A qui présente un phénotype sauvage de résistance aux antibiotiques. Puis nous avons renouvelé cette manipulation dans d'autres souches présentant des résistances **acquises** (notamment à la ceftazidime et à la ciprofloxacine) : AXX-D3, AXX-H1 et AXX-H2.

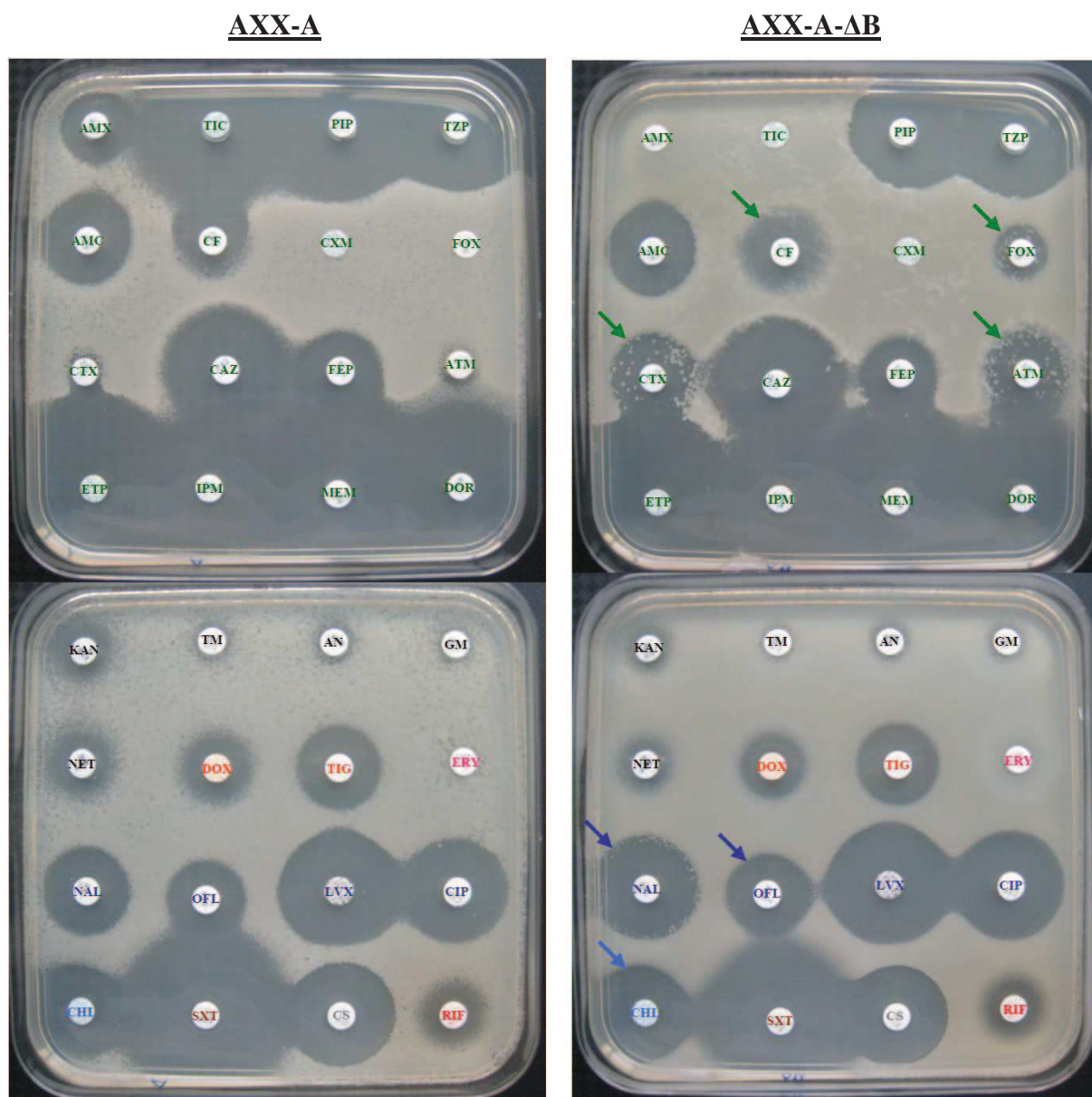
Le recombinant nommé AXX-A- $\Delta$ **P** (gène de **P**ompe inactivé) dans la publication du système AxyABM a été renommé ici AXX-A- $\Delta$ **B** (gène *axyB* inactivé) pour plus de clarté.

Toutes les CMI déterminées au cours de ce travail (souches d'origine et souches recombinantes) sont présentées sous forme de tableaux en annexe 3 (p 125).

#### a. Inactivation d'*axyB* dans la souche sauvage AXX-A

Des antibiogrammes par diffusion en milieu gélosé ont été réalisés en parallèle pour AXX-A et pour le recombinant AXX-A- $\Delta$ B (*axyB::Tic*) (Figure 27, p 89). L'inactivation d'*axyB* a pour conséquence une augmentation de diamètre des zones d'inhibition autour des disques d'aztréonam, de certaines céphalosporines (céfalotine, céfoxitine et céfotaxime), d'acide nalidixique, et dans une moindre mesure autour des disques d'ofloxacine et de chloramphénicol. Aucune variation de diamètre n'a été constatée autour des disques d'aminosides, de cyclines, d'érythromycine, de cotrimoxazole, de colistine et de rifampicine.

Des révertants spontanés obtenus par culture en l'absence de ticarcilline présentaient le phénotype de départ de la souche AXX-A. Le séquençage d'*axyB* a confirmé l'excision du plasmide suicide dans ces révertants.



**Figure 27.** AntibioGrammes d'AXX-A et d'AXX-A- $\Delta$ B (diffusion en milieu gélosé MH).

*AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; AMX : amoxicilline ; AN : amikacine ; ATM : aztréonam ; CAZ : ceftazidime ; CF : céfalcone ; CHL : chloramphénicol ; CIP : ciprofloxacine ; CS : colistine ; CTX : céfotaxime ; CXM : céfuroxime ; DOR : doripénème ; DOX : doxycycline ; ERY : érythromycine ; ETP : ertapénème ; FEP : céfépime ; FOX : céfoxitine ; GM : gentamicine ; IPM : imipénème ; KAN : kanamycine ; LVX : lévofloxacine ; MEM : méropénème ; NAL : acide nalidixique ; NET : nétilmicine ; OFL : ofloxacine ; PIP : pipéracilline ; RIF : rifampicine ; SXT : cotrimoxazole ; TIC : ticarcilline ; TIG : tigécycline ; TM : tobramycine ; TZP : pipéracilline + tazobactam ; Une couleur par famille d'antibiotiques.*

*Les flèches indiquent les diamètres augmentés suite à l'inactivation d'axyB. Les colonies situées dans ces zones d'inhibition sont des révertants spontanés (l'absence de ticarcilline dans la gélose ne permet pas le maintien du plasmide suicide). Le plasmide suicide porte un gène codant pour une pénicillinase, expliquant la résistance d'AXX-A- $\Delta$ B aux pénicillines (AMX, TIC, PIP).*

*Les augmentations de 2 mm mesurées autour des disques d'ofloxacine et de chloramphénicol ne sont pas visibles sur la photographie.*



Les CMI de 30 antibiotiques ont été déterminées par la méthode du E-test (Tableau de l'annexe 3, p 126). L'inactivation d'*axyB* entraîne une diminution de CMI (d'un facteur  $\geq 2$ ) de plusieurs antibiotiques de différentes familles :

- 7 céphalosporines sur les 12 testées dont le céfotaxime et la ceftazidime,
- l'aztréonam,
- l'ertapénème et le doripénème,
- l'acide nalidixique et la plupart des fluoroquinolones testées,
- le chloramphénicol.

**La diminution de CMI est particulièrement marquée (d'un facteur 16 minimum) pour l'aztréonam et le céfotaxime, démontrant l'implication du système d'efflux AxyABM dans la résistance naturelle d'*A. xylosoxidans* à ces molécules.**

Les CMI du céfépime, des cyclines, des aminosides et de la colistine n'ont en revanche pas été affectées par l'inactivation d'*axyB*.

Les écarts de CMI d'un facteur inférieur à 2 ont été considérés comme non significatifs (Ex. la CMI de la doxycycline est de 8 mg/l chez AXX-A et 6 mg/l chez AXX-A- $\Delta$ B).

#### b. Inactivation d'*axyB* dans les souches AXX-D3, AXX-H1 et AXX-H2

Les 3 souches cliniques AXX-D3, AXX-H1 et AXX-H2 ont été choisies pour ce travail car elles sont résistantes à la ciprofloxacine et à la ceftazidime. AXX-H2 présente en plus la particularité d'être résistante aux carbapénèmes.

L'inactivation d'*axyB* dans ces 3 souches entraîne une diminution des CMI des mêmes antibiotiques que ceux dont les CMI avaient été affectées par l'inactivation d'*axyB* dans AXX-A. Nous remarquons cependant que la CMI de l'aztréonam pour AXX-H1 et AXX-H2 reste supérieure à 256 mg/l même après l'inactivation d'*axyB*.

Le résultat le plus marquant concerne les carbapénèmes. La sensibilité de la souche AXX-H2 aux carbapénèmes est restaurée suite à l'inactivation du gène *axyB*. Les CMI de l'ertapénème, du méropénème et du doripénème diminuent de 24, 6 et 10 fois, respectivement. En revanche

la CMI de l'imipénème ne passe que de 4 à 2 mg/l. Cette diminution de CMI d'un facteur 2 n'a pas été retrouvée lors de l'inactivation d'*axyB* chez AXX-A et AXX-D3. **Les carbapénèmes (hors imipénème) sont donc des substrats d'AxyABM.**

L'inactivation d'*axyB* dans les souches AXX-H1 et AXX-H2 présentant une résistance acquise aux fluoroquinolones a permis de confirmer que **la ciprofloxacine faisait aussi partie des substrats d'AxyABM.**

### c. Synthèse des résultats

Le tableau 12 (p 105) indique les antibiotiques substrats de chacun des 3 systèmes d'efflux que nous avons étudiés.

**AxyABM est le principal mécanisme en cause dans la résistance intrinsèque d'*A. xylosoxidans* à l'aztréonam et au céfotaxime.** Mais le niveau résiduel de résistance d'AXX-A-ΔB à ces 2 molécules (16 et 12 mg/l) ainsi que les niveaux de résistance encore très élevés après l'inactivation génique d'*axyB* dans AXX-H1 et AXX-H2 suggèrent que d'autres mécanismes peuvent être impliqués dans la résistance à ces 2 β-lactamines.

**L'acide nalidixique, les fluoroquinolones, la ceftazidime et le chloramphénicol font aussi partie des substrats d'AxyABM.** Les diminutions de CMI consécutives à l'inactivation d'*axyB* sont modérées en ce qui concerne la ciprofloxacine, la ceftazidime et le chloramphénicol, d'un facteur 2 à 3. Ces diminutions se font dans des proportions équivalentes pour les 4 souches étudiées (Ex. facteur 2 à 3 pour la ceftazidime quel que soit le niveau de résistance de départ). Les niveaux résiduels de résistance restent élevés selon les souches (Ex. CMI de la ciprofloxacine = 16 mg/l pour AXX-H2-ΔB). Les résistances acquises à la ciprofloxacine et à la ceftazidime chez AXX-D3, AXX-H1 et AXX-H2 ne semblent pas liées à ce système d'efflux.

En revanche **AxyABM pourrait jouer un rôle majeur dans l'acquisition de la résistance aux carbapénèmes (hors imipénème).**



### **AxyABM et MexAB-OprM (de *P. aeruginosa*) ont des profils de substrats très similaires.**

Ces 2 systèmes sont capables d'exporter des céphalosporines, l'aztréonam, le méropénème (mais pas l'imipénème), l'acide nalidixique, des fluoroquinolones et le chloramphénicol.

#### 3. Inactivation du gène *axyR*

Le gène candidat *axyR* situé en amont de l'opéron d'efflux *axyABM* présente une homologie de séquence avec des gènes codant pour des régulateurs transcriptionnels de la famille LTTR (LysR-Type Transcriptional Regulator) dont LysR est le chef de file. La plupart des représentants des LTTR agissent comme activateurs de transcription (Maddocks and Oyston, 2008).

Nous avons procédé à l'inactivation d'*axyR* dans la souche AXX-A. La plupart des antibiotiques dont les CMI avaient diminué suite à l'inactivation d'*axyB* ont également des CMI inférieures à celles observées dans la souche de départ AXX-A : la céfalotine, le céfotaxime, la ceftazidime, l'ertapénème, le doripénème et l'acide nalidixique.

Le niveau de résistance d'AXX-A- $\Delta$ R à ces antibiotiques se situe entre celui d'AXX-A et celui d'AXX-A- $\Delta$ B. Il semble donc qu'*axyR* soit bien un régulateur transcriptionnel local de type activateur.

#### 4. Comparaison du niveau d'expression d'*axyB* entre AXX-H1 et AXX-H2

AXX-H1 et AXX-H2 constituent un couple de souches isogéniques sensible/résistante. En effet, AXX-H1 et AXX-H2 présentent des niveaux de résistance différents aux carbapénèmes mais également à d'autres antibiotiques substrats d'AxyABM : la ceftazidime, les fluoroquinolones et le chloramphénicol. Nous avons testé l'hypothèse selon laquelle cette différence de résistance serait la conséquence d'une surexpression d'AxyABM chez AXX-H2.

Pour cela, nous avons mesuré par RT-PCR quantitative le niveau d'expression relatif du gène *axyB* d'AXX-H2 par rapport à celui d'AXX-H1. *axyB* est 2,3 fois plus exprimé chez AXX-H2 que chez AXX-H1 (Tableau 9, p 93). Cette différence est modeste mais a été mesurée à 2 reprises lors de 2 séries de manipulations indépendantes (extraction d'ARN comprise). Ce résultat conforte donc notre hypothèse.

**Tableau 9. Résultats obtenus par RT-PCR quantitative pour le gène cible *axyB*.**

	CT( <i>axyB</i> ) 1/10	CT( <i>axyB</i> ) 1/100	CT( <i>axyB</i> ) 1/1000	E( <i>axyB</i> )	CT( <i>rpsL</i> ) 1/10	CT( <i>rpsL</i> ) 1/100	CT( <i>rpsL</i> ) 1/1000	E( <i>rpsL</i> )
AXX-H1	20,13 22,5	23,47 26,19	27,65 29,87	1,845 1,868	14,92 17,71	18,04 21,03	21,33 24,52	2,049 1,967
AXX-H2	23,27 23,55				18,75 19,91			

→ Ratio (AXX-H2/AXX-H1) = 2,28

→ Ratio (AXX-H2/AXX-H1) = 2,30

Résultats issus de la 1<sup>ère</sup> extraction d'ARN (en noir)

Résultats issus de la 2<sup>ème</sup> extraction d'ARN (en bleu)

CT : cycle threshold ; E : efficacité de la PCR

### III. Repérage *in silico* de candidats d'efflux RND dans le génome d'AXX-A

Le système d'efflux RND AxyABM est responsable d'une partie de la résistance naturelle d'*A. xylosoxidans* aux antibiotiques. Il n'est en revanche pas impliqué dans la résistance naturelle aux aminosides et à certaines céphalosporines dont le céfépime.

L'analyse des génomes des BGN-NF révèle généralement la présence de plusieurs opérons candidats de systèmes d'efflux RND. Certains de ces systèmes ont été caractérisés et les antibiotiques font souvent partie de leurs substrats. Chez *P. aeruginosa* les 12 systèmes RND putatifs ont été étudiés. Dix d'entre eux peuvent exporter des antibiotiques. Il était donc probable qu'*A. xylosoxidans* soit doté d'autres systèmes d'efflux qu'AxyABM, impliqués eux aussi dans la résistance aux antibiotiques.

Le séquençage *de novo* du génome d'AXX-A a permis d'obtenir 13 séquences génomiques (ou « scaffolds ») correspondant aux alignements de 209 contigs (séquences génomiques générées par le séquençage à haut débit). La taille cumulée des 13 scaffolds est de 6 860 805 nucléotides. Le scaffold numéro 3 couvre quasiment tout le génome (6 824 182 nucléotides). Le contenu en GC est de 68,2%. L'annotation automatisée par l'outil « Prokaryotic Genomes Annotation Pipeline » a permis la détection de 6 220 ORFs. Nous avons déposé les séquences génomiques d'AXX-A dans GenBank en juillet 2011 (numéro d'accèsion GenBank : AFRQ01000000).

Nous avons recherché des gènes candidats d'efflux RND dans le génome d'AXX-A. Pour ceci nous avons utilisé le logiciel BLAST en choisissant la banque de données contenant les séquences génomiques d'AXX-A (« whole-genome shotgun contigs », taxid1003200). Nous avons recherché des séquences nucléotidiques homologues de gènes codant pour des transporteurs RND déjà caractérisés ou simplement candidats chez des BGN-NF. Nous avons ainsi recensé 15 gènes candidats de transporteurs RND (Tableau 10).

**Tableau 10. Gènes candidats de transporteurs RND dans le génome d'AXX-A.**

Contig	Position sur le contig	Nom du locus	Homologie
30	19634..22855	AXXA_02522	>70% d'identité avec des gènes RND putatifs de plusieurs espèces appartenant à l'ordre des <i>Burkholderiales</i>
42	149429..152531	Aucun	73% d'identité avec <i>mexF</i> ( <i>Pa</i> )
52	96873..100055	AXXA_11945	80% d'identité avec <i>czcA</i> ( <i>Pa</i> )
58	22408..25506 25503..28613	AXXA_13319 AXXA_13324	2 candidats RND contigus homologues de <i>muxB</i> et <i>muxC</i> (respectivement 77% et 73% d'identité) ( <i>Pa</i> )
63	12981..16097	AXXA_14286	>70% d'identité avec des gènes RND putatifs de plusieurs espèces appartenant à l'ordre des <i>Burkholderiales</i>
71	23987..27124	AXXA_16886	79% d'identité avec <i>mexY</i> ( <i>Pa</i> )
71	17238..20357	AXXA_16866	77% d'identité avec <i>mexI</i> ( <i>Pa</i> )
71	8556..11729	AXXA_16841	69% d'identité avec <i>mexK</i> ( <i>Pa</i> )
84	4496..7660	AXXA_19357	>70% d'identité avec des gènes RND putatifs de plusieurs espèces
94	20573..23752	AXXA_21113	>70% d'identité avec des gènes RND putatifs de plusieurs espèces
102	37390..40572	AXXA_22080	<i>axyB</i>
109	4799..7942	AXXA_22840	78% d'identité avec <i>mexD</i> ( <i>Pa</i> )
133	15656..18733 18730..21798	AXXA_26395 AXXA_26400	2 candidats RND contigus homologues de <i>muxB</i> et <i>muxC</i> (respectivement 75% et 68% d'identité) ( <i>Pa</i> )

*Pa* : *P. aeruginosa*.

Le seuil de 70% d'identité est généralement retenu pour considérer qu'il existe une homologie entre 2 séquences nucléotidiques. C'est le cas des gènes candidats listés dans ce tableau sauf *AXXA\_16841* et *AXXA\_26400* (69 et 68% d'identité de séquence nucléotidique avec leurs homologues).

Sur le contig 42 nous avons identifié un gène candidat homologue de *mexF* de *P. aeruginosa*. Aucun nom de locus ne lui a été attribué dans GenBank car aucun ORF n'a été repéré lors de l'annotation automatisée (Prokaryotic Genomes Annotation Pipeline) du génome d'AXX-A.

Sur les contigs 58 et 133 se trouvent des candidats RND homologues de *muxB* et *muxC* de *P. aeruginosa*. Il y aurait chez *A. xylosoxidans* 2 systèmes d'efflux RND comportant chacun 2 transporteurs dont les gènes sont contigus sur le chromosome. Seul un système de *P. aeruginosa*, MuxABC-OpmB, présente cette particularité.

**Le génome d'*A. xylosoxidans* contient donc au total 13 opérons d'efflux RND.**

Le locus AXXA\_21113 (contig 94) présente un pourcentage d'identité avec des gènes RND d'espèces bactériennes appartenant aux ordres *Pseudomonadales* et *Burkholderiales* supérieur à 70% mais sur 15% (au maximum) de la longueur de la séquence. Nous avons quand même retenu cet ORF comme candidat d'efflux RND pour les raisons suivantes :

- il n'y a pas de score d'alignement (BLAST) meilleur avec d'autres gènes que des gènes RND,
- le pourcentage d'identité supérieur à 70% concerne plusieurs fragments de la séquence d'AXXA\_21113 indiquant qu'il s'agit probablement de motifs conservés,
- la taille d'AXXA\_21113 (3179 nucléotides) correspond bien à la taille d'un gène codant pour un transporteur RND.

**Ce gène candidat pourrait donc coder pour un transporteur d'efflux spécifique d'*A. xylosoxidans*.**

**Comparaison avec *P. aeruginosa*.** Sur les 12 systèmes d'efflux RND de *P. aeruginosa*, 8 ont un homologue dans le génome d'AXX-A. Aucune séquence homologue des gènes *mexN*, *mexQ*, *mexW* et *triC* de *P. aeruginosa* n'a été repérée dans le génome d'AXX-A. En revanche 4 candidats RND d'AXX-A n'ont pas d'homologue chez *P. aeruginosa*.

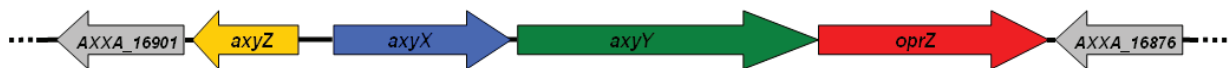
**Deux candidats ont particulièrement retenu notre attention : un homologue de *mexY* et un homologue de *mexD*.** La résistance naturelle d'*A. xylosoxidans* aux aminosides et au céfépime n'est pas liée au système AxyABM. Or MexXY/OprM de *P. aeruginosa* exporte les aminosides, et le céfépime est un des substrats de MexCD-OprJ. Nous avons donc poursuivi notre travail d'étude de la résistance par efflux chez *A. xylosoxidans* en inactivant ces 2 gènes candidats de transporteurs RND.

#### IV. Système AxyXY-OprZ

Nous avons publié les résultats de nos travaux sur AxyXY-OprZ dans la revue *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* : « *Innate aminoglycoside resistance of Achromobacter xylosoxidans is due to AxyXY-OprZ, an RND-type multidrug efflux pump* » (Bador *et al.*, 2013) (Article 2 en annexe 5, p 130).

##### 1. Caractérisation génétique de l'opéron *axyXY-oprZ*

Nous avons repéré, dans le génome d'AXX-A, 3 gènes nommés *axyZ*, *axyX* et *axyY* (Figure 28), et présentant respectivement 67, 67 et 77% d'identité de séquence avec les gènes *mexZ*, *mexX* et *mexY* de *P. aeruginosa*. Le gène *mexX* de *P. aeruginosa* code pour la protéine MFP du système MexXY et *mexY* code pour le transporteur RND. L'expression de ces 2 gènes est régulée localement par un répresseur transcriptionnel dont le gène, *mexZ*, est situé en amont de *mexX*. Chez la plupart des souches de *P. aeruginosa* (Ex. PAO1) l'opéron *mexXY* est dépourvu de gène codant pour une protéine de membrane externe, et MexX-MexY s'associent à OprM pour constituer le système d'efflux MexXY/OprM. D'autres souches (Ex. PA7) possèdent un opéron d'efflux complet *mexXY-oprA*, le gène *oprA* codant pour l'OMF. Il a été montré qu'OprA, comme OprM, pouvait servir d'OMF en association avec MexX et MexY (Morita *et al.*, 2012b). Chez AXX-A, il existe, en aval d'*axyY*, un gène candidat de protéine de membrane externe, *oprZ*. Les gènes *axyY* et *oprZ* se chevauchent de 4 nucléotides, du côté du codon-stop d'*axyY* et du codon-start d'*oprZ*. La séquence d'*oprZ* possède une forte homologie avec celle d'*oprA* de *Burkholderia pseudomallei* et d'*oprA* de *P. aeruginosa*.



**Figure 28. Opéron d'efflux *axyXY-oprZ*.**

L'opéron et le gène *axyZ* sont situés entre les ORFs *AXXA\_16901* et *AXXA\_16876* de fonction inconnue.

Les gènes *axyY* et *oprZ* se chevauchent de 4 nucléotides.

## 2. Inactivation du gène *axyY*

Suivant la même démarche expérimentale que celle menée pour l'étude du système d'efflux AxyABM, nous avons inactivé le gène candidat *axyY* dans 3 souches : AXX-A, AXX-D3 et AXX-H2. Les antibiogrammes d'AXX-A et d'AXX-A- $\Delta Y$  sont présentés en figure 29 (p 98) et les CMI des 3 souches et de leur recombinant  $\Delta Y$  dans le tableau de l'annexe 3 (p 127).

Le résultat le plus marquant de ces expériences d'inactivation génique est la restauration de l'activité de tous les aminosides utilisés en thérapeutique (la tobramycine, l'amikacine, la gentamicine et la nétilmicine) sur les 3 souches étudiées. Les CMI obtenues sont inférieures aux concentrations critiques basses retenues par le CA-SFM (4 à 8 mg/l selon les molécules) pour la catégorisation des *Pseudomonas* aux aminosides. **AxyXY-OprZ est donc responsable de la résistance naturelle d'*A. xylosoxidans* aux aminosides.**

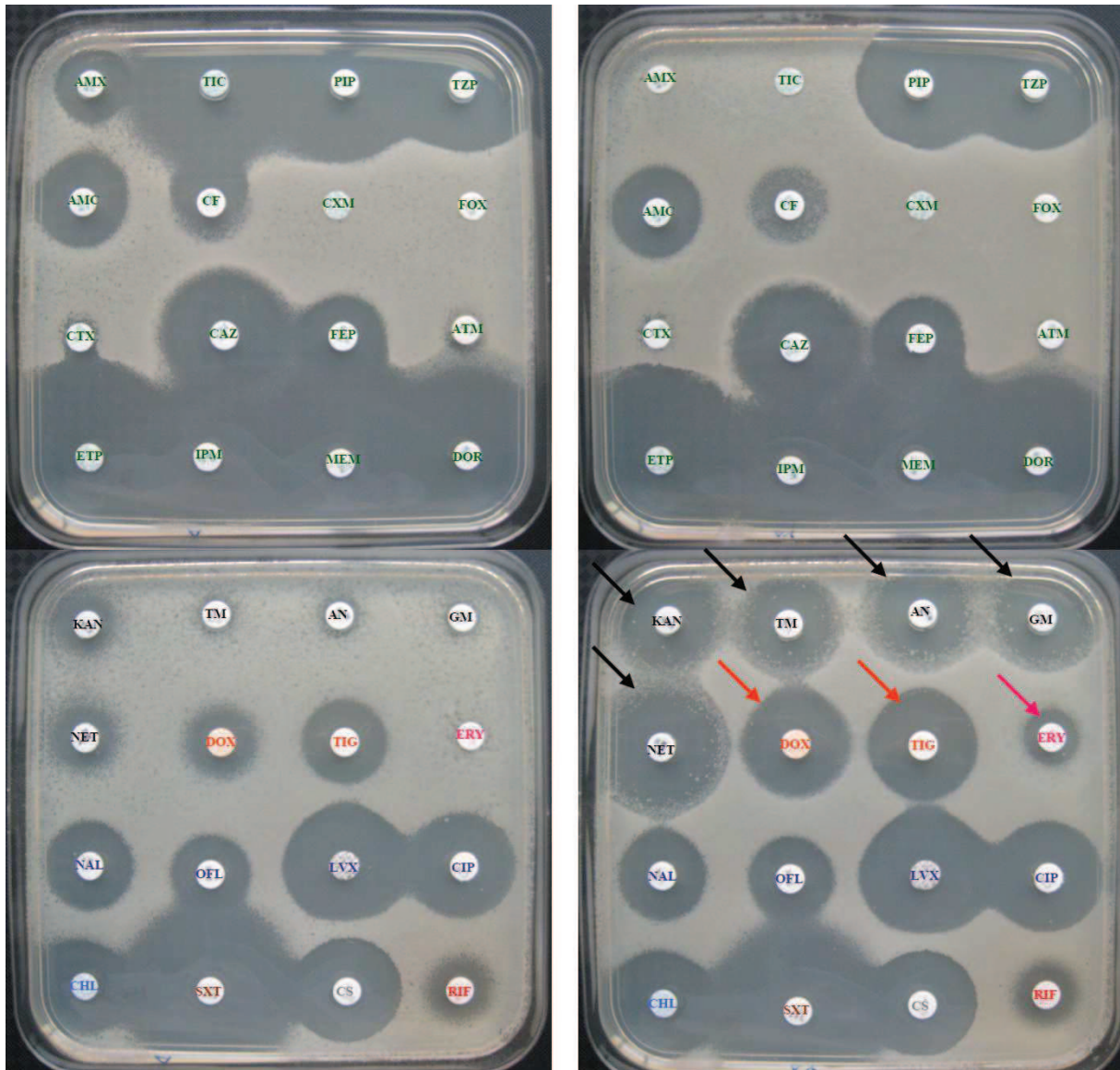
**L'inactivation d'*axyY* entraîne des diminutions de CMI de tous les carbapénèmes**, y compris pour AXX-A et AXX-D3 pourtant sensibles au départ. Les rapports de CMI entre AXX-H2 et AXX-H2- $\Delta Y$  pour le méropénème et le doripénème sont les mêmes que ceux observés entre AXX-H2 et AXX-H2- $\Delta B$  (diminutions de CMI d'un facteur 6 pour le méropénème et d'un facteur 10 pour le doripénème). AxyXY-OprZ pourrait donc contribuer à l'acquisition de la résistance aux carbapénèmes. Mais à la différence d'AxyABM, AxyXY-OprZ semble pouvoir exporter l'imipénème puisque la CMI de l'imipénème passe de 4 à 1 mg/l entre AXX-H2 et AXX-H2- $\Delta Y$ . Une diminution d'un facteur 2 est également observée entre AXX-A et AXX-A- $\Delta Y$ .

Une diminution de la CMI de la ceftazidime d'un facteur 2 a été constatée suite à l'inactivation d'*axyY* dans chacune des 3 souches, quel que soit le niveau de résistance initial. Ceci indique qu'**AxyXY-OprM serait susceptible d'exporter la ceftazidime**. Mais AxyXY-OprZ (comme AxyABM) n'est pas responsable du niveau de résistance élevé d'AXX-D3 et d'AXX-H2 à la ceftazidime.



AXX-A

AXX-A-ΔY



**Figure 29. Antibiogrammes d'AXX-A et d'AXX-A-ΔY (diffusion en milieu gélosé MH).**

*AMC : amoxicilline + acide clavulanique ; AMX : amoxicilline ; AN : amikacine ; ATM : aztréonam ; CAZ : ceftazidime ; CF : céfalotine ; CHL : chloramphénicol ; CIP : ciprofloxacine ; CS : colistine ; CTX : céfotaxime ; CXM : céfuroxime ; DOR : doripénème ; DOX : doxycycline ; ERY : érythromycine ; ETP : ertapénème ; FEP : céfépime ; FOX : céfoxitine ; GM : gentamicine ; IPM : imipénème ; KAN : kanamycine ; LVX : lévofloxacine ; MEM : méropénème ; NAL : acide nalidixique ; NET : nétilmicine ; OFL : ofloxacine ; PIP : pipéracilline ; RIF : rifampicine ; SXT : cotrimoxazole ; TIC : ticarcilline ; TIG : tigécycline ; TM : tobramycine ; TZP : pipéracilline + tazobactam. Une couleur par famille d'antibiotiques.*

*Les flèches indiquent les diamètres augmentés suite à l'inactivation d'axyY. Les colonies situées dans ces zones d'inhibition sont des révertants spontanés (l'absence de ticarcilline dans la gélose ne permet pas le maintien du plasmide suicide). Le plasmide suicide porte un gène codant pour une pénicillinase, expliquant la résistance d'AXX-A-ΔY aux pénicillines (AMX, TIC, PIP).*

**Le céfépime est un substrat d'AxyXY-OprZ.** La diminution modeste de la CMI du céfépime entre AXX-A et AXX-A- $\Delta$ Y (16 et 8 mg/l) indique qu'AxyXY-OprZ n'est pas responsable de la résistance naturelle d'*A. xylosoxidans* au céfépime, ou bien seulement partiellement. La CMI du céfépime, supérieure à 256 mg/l chez AXX-D3 passe à 24 mg/l chez AXX-D3- $\Delta$ Y. Ceci indique qu'AxyXY-OprZ peut participer à l'acquisition de hauts niveaux de résistance au céfépime. Cette récupération d'activité du céfépime n'est pas retrouvée entre AXX-H2 et AXX-H2- $\Delta$ Y. D'autres mécanismes interviennent donc dans la résistance intrinsèque ainsi que dans la résistance acquise de haut niveau au céfépime.

Si les CMI des fluoroquinolones ne sont pas très affectées par l'inactivation d'*axyY* chez AXX-A, les différences de CMI entre souches d'origine et souches recombinantes sont très importantes chez les 2 autres souches (Ex. diminution de la CMI de la ciprofloxacine d'un facteur supérieur à 10 entre AXX-D3 et AXX-D3- $\Delta$ Y). **AxyXY-OprZ participe donc à la résistance acquise aux fluoroquinolones.**

**Enfin, l'acide nalidixique, les cyclines et l'érythromycine font aussi partie des substrats d'AxyXY-OprZ.** Les différentes expériences d'inactivation d'*axyY* ont abouti à des diminutions de CMI particulièrement importantes en ce qui concerne les cyclines et l'érythromycine, surtout lorsque les CMI dans les souches d'origine étaient élevées.

**Le panel de substrats antibiotiques d'AxyXY-OprZ est donc très similaire à celui de MexXY/OprM de *P. aeruginosa* :** aminosides, céfépime, méropénème, acide nalidixique, fluoroquinolones, cyclines et érythromycine.

### 3. Inactivation du gène *axyZ*

L'inactivation d'*axyZ* chez AXX-A entraîne une augmentation de la CMI des antibiotiques substrats d'AxyXY-OprZ. Cette augmentation est particulièrement marquée pour les aminosides, le céfépime et les fluoroquinolones. L'augmentation de CMI, bien que plus modeste, concerne aussi les 3 cyclines étudiées ainsi que le chloramphénicol. En revanche nous n'observons aucune augmentation de CMI des carbapénèmes.



**Ces résultats confortent l'hypothèse de la fonction de répresseur transcriptionnel codée par *axyZ***, hypothèse basée au départ sur l'homologie de séquence entre *axyZ* et *mexZ* de *P. aeruginosa* (67% d'identité).

#### 4. Etude d'un mutant d'AXX-A hautement résistant aux aminosides

Nous avons obtenu fortuitement sur un milieu sélectif contenant de la streptomycine (un aminoside) un mutant d'AXX-A hautement résistant aux aminosides : « AXX-A-HRA ». La CMI des aminosides est 2 à 8 fois plus élevée chez AXX-A-HRA que chez AXX-A. De plus, la CMI de la plupart des antibiotiques substrats d'AxyXY-OprZ est augmentée par rapport à celle mesurée chez AXX-A : céfépime, doripénème, ofloxacine, ciprofloxacine, tétracycline et érythromycine. Cette évolution du phénotype de résistance pourrait donc résulter de la surexpression de l'opéron d'efflux *axyXY-oprZ*. Cette hypothèse n'explique pas la diminution de CMI de la doxycycline et de la tigécycline.

Une mutation dans le gène *axyZ* pourrait entraîner une surexpression de l'opéron *axyXY-oprZ*. Une mutation dans le gène *axyY* pourrait affecter la reconnaissance de certains substrats, permettant d'expliquer les variations contradictoires de CMI observées (doxycycline et tigécycline). Nous avons donc séquencé tout l'opéron *axyXY-oprZ* ainsi que le gène régulateur *axyZ* et les séquences intergéniques du mutant AXX-A-HRA (6579 nucléotides au total). **Aucune mutation n'a été retrouvée.** L'acquisition de cette résistance sous la pression de sélection d'un aminoside ne proviendrait donc pas d'une dérégulation de l'expression d'*axyXY-oprZ* au niveau local ni d'une mutation affectant la reconnaissance des substrats.

#### 5. Détection d'*axyY* et d'*oprZ* chez 36 souches d'*Achromobacter*

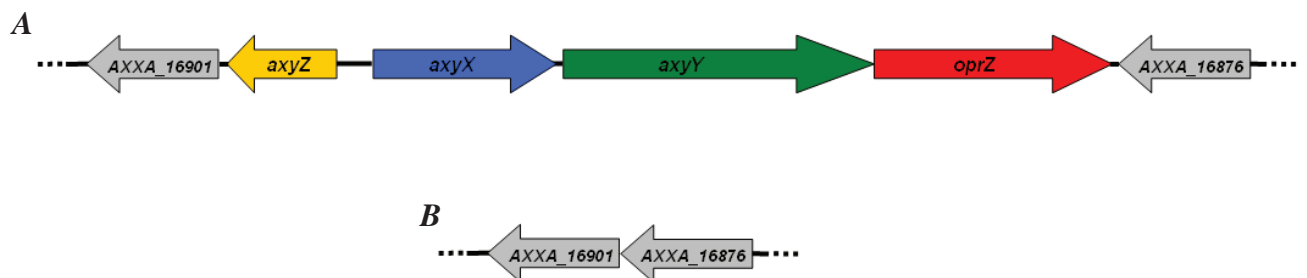
La résistance d'*A. xylosoxidans* aux aminosides est naturelle et due à AxyXY-OprZ. Mais cette résistance naturelle ne concerne pas toutes les espèces du genre *Achromobacter*. Si les souches types d'*A. denitrificans* (AXD-CIP77.15T), d'*A. insolitus* (AI-CIP108.202T) et d'*A. ruhlandii* (AR-CIP77.26T) sont résistantes aux aminosides, les souches types d'*A. piechaudii* (AP-CIP60.75T) et d'*A. spanius* (AS-CIP108.199T) sont très sensibles aux aminosides, avec des CMI inférieures à 1 mg/l. Par ailleurs, au sein de l'espèce *A. xylosoxidans*, le niveau de résistance aux aminosides est « variable » selon les souches (entre 16 et 256 et mg/l).

Nous avons recherché la présence de l'opéron *axyXY-oprZ* chez 36 souches d'*Achromobacter* appartenant à différentes espèces (Tableau 11, p 102). Il s'agissait de :

- 9 souches de la collection de l'Institut Pasteur,
- 2 souches environnementales,
- 25 souches cliniques (patients atteints de mucoviscidose ou non).

Des PCR ciblant les gènes *axyY* (amorces INA-axyY-F et INA-axyY-R) et *oprZ* (amorces AL-oprZ-F1, AL-oprZ-F3 et AL-oprZ-R1) ont été réalisées sur les 36 souches :

- **les 2 PCR étaient négatives pour les 3 souches sensibles aux aminosides : *A. piechaudii* CIP 60.75T, *A. spanius* CIP 108.199T et *A. denitrificans* AXD-510.** Le séquençage de la région de l'opéron *axyXY-oprZ* chez ces 3 souches a permis de constater l'absence de l'opéron ainsi que celle du gène régulateur *axyZ* (Figure 30).
- **Les 2 PCR étaient positives pour les 33 autres souches (résistantes ou avec des niveaux de résistance « variables » aux aminosides).**



**Figure 30. Présence/absence de l'opéron *axyXY-oprZ* selon les souches d'*Achromobacter*.**

**A :** *AXX-A* : gène *axyZ* et opéron *axyXY-oprZ* encadrés des ORFs AXXA\_16901 et AXXA\_16876.

**B :** *AP-CIP 60.75T*, *AS-CIP 108.199T* et *AXD-510* : absence du gène *axyZ* et de l'opéron *axyXY-oprZ*.

Toutes les souches d'*Achromobacter xylosoxidans* que nous avons étudiées possèdent les gènes *axyY* et *oprZ*, y compris les 3 souches dont le niveau de résistance est variable selon les aminosides (*AXX-ENV2*, *AXX-621* et *AXX-KUR*). Le système *AxyXY-OprZ* semble donc être constamment présent dans cette espèce. Son niveau d'expression devra être quantifié par RT-PCR dans les différentes souches.

Nous nous attendions à retrouver, pour les souches d'*Achromobacter* « sensibles » ou « de résistance variable » aux aminosides, des opérons *axyXY-oprZ* tronqués, dépourvus du gène *oprZ*, à l'image de ce qui est observé chez certaines souches de *P. aeruginosa* (Ex. PA7). Aucune des 36 souches étudiées ne possède cette particularité.

**Tableau 11.** PCR *axyY* et *oprZ* réalisées sur 36 souches d'*Achromobacter*.

Souche	Résistance aux aminosides	PCR <i>axyY</i>	PCR <i>oprZ</i>
AXD-CIP77.15T	R	+	+
AI-CIP108.202T	V	+	+
AP-CIP60.75T	S	-	-
AR-CIP77.26T	V	+	+
AS-CIP108.199T	S	-	-
AXX-CIP71.32T	R	+	+
AXX-CIP101.902	R	+	+
AXX-CIP102.062	R	+	+
AXX-CIP102.236	R	+	+
AXX-ENV1	R	+	+
AXX-ENV2	V	+	+
AXX-A	R	+	+
AXX-B	R	+	+
AXX-CAI	R	+	+
AXX-D3	R	+	+
AXX-GLI	R	+	+
AXX-KRE	R	+	+
AXD-59	R	+	+
AXX-476	R	+	+
AXD-510	S	-	-
AXX-530	R	+	+
AXX-576	R	+	+
AXX-583	R	+	+
AXX-621	V	+	+
AXX-662	R	+	+
AXX-670	R	+	+
AXX-699A	R	+	+
AXX-761	R	+	+
AXX-762	R	+	+
AXX-775	R	+	+
AXX-777	R	+	+
AXX-ALL	R	+	+
AXX-DUP	R	+	+
AXX-H2	R	+	+
AXX-KUR	V	+	+
AXX-MIG1	R	+	+

AXD : *A. denitrificans* ; AI : *A. insolitus* ; AP : *A. piechaudii* ; AR : *A. ruhlandii* ; AS : *A. spanius* ; R : résistant aux aminosides ; S : sensible aux aminosides ; V : niveaux de résistance variables selon les aminosides ; + : PCR positive ; - : PCR négative.

AXX-ENV1 et AXX-ENV2 : souches isolées de l'environnement hospitalier (fauteuil dentaire et évier).

Souches dont le nom comprend les lettres « CIP » : souches de la collection de l'Institut Pasteur.

## V. Système AxyCDJ

### 1. Caractérisation génétique de l'opéron *axyCDJ*

Nous avons retrouvé sur la séquence du contig109 d'AXX-A un homologue de l'opéron d'efflux *mexCD-oprJ* de *P. aeruginosa* (Tableau 10, p 94). Les gènes candidats nommés *axyC*, *axyD* et *axyJ* (Figure 31) présentent respectivement 75%, 76% et 71% d'identité avec *mexC*, *mexD* et *oprJ*. En amont d'*axyC* se trouve un gène homologue du gène *nfxB* de *P. aeruginosa* codant pour un régulateur transcriptionnel de l'opéron d'efflux *mexCD-oprJ*.



**Figure 31.** Opéron d'efflux *axyCDJ*.

*reg* : gène candidat homologue de *nfxB* de *P. aeruginosa*.

MexCD-OprJ exporte des céphalosporines telles que le céfépime ou le cefpirome. L'étude du système AxyCDJ devrait permettre d'évaluer son rôle dans la résistance intrinsèque d'*A. xylosoxidans* au céfépime.

### 2. Inactivation du gène *axyD*

Nous avons procédé à l'inactivation du gène *axyD* dans les souches AXX-A et AXX-H2. Les CMI sont indiquées dans le tableau de l'annexe 3 (p 128).

Concernant le **céfépime**, seule une légère diminution de CMI (non significative) est observée entre AXX-A (12 mg/l) et AXX-A- $\Delta$ D (8 mg/l). La CMI du céfépime est supérieure à 256 mg/l pour AXX-H2 ainsi que pour le recombinant AXX-H2- $\Delta$ D.

En revanche nous avons constaté la restauration de l'activité des **carbapénèmes** sur AXX-H2- $\Delta$ D. Les CMI de l'ertapénème, de l'imipénème, du méropénème et du doripénème sont équivalentes à celles que nous avons observées pour AXX-H2- $\Delta$ B et AXX-H2- $\Delta$ Y.

La **ceftazidime** est un substrat d'AxyABM et vraisemblablement un substrat d'AxyXY-OprZ. Les variations de CMI observées suite à l'inactivation d'*axyD* ne permettent pas de conclure que la ceftazidime est un substrat d'AxyCDJ. **Aucun des 3 systèmes étudiés n'apparaît comme étant en cause dans la résistance acquise à la ceftazidime.**

De façon surprenante, la CMI de certains **aminosides** a été diminuée suite à l'inactivation d'*axyD* chez AXX-A. Cette variation de CMI n'a pas été retrouvée entre AXX-H2 et AXX-H2- $\Delta$ D. Il en est de même pour l'ofloxacine, la tétracycline, la tigécycline et l'érythromycine.

**Tableau 12. Antibiotiques substrats des 3 systèmes d'efflux étudiés.**

	Antibiotique	AxyABM	AxyXY-OprZ	AxyCD-OprJ
Céphalosporines	Céfalotine	+	nd	-
	Céfotétan	+	nd	-
	Céfoxitine	+	nd	nd
	Céfotaxime	+	nd	-
	Ceftazidime	+	+	-
	Céfépime	-	+	-
	Aztréonam	+	-	-
Carbapénèmes	Ertapénème	+	+	+
	Imipénème	-	+	+
	Méropénème	+	+	+
	Doripénème	+	+	+
Aminosides	Kanamycine	nd	+	-
	Tobramycine	-	+	-
	Amikacine	-	+	-
	Gentamicine	-	+	-
	Nétilmicine	nd	+	-
Quinolones	Acide nalidixique	+	+	-
	Norfloxacin	+	+	-
	Ofloxacin	+	+	-
	Lévofloxacin	+	+	-
	Ciprofloxacine	+	+	-
Cyclines	Tétracycline	-	+	-
	Doxycycline	-	+	-
	Tigécycline	-	+	-
	Chlorampénicol	+	-	nd
	Erythromycine	nd	+	-

+ : substrat

⊕ : substrat et participation du système d'efflux à la résistance intrinsèque

- : non substrat

nd : CMI non déterminée, mais probablement « non substrat » car aucune variation de diamètre de zone d'inhibition sur les antibiogrammes

## DISCUSSION

---

I. Comparaison des systèmes d'efflux RND décrits dans ce travail à ceux d'autres espèces de BGN-NF

1. Comparaison des systèmes RND d'*A. xylosoxidans* à ceux de *P. aeruginosa*

Malgré la distance phylogénétique qui sépare *A. xylosoxidans* et *P. aeruginosa* (famille, ordre et classe différents ; Figure 32, p 108), la similitude entre les systèmes d'efflux RND de ces 2 espèces est importante. Cette similitude porte non seulement sur les pourcentages d'identité de séquences (nucléotidiques et protéiques) mais également sur le rôle de chacun des systèmes dans la résistance aux antibiotiques. AxyABM et AxyXY-OprZ possèdent des spécificités de substrats antibiotiques extrêmement proches de celles de MexAB-OprM et de MexXY/OprM (Tableau 13).

**Tableau 13.** Comparaison des profils de substrats d'AxyABM et d'AxyXY-OprZ avec leurs homologues de *P. aeruginosa*.

	AxyABM	MexAB-OprM	AxyXY-OprZ	MexXY/OprM
Pénicillines	nd	+	nd	+
Céphalosporines	+	+	+	+
Aztréonam	+	+	-	-
Imipénème	-	-	+	-
Méropénème	+	+	+	+
Aminosides	-	-	+	+
Acide nalidixique	+	+	+	+
Fluoroquinolones	+	+	+	+
Tétracycline	-	+	+	+
Tigécycline	-	-	+	+
Erythromycine	nd	+	+	+
Chlorampénicol	+	+	-	+

+ : *substrat*

- : *non substrat*

nd : *non déterminé*

Par ailleurs, l'analyse du génome d'*A. xylosoxidans* révèle qu'une majorité des gènes de transporteurs (caractérisés ou simplement candidats) ont leur homologue chez *P. aeruginosa*.

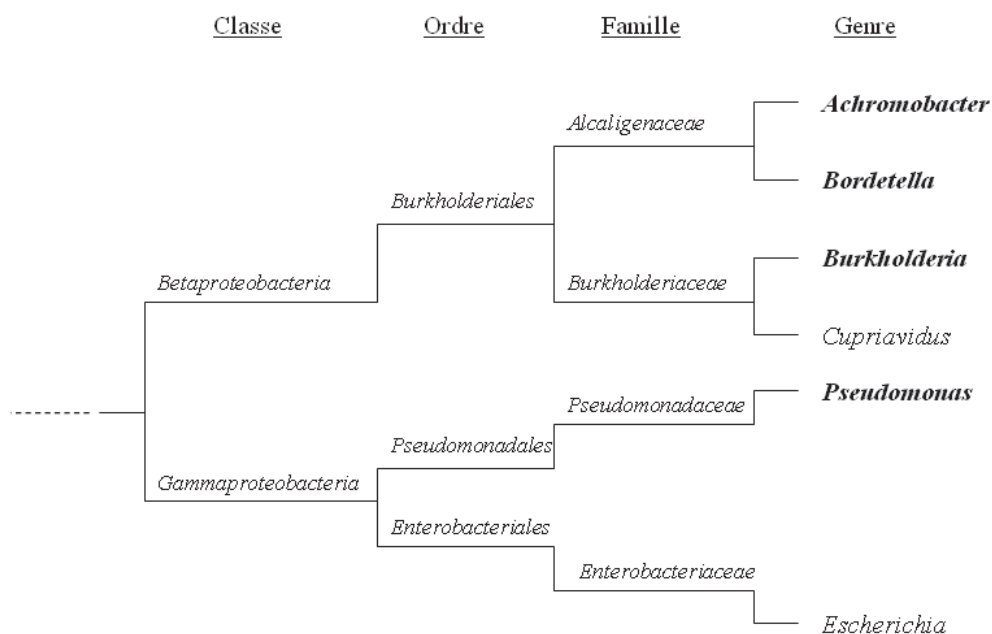


## 2. Comparaison des systèmes RND d'*A. xylooxidans* à ceux d'autres BGN-NF

L'alignement des séquences d'AxyA, d'AxyB et d'AxyM avec leurs homologues de *Bordetella bronchiseptica* montre que l'homologie est plus importante qu'avec MexA, MexB et OprM de *P. aeruginosa* (Figure 1 de l'article 1).

De même, le niveau de résistance aux aminosides conféré par AxyXY-OprZ chez *A. xylooxidans* est plus proche de ce qui est observé chez *B. pseudomallei* (AmrAB-OprA) que chez *P. aeruginosa* (MexXY/OprM). En effet, pour les souches sauvages d'*A. xylooxidans* AXX-A et de *B. pseudomallei* 1026b (Moore *et al.*, 1999) la CMI des aminosides est supérieure ou égale à 16 mg/l alors qu'elle est comprise entre 0,5 et 4 mg/l pour la souche sauvage de *P. aeruginosa* PAO1 (Aires *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2011).

Ces points de ressemblance plus marqués avec *B. bronchiseptica* et *B. pseudomallei* qu'avec *P. aeruginosa* paraissent logiques puisque *P. aeruginosa* est plus éloigné phylogénétiquement d'*A. xylooxidans* que *B. bronchiseptica* et *B. pseudomallei* (même classe et même ordre qu'*A. xylooxidans*) (Figure 32).



**Figure 32.** Position taxonomique de différents genres bactériens par rapport au genre *Achromobacter*.

L'activité des aminosides sur les souches du genre *Achromobacter* (*A. denitrificans*, *A. insolitus*, *A. piechaudii*, *A. ruhlandii*, *A. spanius* et *A. xylosoxidans*) dépend de la présence de l'opéron d'efflux *axyXY-oprZ* (Tableau 11, p 102). Cet opéron n'est pas présent dans les souches d'*Achromobacter* qui sont sensibles aux aminosides. Une observation similaire a été rapportée chez *B. pseudomallei* : la souche de *B. pseudomallei* 108a qui ne possède pas l'opéron d'efflux *amrAB-oprA* est sensible aux aminosides (Trunck *et al.*, 2009). Dans ce cas, l'absence de l'opéron est liée à une vaste délétion de plusieurs dizaines de kilobases. Les délétions que nous avons observées dans 3 souches d'*Achromobacter* ne concernent que l'opéron d'efflux *axyXY-oprZ* et le gène régulateur *axyZ*. Les 3 souches concernées possèdent bien les gènes jouxtant habituellement *axyZ* et l'opéron *axyXY-oprZ* (Figure 30, p 101).

## II. Régulation de l'expression des systèmes d'efflux étudiés

Un gène régulateur transcriptionnel a été mis en évidence en amont de chacun des opérons d'efflux étudiés :

- *axyR* dont le produit serait un activateur de la transcription de l'opéron *axyABM*,
- *axyZ*, homologue de *mexZ*, dont le produit serait un répresseur de la transcription de l'opéron *axyXY-oprZ*,
- un candidat, homologue de *nfxB* de *P. aeruginosa*, se situe en amont d'*axyCDJ*.

Chaque système d'efflux semble donc pouvoir être régulé localement.

Il est cependant probable que ces systèmes d'efflux soient régulés également de façon globale, comme décrit pour d'autres systèmes d'efflux au sein d'autres espèces bactériennes. C'est ce que suggèrent les résultats que nous avons obtenus avec le mutant d'AXX-A (AXX-A-HRA). En effet, ce mutant présente des niveaux de résistance aux antibiotiques substrats d'AxyXY-OprZ plus élevés que la souche d'origine (particulièrement aux aminosides) alors que nous n'avons détecté aucune mutation, ni dans l'opéron *axyXY-oprZ* d'AXX-A-HRA ni dans le gène régulateur *axyZ*. Cette observation conforte l'hypothèse de l'existence d'une régulation globale.

D'autres résultats suggèrent aussi que le niveau de production d'un système d'efflux peut influencer celui d'un autre système d'efflux. En effet, l'inactivation du gène *axyD* chez AXX-A entraîne une diminution de la CMI de plusieurs aminosides. Cette diminution de CMI est cependant beaucoup moins marquée que lors de l'inactivation d'*axyY* chez AXX-A. De plus, elle s'accompagne d'une légère diminution de la CMI d'autres substrats d'AxyXY-OprZ : la ceftazidime, le céfépime, l'ofloxacine, la tétracycline, la tigécycline et l'érythromycine. En revanche, il n'est observé aucune diminution de CMI des antibiotiques substrats d'AxyABM et non substrats d'AxyXY-OprZ (céfalotine, céfotétan, céfotaxime et aztréonam). L'inactivation d'*axyD* dans AXX-A semble donc avoir entraîné une répression de l'opéron *axyXY-oprZ*. Une mesure du niveau d'expression d'*axyY* dans le recombinant AXX-A- $\Delta$ D devra le confirmer. La régulation du niveau de production d'un système d'efflux par celui d'un autre système d'efflux a déjà été observée chez *P. aeruginosa* : l'inactivation de *mexAB-oprM* provoque une surexpression de *mexCD-oprJ* et de *mexEF-oprN* (Li *et al.*, 2000).

L'étude du couple de souches isogéniques sensible/résistante AXX-H1/AXX-H2 illustre les conséquences de la surexpression de l'un des systèmes étudiés, AxyABM, sur l'augmentation des niveaux de résistance aux antibiotiques. Les CMI de la ceftazidime, de la ciprofloxacine et des carbapénèmes (ertapénème, imipénème, méropénème et doripénème) sont plus élevées chez AXX-H2 que chez AXX-H1 (3 fois,  $\geq 3$  fois et 4 à 30 fois, respectivement). Nos résultats indiquent aussi que le niveau d'expression d'*axyB* est 2,3 fois plus élevé chez AXX-H2 que chez AXX-H1. Cette faible différence de niveau d'expression, similaire à celle observée chez *P. aeruginosa* pour MexAB-OprM (Dumas *et al.*, 2006 ; Llanes *et al.*, 2004), mériterait d'être confortée par d'autres séries de mesures sur d'autres couples de souches isogéniques sensible/résistante. Mais cette différence d'expression que nous avons observée est associée à une évolution du phénotype de résistance tout à fait cohérente avec le profil de substrats d'AxyABM. Les mécanismes ayant conduit à la surexpression d'AxyABM devront être explorés.

### III. Rôle des 3 systèmes d'efflux étudiés dans la résistance acquise d'*A. xylosoxidans* aux carbapénèmes

Nos résultats concernant les carbapénèmes étaient inattendus. En effet, l'inactivation de chacun des 3 gènes de transporteur (*axyB*, *axyY* et *axyD*), séparément, amène exactement aux mêmes résultats :

- de faibles variations de CMI pour la souche sauvage AXX-A,
- une restauration d'activité des 4 carbapénèmes sur la souche AXX-H2 (CMI quasiment identiques quel que soit le gène de transporteur inactivé).

AXX-H2- $\Delta$ **B**, AXX-H2- $\Delta$ **Y**, et AXX-H2- $\Delta$ **D** possèdent néanmoins un niveau résiduel de résistance plus élevé que celui de la souche sauvage AXX-A.

On peut donc envisager que chacun des 3 systèmes d'efflux participe de façon équivalente à l'acquisition de la résistance aux carbapénèmes.

Mais ces résultats peuvent aussi évoquer la possibilité d'une co-régulation de plusieurs mécanismes. La co-régulation de l'expression de systèmes d'efflux RND et de l'expression de(s) porine(s) impliquée(s) dans la pénétration intracellulaire des carbapénèmes a été décrite chez *P. aeruginosa* (Köhler *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2011; Perron *et al.*, 2004). Elle devra être explorée chez *A. xylosoxidans*.

D'autres mécanismes impliqués dans la résistance acquise des BGN aux carbapénèmes seront également à étudier chez *A. xylosoxidans*, au premier rang desquels des modifications de PLP (Protéines Liant la Pénicilline). Les PLP sont des enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane. Elles sont les cibles des  $\beta$ -lactamines. Une diminution d'affinité de certaines PLP pour l'imipénème a été rapportée dans des souches de *P. mirabilis* résistantes à l'imipénème (Neuwirth *et al.*, 1995) mais aussi dans des souches de *P. aeruginosa* résistantes à toutes les  $\beta$ -lactamines (Moyá *et al.*, 2012).

L'hypothèse d'une résistance aux carbapénèmes par production de  $\beta$ -lactamase a été écartée lors de précédents travaux sur les souches cliniques d'*A. xylosoxidans* de notre collection.

Différentes approches expérimentales permettraient de préciser le rôle de chacun des mécanismes précédemment cités dans la résistance acquise d'*A. xylosoxidans* aux carbapénèmes :

- l'inactivation de plusieurs gènes de pompes dans une souche résistante, afin de voir si les diminutions de CMI « se cumulent » pour aboutir à la restauration complète de la sensibilité aux carbapénèmes (CMI équivalentes à celles que l'on observe dans des souches sauvages),
- la quantification simultanée, dans des couples de souches sensible/résistante aux carbapénèmes, de l'expression des différents systèmes d'efflux ainsi que de celle de la (ou des) porine(s) impliquée(s) dans la diffusion des carbapénèmes à travers la membrane externe d'*A. xylosoxidans*,
- des mesures d'affinité des différentes PLP pour les carbapénèmes dans des couples de souches sensible/résistante ainsi que le séquençage des gènes codant pour les PLP à la recherche de mutations.

#### IV. Autres systèmes d'efflux chez *A. xylosoxidans*

Nous avons montré que deux systèmes d'efflux RND (AxyABM et AxyXY-OprZ) participaient à la résistance intrinsèque d'*A. xylosoxidans* aux antibiotiques et probablement aussi à la résistance acquise. Un troisième système, AxyCDJ, pourrait participer à la résistance acquise. Cependant, la résistance résiduelle à certains antibiotiques, malgré l'inactivation des systèmes d'efflux qui les exportent, suggère que d'autres mécanismes sont impliqués dans l'antibio-résistance d'*A. xylosoxidans*.

Au début de notre travail, nous avons étudié l'effet de plusieurs inhibiteurs d'efflux (réserpine, oméprazole, CCCP et PABN) sur le phénotype de résistance aux antibiotiques de la souche AXX-A.

Avec le CCCP et le PABN nous n'avons observé aucune modification de niveau de résistance. Le CCCP s'utilise habituellement en milieu liquide pour des tests d'accumulation d'antibiotiques. Il est possible que son incorporation dans un milieu gélosé ainsi que la concentration utilisée ne soient pas adaptées pour étudier son effet inhibiteur d'efflux. De

façon surprenante, le PABN n'a pas permis de restaurer l'activité d'antibiotiques sur AXX-A alors que plusieurs systèmes d'efflux RND participent à sa résistance aux antibiotiques.

La réserpine et l'oméprazole ont eu pour effet d'augmenter l'activité de plusieurs antibiotiques : des  $\beta$ -lactamines, des fluoroquinolones et des cyclines. Ces 2 inhibiteurs d'efflux sont connus pour agir en particulier sur les transporteurs MFS (Aeschlimann *et al.*, 1999; Mahamoud *et al.*, 2007). Il est donc possible que des transporteurs de ce type soient impliqués dans l'antibio-résistance d'*A. xylosoxidans*. La réserpine agit en altérant la génération de la force proton motrice (PMF) (Mahamoud *et al.*, 2007; Mohanty *et al.*, 2012). Nous savons qu'elle inhibe des transporteurs MFS de bactéries à Gram positif, mais elle pourrait avoir un effet inhibiteur sur les systèmes d'efflux RND qui utilisent aussi la PMF. C'est ce que constate Buroni dans son étude des systèmes d'efflux RND de *B. cenocepacia* (Buroni *et al.*, 2009). Les antibiotiques dont l'activité a été augmentée en présence de réserpine sur AXX-A sont des substrats des systèmes d'efflux RND que nous avons étudiés. Il est donc possible que la réserpine ait eu un effet inhibiteur sur ces systèmes RND.

Enfin, *A. xylosoxidans* résiste naturellement au cétrimide, un ammonium quaternaire. Les ammoniums quaternaires sont des molécules prises en charge par de nombreux systèmes d'efflux de type MFS, SMR ou RND (Nagai *et al.*, 2003; Poole, 2005).

Ces différents arguments nous ont conduits à rechercher d'autres gènes candidats d'efflux dans le génome d'AXX-A. Cette analyse a révélé la présence de 12 candidats de transporteurs RND autres que les 3 que nous avons étudiés. Mais nous avons également détecté la présence de 18 candidats de transporteurs MFS, 3 candidats de transporteurs MATE et de nombreux candidats de transporteurs ABC. En revanche, les gènes des 2 systèmes d'efflux décrits dans la souche d'*A. xylosoxidans* 31A (NccCBA et NreAB) n'ont été retrouvés ni dans les séquences génomiques des souches d'*A. xylosoxidans* AXX-A, A8 et C54, ni dans les séquences plasmidiques de la souche d'*A. xylosoxidans* A8 (plasmides pA81 et pA82).

Pour les travaux à venir, nous nous attacherons d'abord à l'étude des 2 homologues de *muxBC* de *P. aeruginosa* (AXXA\_13319-AXXA\_13324 et AXXA\_26395-AXXA\_26400) qui prend en charge l'aztréonam. En effet, l'inactivation d'*axyB* dans AXX-A ne restaure que partiellement l'activité de l'aztréonam (résistance résiduelle à 16 mg/l).

## V. Résistance acquise d'*A. xylosoxidans* aux antibiotiques chez les patients atteints de mucoviscidose

Les données de la littérature montrent que les résistances acquises d'*A. xylosoxidans* aux antibiotiques sont très fréquentes dans les souches isolées de patients atteints de mucoviscidose (Lambiase *et al.*, 2006; Magni *et al.*, 2007; Saiman *et al.*, 2001, 2002). L'émergence de ces résistances serait favorisée par la colonisation chronique de l'arbre bronchique comme le suggère une étude récente (Amoureux *et al.*, 2013).

La surexpression d'efflux RND a d'ores et déjà été incriminée dans l'acquisition de résistances par *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose :

- la résistance acquise aux aminosides est souvent liée à la surproduction de MexXY, qui peut elle-même être induite par l'exposition aux aminosides (Kindrachuk *et al.*, 2011),
- le stress oxydatif auquel sont exposées les bactéries au niveau des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose est également inducteur de l'expression de *mexXY* (Fraud and Poole, 2011),
- le micro-environnement hypoxique auquel est exposé *P. aeruginosa* dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose pourrait contribuer à l'augmentation des niveaux de résistance aux antibiotiques par efflux (Schaible *et al.*, 2012).
- en condition de biofilm, l'expression de *mexC* de *P. aeruginosa* est induite par l'exposition à l'azithromycine (Gillis *et al.*, 2005).

La surproduction de systèmes d'efflux RND pourrait être à l'origine de l'acquisition de résistances aux antibiotiques par les souches d'*A. xylosoxidans* qui colonisent les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. Les premiers résultats que nous avons obtenus par l'étude d'un couple de souches isogéniques sensible/résistante semblent conforter cette hypothèse. Un travail d'analyse transcriptomique portant sur différentes souches cliniques devrait contribuer à mieux cerner le rôle de chacun des systèmes d'efflux dans la résistance acquise aux antibiotiques par *A. xylosoxidans*.

# CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

---



Au cours de ce travail, le premier portant sur les systèmes d'efflux d'*A. xylosoxidans*, nous avons débuté la caractérisation de 3 systèmes RND capables d'exporter des molécules antibiotiques : AxyABM, AxyXY-OprZ et AxyCDJ. Les 2 premiers sont directement impliqués dans la multi-résistance naturelle de cette espèce aux antibiotiques : AxyABM participe à la résistance à l'aztréonam et à certaines céphalosporines, et AxyXY-OprZ est responsable de la résistance naturelle aux aminosides.

Nos résultats indiquent aussi que ces systèmes d'efflux RND seraient impliqués dans la résistance acquise à certaines molécules, notamment aux fluoroquinolones et aux carbapénèmes. Notre démarche expérimentale ne permet cependant pas de préciser le rôle joué par chacun des systèmes d'efflux dans cette résistance acquise.

Ce travail ouvre de nombreuses perspectives de recherche pour l'avenir autour de trois axes principaux :

1) La poursuite de l'étude du fonctionnement des trois systèmes d'efflux :

- Nous chercherons à préciser leur rôle éventuel dans le transport des pénicillines en procédant à une inactivation génique par délétion. En effet notre technique d'inactivation génique par insertion d'un gène codant pour une pénicillinase ne nous a pas permis d'évaluer ce rôle. Or la ticarcilline (seule ou en association avec l'acide clavulanique) est une pénicilline à large spectre fréquemment utilisée dans le traitement des infections à *Stenotrophomonas maltophilia* ou à *Pseudomonas aeruginosa*, pathogènes souvent associés à *A. xylosoxidans*. En cas de colonisation chronique par *A. xylosoxidans*, la sélection de mutants résistants à la ticarcilline est fréquente. Cette résistance n'est pas de type enzymatique. La ticarcilline étant une molécule substrat de MexAB-OprM chez *P. aeruginosa*, il est logique de chercher si elle fait ou non partie du pannel de substrats d'AxyABM.
- Nous étendrons l'étude des substrats à des molécules non antibiotiques, en particulier aux ammoniums quaternaires auxquels *A. xylosoxidans* est naturellement résistant. En effet, la survenue d'infections nosocomiales à *A. xylosoxidans* notamment dans les services de réanimation ainsi que les descriptions de cas de contamination de

dispositifs médicaux ou de solutions antiseptiques posent la question d'un réservoir hospitalier de la bactérie. Les produits d'entretien et les solutions antiseptiques à base d'ammoniums quaternaires sont très utilisés dans les établissements de santé, ils ont remplacé l'eau de javel depuis une dizaine d'année. Ils pourraient donc contribuer à la sélection et à l'émergence de la bactérie.

- Nous estimerons l'importance de la régulation locale dans la surexpression des systèmes d'efflux au sein de souches cliniques résistantes à différents antibiotiques par la recherche de mutations dans les gènes régulateurs locaux et par des expériences de mutagenèse dirigée.
- Enfin nous apprécierons si la présence de l'OMF OprZ est indispensable à l'expression de la résistance de haut niveau aux aminosides conférée par AxyXY-OprZ ou si d'autres OMF peuvent remplacer OprZ dans le complexe tripartite.

## 2) La recherche d'une résistance aux métaux :

La résistance aux métaux est largement rapportée chez les bacilles à Gram négatif non fermentaires. Elle est la conséquence, dans la majorité des cas, d'efflux actif. La détection d'une telle résistance pourrait contribuer à mieux cerner le réservoir environnemental d'*A. xylosoxidans* mais aussi les risques éventuels de colonisation de certains dispositifs médicaux. Nous avons déjà repéré le candidat RND AXX\_11945 homologue de *czcA* de *P. aeruginosa* et donc susceptible de coder pour un transporteur de métaux.

## 3) L'étude de l'impact des traitements administrés aux patients atteints de mucoviscidose sur le niveau d'expression des systèmes d'efflux :

Les patients atteints de mucoviscidose reçoivent souvent (et au long cours) des traitements administrés par voie inhalée. Il peut s'agir d'antibiotiques tels que la tobramycine, la colistine ou l'aztréonam (encore peu utilisé) ou de traitements mucolytiques. L'étude du niveau d'expression des systèmes d'efflux au sein de couples de souches isogéniques sensible/résistante isolées avant et après traitement servira à repérer les molécules potentiellement inductrices. Des tests

d'induction *in vitro* permettront de vérifier le caractère inducteur. Ces futurs travaux pourraient permettre de contribuer à l'élaboration de recommandations pour la prise en charge des patients chroniquement colonisés par *A. xylosoxidans*.

Les antibiotiques administrés pour le traitement des infections pulmonaires bactériennes ont largement contribué à allonger l'espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose. L'émergence d'un nombre croissant de bacilles à Gram négatif non fermentaires multi-résistants impose la recherche de nouvelles molécules actives contre ces bactéries, ou qui inhibent leurs mécanismes de résistance et restaurent ainsi l'activité des antibiotiques existants. La connaissance des mécanismes de résistance rencontrés au sein des espèces les plus fréquemment isolées doit donc permettre d'orienter judicieusement la recherche pharmaceutique. Nos travaux de caractérisation de systèmes d'efflux chez *A. xylosoxidans* rentrent dans ce cadre, ils pourront contribuer à définir des stratégies visant à conduire au développement de nouvelles molécules capables d'inhiber ces systèmes ou à développer des molécules non exportées par ces systèmes.

## **ANNEXE 1 : classification des antibiotiques**

---

## Classification des antibiotiques

Famille (ou classe)	Sous-famille	Antibiotique	Abréviation
β-lactamines (BL)	Pénicillines (Péni)	Pénicilline G	PG
		Amoxicilline	AMX
		Ampicilline	AMP
		Ticarcilline	TIC
		Carbénicilline	CAR
		Pipéracilline	PIP
		Cloxacilline	CLOX
	Inhibiteurs de β-lactamases	Acide clavulanique	CLAV
		Tazobactam	TAZ
	Pénicillines + inhibiteurs	Amoxicilline + acide clavulanique	AMC
		Ticarcilline + acide clavulanique	TCC
		Pipéracilline + tazobactam	TZP
	Céphalosporines (Céphalo)	Céfaloine	CF
		Céphalexine	CEX
		Céfaclor	CEF
		Céfuroxime	CXM
		Céfotétan	CFT
		Céfoxitine	FOX
		Ceftriaxone	CRO
		Céfotaxime	CTX
		Ceftazidime	CAZ
		Céfixime	FIX
		Cefpodoxime	PDX
		Céfépime	FEP
		Cefpirome	CPO
	Monobactame	Aztréonam	ATM
	Carbapénèmes	Ertapénème	ETP
Imipénème		IPM	
Méropénème		MEM	
Doripénème		DOR	
Quinolones	Quinolone 1 <sup>ère</sup> génération	Acide nalidixique	NAL
	Fluoroquinolones (FQ)	Norfloxacin	NOR
		Ofloxacin	OFL
		Lévofoxacin	LVX
		Moxifloxacin	MXF
		Sparfloxacin	SPX
		Ciprofloxacine	CIP
Aminosides (aminoglycosides, AG)	Kanamycine	KAN	
	Tobramycine	TM	
	Amikacine	AN	
	Gentamicine	GM	
	Nétilmicine	NET	
	Isépaamicine	ISP	
	Streptomycine	SM	
Néomycine	NEO		

---

**Classification des antibiotiques (suite)**

---

<b>Famille (ou classe)</b>	<b>Sous-famille</b>	<b>Antibiotique</b>	<b>Abréviation</b>
Cyclines	Cyclines	Tétracycline	TC
		Doxycycline	DOX
		Minocycline	MIN
	Glycylcycline	Tigécycline	TIG
Macrolides (et apparentés)	Macrolides (M)	Erythromycine	ERY
		Azithromycine	AZI
		Spiramycine	SPI
		Clarithromycine	CLA
	Lincosamides	Lincomycine	LIN
	Streptogramines	Streptogramines A/B	Sa / Sb
Polymyxines		Colistine	CS
		Polymyxine B	PXB
Phénicolés		Chloramphénicol	CHL
Sulfamides		Sulfaméthoxazole	SUL
		Sulfadiazine	SDZ
-		Triméthoprim	TMP
-		Cotrimoxazole	SXT
Rifamycines		Rifampicine	RIF
-		Acide fusidique	AF
-		Novobiocine	NOV

---

## **ANNEXE 2 : amorces utilisées**

---

Amorces utilisées				
Nom de l'amorce	Séquence nucléotidique (5'-3')	Position sur le gène	Taille attendue (pb)	Utilisation
<b><u>PCR de détection</u></b>				
mexB2-F	AACGTGCAGATTTCCTCCGG	631..650	1100	Détection de <i>mexB</i>
mexB2-R	TGTACCTGGGCGAACAGTAC	1730..1711		
AL-oprZ-F1	STTCCGGCAMGTGGCCGA	1098..1115	177 (avec AL-oprZ-R1)	
AL-oprZ-F3	TACGACGCMGGCTGGAAA	589..607	685 (avec AL-oprZ-R1)	Détection d' <i>oprZ</i>
AL-oprZ-R1	GAYTCGAACARCGCTGGCT	1274..1256		
ORF1-F1	CCGGTGCCYTCGATSAGCA	698..680	610 (avec ORF1-R1)	
ORF1-F2	CSACSCGCTGCTCCAGCA	376..359	288 (avec ORF1-R1)	Détection d' <i>AXXA_16901</i>
ORF1-R1	CGTCGCTGTCCAAGCGCAT	89..107		
ORF2-F1	TCGCTGGGCAAAAGCCCAT	554..535		
ORF2-R1	GCSGTGCGCCAGCAGATG	136..153	419 (avec ORF2-F1)	Détection d' <i>AXXA_16876</i>
ORF2-R2	GCCGAVATGACGGTGCAGAT	271..290	284 (avec ORF2-F1)	
<b><u>RT-PCR</u></b>				
RT-INA-R0	ACCATGTCGCCATCCTTGTT	2393..2374	1040 (+/- pINAaxyB)	Vérification de l' inactivation d' <i>axyB</i>
RT-INA-F1	GTGTTTCATCCCGATGGCGTT	1354..1373		
rps1-F	GCGAAGTCAGCATCATCAAA	35..54	134	RT-PCR quantitative : gène référence <i>rps1</i>
rps1-R	ACGCACCTTTGGCAACCTTAC	168..149		
axyB-qper2-F	TGATCTATCGCCAGTTCCTCCA	1394..1414	108	RT-PCR quantitative : gène <i>axyB</i>
axyB-qper2-R	GAATCGGCTTGAGCAGCGT	1501..1483		

Plus de 2 amorces ont été nécessaires pour détecter *oprZ*, *AXXA\_16901* et *AXXA\_16876*, en raison de variations de séquence entre les souches. Nucléotides en rouge : positions dégénérées (S : C ou G ; M : A ou C ; Y : C ou T ; R : A ou G ; V : A ou C ou G). Positions des amorces : définies par rapport au codon Start du gène.



Amorces utilisées					
Nom de l'amorce	Séquence nucléotidique (5'-3')	Position sur le gène	Taille attendue (pb)	Utilisation	
<b>Construction des plasmides suicide</b>					
INA-axyB-2F	GGGGAATTCCTATCGCCAGTTCCTCCATCA	1397..1417	995	pINA-axyB	
INA-axyB-2R	GGGAAGCTTGGCACGTACCAATTTGTCCA	2373..2354			
INA-axyR-F	GGGGAATTCCTCGATGAAGATCCGGGTCTT	843..823	855	pINA-axyR-AXX-A	
INA-axyR-R	GGGAAGCTTCTTCGTGGAGGTGCCAA	7..26			
INA-axyY-F	CGGTACCCGGGGATCCAGGGCAGCTTCATGGCCAT	1696..1715	785	pINA-axyY	
INA-axyY-R	CGACTCTAGAGGATCGGGAAAGCCGTTGTAGCCGTT	2450..2431			
INA-axyZ-F	CGGTACCCGGGGATCGGGCCAGATATCGCCCTT	562..544	699	pINA-axyZ-AXX-A	
INA-axyZ-R	CGACTCTAGAGGATCCTGGCGCCTGCATACTTCTT	-107..-87			
INA-axyD-AXXA-F	GGGGAATTCCTCAAGCAACGCCCTGCAGGAA	923..942	745	pINA-axyD-AXX-A	
INA-axyD-AXXA-R	GGGAAGCTTACGATGGCCGCGTAGATCA	1649..1631			
INA-axyD-AXXH2-F	CGGTACCCGGGGATCGACGTTGCAGAACCCGCATCAAG	316..336	952	pINA-axyD-AXX-H2	
INA-axyD-AXXH2-R	CGACTCTAGAGGATCCGATGGCGTCTGTCCACCAG	1237..1219			
<b>Vérification de l'insertion des plasmides suicide dans les gènes à inactiver</b>					
M14F	CCAGGGTTTTCCACAGTCACAGA	-45..-25 (avant HindIII)	146 (sans insert)	Amorces encadrant le MCS de pUC18 et de pUC19	
M14R	GCGGATAACAATTTACACACAGGA	+44..+22 (après EcoRI)			
AL-BAP1-F1	TGTACCTGTTCTCTGCAGAAC	1064..1083	1361 (avec M14F)	pINA-axyB (axy/B)	
AL-BAP1-R1	AAGTACACGTCGTTGGACAG	2777..2758	1431 (avec M14R)		
V-INA-axyR-F	CATGAATGGCCGGGTATCCTT	900..880	945 (avec M14F)	pINA-axyR-AXX-A (axy/R)	
V-INA-axyR-R	TCGACGCTTTGCTGCATTGC	-148..-129	1042 (avec M14R)		
V-INA-axyY-F	CGCCTGACCCACGCGCTATA	1555..1573	980 (avec M14R)	pINA-axyY (axy/Y)	
V-INA-axyY-R	CGGACAGCCGCTCTTCGTA	2590..2572	964 (avec M14F)		
V-INA-axyZ-F	GCGGCCCAATAGAAAGCCTT	+98..+80 (après Stop)	867 (avec M14R)	pINA-axyZ-AXX-A (axy/Z)	
V-INA-axyZ-R	AATTATTGTGAGCCGCCCGTT	-225..-205	846 (avec M14F)		
V-INA-axyD-AXXA-F	GGGCCACAGCTACGACTT	818..836	901 (avec M14F)	pINA-axyD-AXX-A (axy/D)	
V-INA-axyD-AXXA-R	AGCGACATCAGGTGCTGCT	1805..1787	933 (avec M14R)		
V-INA-axyD-AXXH2-F	CTTCGAGCCCGGCACCCGAT	279..297	1042 (avec M14R)	pINA-axyD-AXX-H2 (axy/D)	
V-INA-axyD-AXXH2-R	GGCCATGATGCGTTCGACGT	1269..1250	1023 (avec M14F)		

**GAATTC** et **AAGCTT** : sites de restriction EcoRI et HindIII (clonage conventionnel); **ITALIQUES** : queues de nucléotides (clonage Kit In-fusion<sup>®</sup>).  
Positions des amorces : par rapport au codon Start du gène ; MCS : site de clonage multiple.

## **ANNEXE 3 : tableaux de CMI**

---

**Système AxyABM. CMI de 30 antibiotiques : souches cliniques et leurs recombinaisons AB (axyB::Tic) ou AR (axyR::Tic).**

Antibiotique	CMI (mg/l)									
	AXX-A	AXX-A-AB	AXX-A-AR	AXX-D3	AXX-D3-AB	AXX-H1	AXX-H1-AB	AXX-H2	AXX-H2-AB	
Céfaloïne	24	12 (2)		24	4 (6)	>256	>256	>256	>256	
Céfaclor	≥256	≥256								
Céfuroxime	>256	>256								
Céfotétan	>256	32 (>8)	>256	>256	16 (>16)	>256	96 (>2,7)	>256	>256	
Céfoxitine	>256	128 (>2)	>256	>256	128 (>2)	>256	>256	>256	>256	
Ceftriaxone	≥256	12 (>20)								
Céfotaxime	>256	12 (>20)	128 (>2)	>256	16 (>16)	>256	48 (>5)	>256	>256	
Ceftazidime	4	1,5 (2,7)	2 (2)	48	24 (2)	16	6 (2,7)	48	16 (3)	
Céfixime	>256	32 (>8)								
Cefpodoxime	>256	>256								
Céfépime	16	16	16	>256	>256	>256	>256	>256	>256	
Cefpirome	128									
Aztréonam	>256	16 (>16)	>256	>256	32 (>8)	>256	≥256	>256	>256	
Ertapénème	0,064	0,023 (2,8)	0,032 (2)	0,064	0,016 (4)	0,38	0,016 (24)	3	0,125 (24)	
Imipénème	1	1	0,75	1,5	1	1	0,5 (2)	4	2 (2)	
Méropénème	0,094	0,094	0,094	0,064	0,032 (2)	0,38	0,125 (3)	12	2 (6)	
Doripénème	0,19	0,094 (2)	0,094 (2)	0,25	0,125 (2)	0,75	0,125 (6)	16	1,5 (10)	
Acide nalidixique	24	6 (4)	16	256	64 (4)	≥256	16 (≥16)	>256	256	
Norfloxacine	8	4 (2)	8							
Ofloxacine	2	1 (2)	3	16	12	>32	12 (>2,7)			
Lévofloxacine	0,75	0,38 (2)	1	6	4	8	3 (2,7)	16	8 (2)	
Ciprofloxacine	0,75	0,5	1	8	8	12	4 (3)	>32	16 (>2)	
Tobramycine	16	16	12							
Amikacine	≥256	≥256								
Gentamicine	64	64								
Tétracycline	48	48	48	64	48	192	192	>256	>256	
Doxycycline	8	6	8	32	32	64	64	64	64	
Tigécycline	4	4								
Colistine	4	4								
Chloramphenicol	12	6 (2)		192	128	32	24	>256	>256	

*Valeurs entre parenthèses : facteurs de diminution de CMI (≥2) par rapport aux souches d'origine.*

**Système AxyXY-OprZ. CMI de 23 antibiotiques : souches cliniques, recombinants ΔY (axyY::Tic) ou ΔZ (axyZ::Tic), et mutant AXX-A-HRA.**

Antibiotique	CMI (mg/l)										
	AXX-A	AXX-A-AY	AXX-A-ΔZ	AXX-A-HRA	AXX-D3	AXX-D3-AY	AXX-H2	AXX-H2-ΔY	AXX-A-ΔZ	AXX-A-HRA	AXX-A-AY
Céfaloine	24		16	24							
Ceftazidime	4	2 (2)	4	6	48	24 (2)	48	24 (2)			
Céfépime	16	8 (2)	96 (6)	96 (6)	>256	24 (11)	>256	>256			
Aztréonam	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256			
Ertapénème	0,064	0,016 (4)	0,047	0,094	0,064	0,047	3	0,75 (4)			
Imipénème	1	0,5 (2)	1	1,5	1,5	1	4	1 (4)			
Méropénème	0,094	0,047 (2)	0,064	0,094	0,064	0,032 (2)	12	2 (6)			
Doripénème	0,19	0,047 (4)	0,19	0,38 (2)	0,25	0,19	16	1,5 (10)			
Acide nalidixique	24	12 (2)	32	32	>256	>256	>256	>256			
Norfloxacine	8	4 (2)	24 (3)	12	>256	24 (11)	>256	128 (>2)			
Ofloxacine	2	1,5	12 (6)	4 (2)	>32	24	>32	>32			
Lévofloxacine	0,75	0,75	4 (5,3)	1	16	4 (4)	>32	8 (>4)			
Ciprofloxacine	0,75	0,5	3 (4)	2 (2,7)	>32	3 (>11)	>32	8 (>4)			
Kanamycine	32	2 (16)	>256 (>8)	256 (8)	>256	3 (>85)	>256	12 (>21)			
Tobramycine	16	1,5 (10)	128 (8)	96 (6)	24	0,5 (48)	32	1 (32)			
Amikacine	256	2 (128)	>256	>256	96	0,25 (384)	>256	3 (>85)			
Gentamicine	48	1 (48)	>256 (>5,3)	96 (2)	12	0,094 (128)	48	0,75 (64)			
Nétilmicine	32	2 (16)	>256 (>8)	256 (8)	64	0,75 (85)	192	1 (192)			
Tétracycline	48	12 (4)	96 (2)	96 (2)	>256	32 (>8)	>256	>256			
Doxycycline	8	3 (2,7)	12	2 (4)	48	12 (4)	128	24 (5,3)			
Tigécycline	4	0,75 (5,3)	8 (2)	1,5 (2,7)	8	1 (8)	6	2 (3)			
Erythromycine	64	16 (4)		128 (2)	>256	6 (>43)	>256	>256			
Chloramphénicol	12	8	16	8	>256	>256	>256	192			

Valeurs entre parenthèses : facteurs de variation de CMI (≥2) par rapport aux souches d'origine (diminution, augmentation).

**Système AxyCDJ. CMI de 24 antibiotiques : souches cliniques et recombinants  $\Delta D$  (axyD::Tic).**

Antibiotique	CMI (mg/l)					
	AXX-A	AXX-A- $\Delta D$	AXX-H2	AXX-H2- $\Delta D$	AXX-A	AXX-A- $\Delta D$
Céfaloine	16	16	>256	>256	>256	>256
Céfotétan	>256	>256	>256	>256	>256	>256
Céfotaxime	>256	>256	>256	>256	>256	>256
Ceftazidime	4	3	48	24 (2)	24 (2)	24 (2)
Céfépime	12	8	>256	>256	>256	>256
Aztréonam	>256	>256	>256	>256	>256	>256
Ertapénème	0,064	0,023 (2,8)	3	0,75 (4)	0,75 (4)	0,75 (4)
Imipénème	1	0,75	4	1,5 (2,7)	1,5 (2,7)	1,5 (2,7)
Méropénème	0,094	0,047 (2)	12	1,5 (8)	1,5 (8)	1,5 (8)
Doripénème	0,19	0,047 (4)	16	1 (16)	1 (16)	1 (16)
Acide nalidixique	24	24	>256	>256	>256	>256
Norfloxacine	8	8	>256	>256	>256	>256
Ofloxacine	2	1,5	>32	>32	>32	>32
Lévofloxacine	0,75	0,75	>32	>32	>32	>32
Ciprofloxacine	0,75	0,75	>32	>32	>32	>32
Kanamycine	64	24 (2,7)	>256	>256	>256	>256
Tobramycine	12	8	32	32	32	32
Amikacine	256	48 (5,3)	>256	>256	>256	>256
Gentamicine	16	8 (2)	48	48	48	48
Nétilmicine	24	24	192	192	192	192
Tétracycline	48	32	>256	>256	>256	>256
Doxycycline	4	3	128	128	128	128
Tigécycline	4	3	6	6	6	6
Erythromycine	64	48	>256	>256	>256	>256

*Valeurs entre parenthèses : facteurs de diminution de CMI ( $\geq 2$ ) par rapport aux souches d'origine.*

## **ANNEXE 4 : article 1**

---

## First Description of an RND-Type Multidrug Efflux Pump in *Achromobacter xylosoxidans*, AxyABM<sup>∇</sup>

Julien Bador,<sup>1</sup> Lucie Amoureux,<sup>1</sup> Jean-Marie Duez,<sup>1</sup> Anthony Drabowicz,<sup>1</sup> Eliane Siebor,<sup>1</sup> Catherine Llanes,<sup>2</sup> and Catherine Neuwirth<sup>1\*</sup>

Department of Bacteriology, University Hospital of Dijon, BP 37013, 21070 Dijon Cedex, France,<sup>1</sup> and Department of Bacteriology, University of Franche-Comte, Faculty of Medicine, F-25030 Besançon, France<sup>2</sup>

Received 14 March 2011/Returned for modification 16 May 2011/Accepted 22 July 2011

***Achromobacter xylosoxidans* is an emerging pathogen in cystic fibrosis patients. The multidrug resistance of these bacteria remains poorly understood. We have characterized in a clinical strain the first resistance-nodulation-cell division (RND)-type multidrug efflux pump in this species: AxyABM. The inactivation of the transporter component *axyB* gene led to decreased MICs of cephalosporins (except ceftazidime), aztreonam, nalidixic acid, fluoroquinolones, and chloramphenicol.**

*Achromobacter xylosoxidans* is a nonfermentative Gram-negative bacillus considered to be an opportunistic agent (1, 25). It is an emerging pathogen in cystic fibrosis (CF) (6, 20). Currently, 120 patients are followed at our CF center, of whom 24 (20%) have been colonized at least once by *A. xylosoxidans*. It has recently been suggested that *A. xylosoxidans* might be responsible for a high inflammatory response and therefore might be involved in the decline in lung function (9). This microorganism exhibits innate antibiotic multiresistance, including resistance to cephalosporins (except ceftazidime), aztreonam, and aminoglycosides (1, 2, 8, 22). There are only a few reports that describe resistance mechanisms in this species. To date, only the constitutive oxacillinase OXA-114 (7) and a couple of acquired  $\beta$ -lactamases belonging to VEB, IMP, and VIM families have been described (11, 15, 21, 23, 24). Nevertheless the mechanisms of intrinsic resistance of *A. xylosoxidans* to cephalosporins, aztreonam, and aminoglycosides remain unknown.

Resistance-nodulation-cell division (RND)-type efflux pumps are widely present among nonfermentative Gram-negative bacilli (3–5, 10, 14, 17, 19). In a preliminary experiment on *A. xylosoxidans*, we investigated the effect of reserpine, an efflux pump inhibitor, on MIC values of various antibiotics commonly used to treat CF patients. We observed an increased activity of drugs from different families such as  $\beta$ -lactams, fluoroquinolones, and tetracyclines. This prompted us to investigate the presence of an efflux mechanism in this species.

For this purpose, we chose the clinical strain AXX-A, isolated in our laboratory. This strain harbors a wild-type antibiotic resistance phenotype (Table 1): it is susceptible to ticarcillin, ceftazidime, carbapenems, and ciprofloxacin but resistant to cephalothin, cefoxitin, cefotaxime, cefepime, aztreonam, nalidixic acid, and aminoglycosides. The strain was identified by using the API20NE system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and confirmed by 16S rRNA gene sequencing.

We designed multiple sets of primers in conserved regions of RND efflux genes from *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Burkholderia cenocepacia*. With the primers MexB2-F and MexB2-R (Table 2) we amplified in AXX-A a 1,097-bp sequence sharing 88% similarity with the *acrB* gene from *Bordetella bronchiseptica*. We then determined the complete sequence of a putative RND efflux operon by using the two-step gene walking method (16). This operon is composed of three putative open reading frames (ORFs) encoding a membrane fusion protein (designated AxyA), a RND transporter protein (AxyB), and an outer membrane protein (AxyM). Upstream and in an inverted orientation we detected an ORF encoding a transcriptional regulator belonging to the LysR family (AxyR) without any homology with MexR.

The standard protein BLAST program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) was used to detect protein sequence similarities. The gene products AxyA, AxyB, and AxyM showed very strong homologies with putative RND-type efflux proteins from *A. xylosoxidans* A8, *Achromobacter piechaudii* ATCC 43553, and *Bordetella bronchiseptica* RB50 (Fig. 1). The putative efflux systems have not been studied in these species. Nevertheless, AxyB shares 72% identity with the *P. aeruginosa* MexB protein, which is the RND transporter component of the well-characterized MexAB-OprM efflux system (18). We sequenced the *axyABM* operon in both AXX-A and another clinical strain (AXX-C) entirely. While AXX-A and AXX-C AxyABMs share 99% similarity, the percentage of identity was surprisingly lower (90 to 94%) for AxyABM from the environmental strain *A. xylosoxidans* A8.

We studied the role of AxyABM in the innate antibiotic resistance of *A. xylosoxidans* by inactivating *axyB* in AXX-A. The suicide plasmid pINAP1, derived from vector pUC18, was constructed in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  cells by cloning a 977-bp EcoRI-HindIII PCR fragment internal to the *axyB* gene (nucleotide positions 3847 to 4823 in *axyABM*) obtained with primers INA-axyB-2F and INA-axyB-2R. Then pINAP1 was introduced into AXX-A by electroporation. The recombinant AXX-A (*axyB*::Tic), named AXX-A- $\Delta$ P, was selected on Mueller-Hinton agar plates containing 50  $\mu$ g/ml of ticarcillin. The *axyB* disruption by pINAP1 integration was confirmed by

\* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Universitaire, Plateau technique de Biologie, BP 37013, 21070 Dijon Cedex, France. Phone: 33-3 80 29 32 60. Fax: 33-3 80 29 32 80. E-mail: catherine.neuwirth@chu-dijon.fr.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 1 August 2011.

TABLE 1. MICs of 24 antibiotics for AXX-A and AXX-A-ΔP (*axyB*::Tic)

Antibiotic	MIC (μg/ml) for:	
	AXX-A	AXX-A-ΔP
Ticarcillin	0.25	>256
Ticarcillin-clavulanic acid	0.5	0.5
Cephalothin	24	12
Cefuroxime	>256	>256
Cefotetan	>256	32
Cefoxitin	>256	128
Ceftriaxone	≥256	12
Cefotaxime	>256	12
Ceftazidime	4	1.5
Cefixime	>256	32
Cefepime	16	16
Aztreonam	>256	16
Imipenem	1	1
Meropenem	0.094	0.094
Nalidixic acid	24	6
Norfloxacin	8	4
Ofloxacin	2	1
Levofloxacin	0.75	0.38
Ciprofloxacin	0.75	0.5
Tobramycin	16	16
Amikacin	≥256	≥256
Tigecycline	4	4
Colistin	4	4
Chloramphenicol	12	6

PCRs (two sets of primers, AL-BAP1-F1/M14 and M14R/AL-BAP1-R1). The absence of *axyB* expression in AXX-A-ΔP was demonstrated by reverse transcription-PCR with primers RT-INA-R0 and RT-INA-F1 (AXX-A was used as a positive control). We determined the MICs of a panel of antibiotics for AXX-A and AXX-A-ΔP by using the Etest method (bioMérieux, Marcy l’Etoile, France). The MICs of most of the cephalosporins and aztreonam drastically decreased as a result of the *axyB* inactivation (by more than 20-fold for ceftriaxone and cefotaxime) (Table 1). The activity of nalidixic acid, fluoroquinolones, and chloramphenicol was also enhanced in AXX-A-ΔP. Thus, the inactivation of *axyB* in AXX-A led to increased susceptibility to several antibiotics belonging to different families. However, no variation was noticed for imipenem, meropenem, colistin, tigecycline, and aminoglycosides. Therefore, AxyABM is not involved in the innate resistance of *A. xylosoxidans* to aminoglycosides. Spontaneous revertants

TABLE 2. Primers used in the study

Primer	Nucleotide sequence (5’-3’)
MexB2-F	.....AACGTGCAGATTTTCCTCCGG
MexB2-R	.....TGTACCTGGGCGAACAGTAC
INA-axyB-2F	.....GGGGAATTTCTCTATCGCCAGTTCTCCATCA <sup>a</sup>
INA-axyB-2R	.....GGGAAGCTTGCACCGTACCATTTGTCCA <sup>b</sup>
AL-BAP1-F1	.....TGTACCTGTTCTTCGAGAAC
M14F <sup>c</sup>	.....CCAGGGTTTTCCAGTACCGA
M14R <sup>c</sup>	.....GCGGATAACAATTTACACAGGA
AL-BAP1-R1	.....AAGTACACGTCGTTGGACAG
RT-INA-R0	.....ACCATGTCGCCATCCTTGTT
RT-INA-F1	.....GTGTTTCATCCCGATGGCGTT

<sup>a</sup> The EcoRI restriction site introduced into the primer is underlined.  
<sup>b</sup> The HindIII restriction site introduced into the primer is underlined.  
<sup>c</sup> Primer designed in pINAP1.

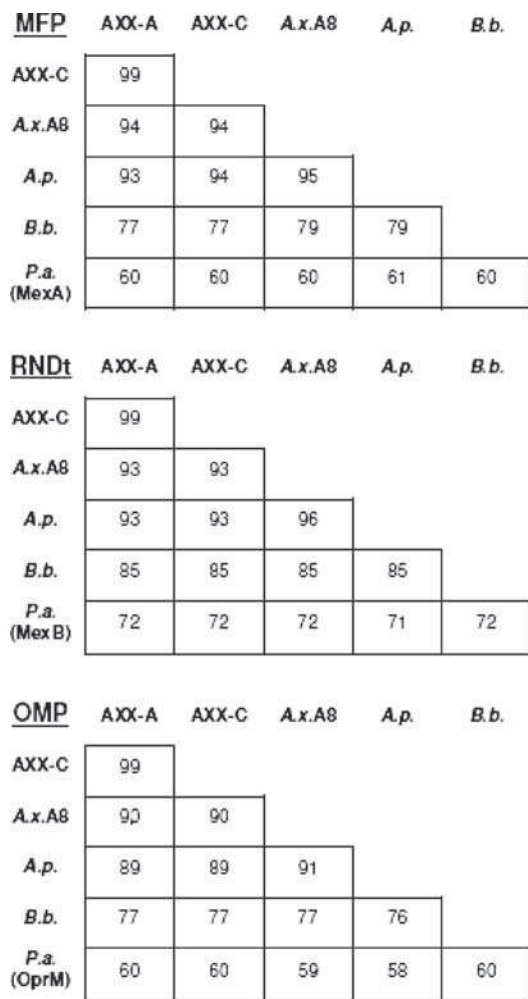


FIG. 1. Amino acid sequence similarities (%). MFP, membrane fusion protein (AxyA and homologues); RNDt, RND transporter (AxyB and homologues); OMP, outer membrane protein (AxyM and homologues); A.x.A8, *A. xylosoxidans* A8; A.p., *Achromobacter piechaudii* ATCC 43553; B.b., *Bordetella bronchiseptica* RB50; P.a., *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

were obtained by cultivating AXX-A-ΔP without ticarcillin. The loss of the inserted pINAP1, confirmed by PCRs, led to phenotypic reversion.

This is the first description of an antibiotic resistance mechanism by efflux within the genus *Achromobacter*. Antibiotics commonly used for the management of lung infections in CF patients, like ceftazidime and ciprofloxacin, are substrates of this efflux system. AxyABM shares some properties with MexAB-OprM from *P. aeruginosa* since it exports β-lactams (except imipenem), fluoroquinolones, and chloramphenicol but not aminoglycosides (12, 13, 18). However, unlike MexAB-OprM, AxyABM exports neither cefepime nor meropenem. From our preliminary study, we noticed a decrease in tigecycline MIC in the presence of reserpine for the AXX-A strain. These data strongly suggest that tigecycline is a substrate for an efflux system. The MIC of tigecycline was not changed following *axyB* inactivation in AXX-A; tigecycline is therefore not a substrate for AxyABM. It is likely that other efflux systems take part in the antibiotic resistance of *A. xylosoxidans*.



In conclusion, we have shown that the AxyABM efflux system is one of the mechanisms involved in the innate multidrug resistance of *A. xylosoxidans*. Furthermore, it can extrude antibiotics widely used to treat CF patients. Therefore, its role in acquired antibiotic resistance and its regulation mechanisms remain to be explored.

**Nucleotide sequence accession number.** The nucleotide sequence reported here has been assigned accession number JF514544 in the GenBank database.

We acknowledge the contributions of Gael Belliot and Philip Bastable for revising the manuscript.

#### REFERENCES

- Aisenberg, G., K. V. Rolston, and A. Safdar. 2004. Bacteremia caused by *Achromobacter* and *Alcaligenes* species in 46 patients with cancer (1989–2003). *Cancer* **101**:2134–2140.
- Almuzara, M., et al. 2010. In vitro susceptibility of *Achromobacter* spp. isolates: comparison of disk diffusion, Etest and agar dilution methods. *Int. J. Antimicrob. Agents* **35**:68–71.
- Alonso, A., and J. L. Martinez. 2000. Cloning and characterization of SmeDEF, a novel multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3079–3086.
- Burns, J. L., C. D. Wadsworth, J. J. Barry, and C. P. Goodall. 1996. Nucleotide sequence analysis of a gene from *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* encoding an outer membrane lipoprotein involved in multiple antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:307–313.
- Chan, Y. Y., T. M. Tan, Y. M. Ong, and K. L. Chua. 2004. BpeAB-OprB, a multidrug efflux pump in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1128–1135.
- De Baets, F., P. Schelstraete, S. Van Daele, F. Haerynck, and M. Vaneechoutte. 2007. *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance. *J. Cyst. Fibros.* **6**:75–78.
- Doi, Y., L. Poirrel, D. L. Paterson, and P. Nordmann. 2008. Characterization of a naturally occurring class D beta-lactamase from *Achromobacter xylosoxidans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:1952–1956.
- Glupczynski, Y., W. Hansen, J. Freney, and E. Yourassowsky. 1988. In vitro susceptibility of *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxidans* to 24 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**:276–278.
- Hansen, C. R., et al. 2010. Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* **9**:51–58.
- Hearn, E. M., J. J. Dennis, M. R. Gray, and J. M. Foght. 2003. Identification and characterization of the emhABC efflux system for polycyclic aromatic hydrocarbons in *Pseudomonas fluorescens* cLP6a. *J. Bacteriol.* **185**:6233–6240.
- Iyobe, S., et al. 2002. Detection of a variant metallo-beta-lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:2014–2016.
- Lister, P. D., D. J. Wolter, and N. D. Hanson. 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**:582–610.
- Masuda, N., et al. 2000. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3322–3327.
- Moore, R. A., D. DeShazer, S. Reckseidler, A. Weissman, and D. E. Woods. 1999. Efflux-mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:465–470.
- Neuwirth, C., et al. 2006. VEB-1 in *Achromobacter xylosoxidans* from cystic fibrosis patient, France. *Emerg. Infect. Dis.* **12**:1737–1739.
- Pilhofer, M., et al. 2007. Characterization of bacterial operons consisting of two tubulins and a kinesin-like gene by the novel two-step gene walking method. *Nucleic Acids Res.* **35**:e135.
- Poole, K. 2001. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**:255–264.
- Poole, K., K. Krebes, C. McNally, and S. Neshat. 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.* **175**:7363–7372.
- Poole, K., and R. Srikumar. 2001. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**:59–71.
- Razvi, S., et al. 2009. Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995 to 2005. *Chest* **136**:1554–1560.
- Riccio, M. L., L. Pallecchi, R. Fontana, and G. M. Rossolini. 2001. In70 of plasmid pAX22, a *bla*<sub>VIM-1</sub>-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1249–1253.
- Saiman, L., et al. 2001. Identification and antimicrobial susceptibility of *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3942–3945.
- Shibata, N., et al. 2003. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J. Clin. Microbiol.* **41**:5407–5413.
- Sofianou, D., A. Markogiannakis, E. Metzidie, S. Pournaras, and A. Tsakris. 2005. VIM-2 metallo-beta-lactamase in *Achromobacter xylosoxidans* in Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **24**:854–855.
- Tena, D., A. Gonzalez-Praetorius, M. Perez-Balsalobre, O. Sancho, and J. Bisquert. 2008. Urinary tract infection due to *Achromobacter xylosoxidans*: report of 9 cases. *Scand. J. Infect. Dis.* **40**:84–87.

## **ANNEXE 5 : article 2**

---

# Innate Aminoglycoside Resistance of *Achromobacter xylosoxidans* Is Due to AxyXY-OprZ, an RND-Type Multidrug Efflux Pump

Julien Bador, Lucie Amoureux, Emmanuel Blanc, Catherine Neuwirth

Department of Bacteriology, University Hospital of Dijon, Dijon, France

***Achromobacter xylosoxidans* is an innately multidrug-resistant pathogen which is emerging in cystic fibrosis (CF) patients. We characterized a new resistance-nodulation-cell division (RND)-type multidrug efflux pump, AxyXY-OprZ. This system is responsible for the intrinsic high-level resistance of *A. xylosoxidans* to aminoglycosides (tobramycin, amikacin, and gentamicin). Furthermore, it can extrude cefepime, carbapenems, some fluoroquinolones, tetracyclines, and erythromycin. Some of the AxyXY-OprZ substrates are major components widely used to treat pulmonary infections in CF patients.**

*Achromobacter xylosoxidans* is an opportunistic human pathogen (1, 2) that is increasingly isolated from the respiratory tract of cystic fibrosis (CF) patients (3–5). Recent studies underscore its probable involvement in the inflammatory response and in the decline of the lung function (6, 7). This species exhibits innate resistance to many antibiotics, including cephalosporins (except ceftazidime), aztreonam, and aminoglycosides (1, 8–10). Clinical strains frequently harbor acquired resistances, especially to ceftazidime, ciprofloxacin, and carbapenems. We have recently described the first resistance-nodulation-cell division (RND)-type multidrug efflux pump in *A. xylosoxidans*, AxyABM (11). This system shares some properties with the *Pseudomonas aeruginosa* MexAB-OprM efflux pump: AxyABM can extrude cephalosporins (except cefepime), fluoroquinolones, and chloramphenicol. Moreover, AxyABM plays a major role in the innate resistance to aztreonam. Nevertheless, the mechanism(s) leading to aminoglycoside and cefepime resistance remain(s) unknown. It is likely that other efflux systems contribute to the antibiotic resistance of *A. xylosoxidans*, since the use of reserpine, an efflux pump inhibitor, leads to decreased MICs of tetracyclines, which are not substrates of AxyABM (11).

We have determined the whole-genome shotgun sequence of the *A. xylosoxidans* AXX-A strain (GenBank accession number AFRQ01000000). We examined this sequence looking for homology with *mexX* and *mexY* from *P. aeruginosa*, given that the MexXY/OprM efflux system has been shown to extrude aminoglycosides, cefepime, tetracyclines, fluoroquinolones, macrolides, and chloramphenicol (12–15). The MexY RND transporter from *P. aeruginosa* interacts with the periplasmic protein MexX and the outer membrane channel OprM that is encoded by the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon. The expression of *mexXY* is complex and governed by several regulatory mechanisms. One of them is negative regulation by the product of the *mexZ* gene located upstream from *mexX* (12, 16). By using the BLAST program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), we detected 3 putative genes in the AXX-A genome (contig 71, GenBank accession number AFRQ01000061.1), designated *axyZ*, *axyX*, and *axyY*, sharing 67, 67, and 77% nucleotide similarity with *mexZ*, *mexX*, and *mexY*, respectively. Downstream from *axyY*, we found another open reading frame (ORF), *oprZ*, encoding a probable outer membrane protein. The aim of our study was to evaluate the involvement of this putative RND-type efflux pump in the multidrug resistance of *A. xylosoxidans*.

In this work, we studied three clinical isolates of *A. xylosoxidans*: AXX-A, AXX-D, and AXX-H. The strains were identified by using the API20NE system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and by sequencing of the *rrs* gene. Susceptibility testing was performed by Etest (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) and interpreted according to the breakpoints defined by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing ([http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)). AXX-A harbors a wild-type antibiotic resistance phenotype, AXX-D an acquired resistance to ceftazidime and fluoroquinolones, and AXX-H an acquired resistance to ceftazidime, fluoroquinolones, and carbapenems (Table 1). In these strains, we have inactivated *axyY*, encoding the transporter component. For this purpose, the primers INA-axyY-F and INA-axyY-R (Table 2) were designed to amplify a 755-bp region of *axyY* (nucleotide positions from 1696 to 2450). The PCR product was cloned into the pUC19 vector by using the In-Fusion HD cloning kit (Clontech Laboratories, Mountain View, CA) as recommended by the manufacturer. Newly constructed plasmids (pINA-axyY-AXX-A, pINA-axyY-AXX-D, and pINA-axyY-AXX-H) were used as suicide vectors. They were introduced into each strain by electroporation. Recombinant clones (*axyY::Tic*) named AXX-A- $\Delta$ Y, AXX-D- $\Delta$ Y, and AXX-H- $\Delta$ Y were selected on Mueller-Hinton agar plates containing 50  $\mu$ g/ml of ticarcillin. The disruption of *axyY* in each strain was confirmed by PCR and DNA sequencing (primer pairs V-INA-axyY-F/M14R and M14F/V-INA-axyY-R).

The *axyY* inactivation led to decreased MICs of aminoglycosides, carbapenems, cefepime, some fluoroquinolones, tetracyclines, erythromycin, and to a lesser extent, ceftazidime (Table 1). The activities of all aminoglycosides tested were substantially enhanced. Susceptibility to tobramycin, amikacin, netilmicin, and gentamicin was restored for all strains. The activities of carbapenems were slightly enhanced in the mutants AXX-A- $\Delta$ Y and AXX-D- $\Delta$ Y compared with their activities in the original strains,

Received 15 June 2012 Returned for modification 30 July 2012

Accepted 16 October 2012

Published ahead of print 22 October 2012

Address correspondence to Catherine Neuwirth, [catherine.neuwirth@chu-dijon.fr](mailto:catherine.neuwirth@chu-dijon.fr).

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.01243-12

TABLE 1 MICs of 22 antibiotics for clinical strains and *axyY::Tic* mutants

Antibiotic	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ ) for strain <sup>a</sup> :					
	AXX-A	AXX-A- $\Delta Y$	AXX-D	AXX-D- $\Delta Y$	AXX-H	AXX-H- $\Delta Y$
Ticarcillin <sup>b</sup>	0.25	>256	0.25	>256	0.25	>256
Tobramycin	16	1.5 (10)	24	0.5 (48)	32	1 (32)
Amikacin	256	2 (128)	96	0.25 (384)	>256	3 (>85)
Netilmicin	32	2 (16)	64	0.75 (85)	192	1 (192)
Gentamicin	48	1 (48)	12	0.094 (127)	48	0.75 (64)
Kanamycin	32	2 (16)	>256	3 (>85)	>256	12 (>21)
Ceftazidime	4	2 (2)	48	24 (2)	48	24 (2)
Cefepime	16	8 (2)	>256	24 (>10)	>256	>256
Imipenem	1	0.5 (2)	1.5	1 (1.5)	4	1 (4)
Meropenem	0.094	0.047 (2)	0.064	0.032 (2)	12	2 (6)
Doripenem	0.19	0.047 (4)	0.25	0.19 (1.3)	16	1.5 (10)
Tetracycline	48	12 (4)	>256	32 (>8)	>256	>256
Doxycycline	8	3 (2.7)	48	12 (4)	128	24 (5)
Tigecycline	4	0.75 (5.3)	8	1 (8)	6	2 (3)
Nalidixic Acid	24	12 (2)	>256	>256	>256	>256
Norfloxacin	8	4 (2)	>256	24 (>10)	>256	128 (>2)
Ofloxacin	2	1.5 (1.3)	>32	24 (>1.3)	>32	>32
Levofloxacin	0.75	0.75 (1)	16	4 (4)	>32	8 (>4)
Moxifloxacin	1.5	1 (1.5)	>32	2 (>16)	>32	24 (>1.3)
Ciprofloxacin	0.75	0.5 (1.5)	>32	3 (>10)	>32	8 (>4)
Chloramphenicol	12	8 (1.5)	>256	>256	>256	192 (>1.3)
Erythromycin	64	16 (4)	>256	6 (>42)	>256	>256

<sup>a</sup> Values in parentheses represent the relative MIC decreases (ratio of the MIC for the parent strain to the MIC for the mutant strain).

<sup>b</sup> The ticarcillin resistance observed in the mutants is caused by the production of the penicillinase encoded by the *bla* gene from the pUC19 vector.

AXX-A and AXX-D. Interestingly, the MICs of meropenem and doripenem were decreased 6-fold and 10-fold, respectively, after *axyY* disruption in the carbapenem-resistant strain AXX-H. This suggests that AxyXY-OprZ might lead to acquired resistance to carbapenems. Nevertheless, the MIC values of meropenem and doripenem for AXX-H- $\Delta Y$ , 2 and 1.5  $\mu\text{g/ml}$ , respectively, were still more elevated than those for AXX-A and AXX-D. It is likely that other mechanisms are involved in the residual carbapenem resistance of AXX-H- $\Delta Y$ . Concerning the cephalosporins, we observed that *axyY* inactivation resulted in a 2-fold decrease of the ceftazidime MIC, whatever the resistance level in parent strains. The activity of cefepime was partially restored in AXX-D- $\Delta Y$  but not in AXX-H- $\Delta Y$ , suggesting the association of various mechanisms of resistance. Finally, AxyXY-OprZ can also extrude tetracyclines, some fluoroquinolones, and erythromycin, which are also substrates of MexXY/OprM. The restoration of the original drug resistance phenotypes was observed in

spontaneous revertants obtained by culturing mutant strains without ticarcillin.

AxyXY-OprZ from *A. xylosoxidans* and MexXY/OprM from *P. aeruginosa* have common substrates. This is consistent with the high amino acid sequence similarity observed between the transporters AxyY and MexY (73%), the transporter component being responsible for substrate recognition of the RND-type efflux systems (17). Nevertheless, AxyXY-OprZ confers a much higher level of resistance to aminoglycosides than MexXY-OprM in wild strains. It has recently been reported for some aminoglycoside-resistant strains of *P. aeruginosa* that *mexX* and *mexY* are linked to the *oprA* gene in the same operon and that MexXY can utilize either OprM or OprA to form drug efflux complexes (18). Such an operon, including an *oprA* gene, has been also described in *Burkholderia pseudomallei*, a species intrinsically highly resistant to aminoglycosides due to expression of the AmrAB-OprA efflux pump (19). The *oprZ* gene that we detected in the three strains studied (primers oprZ-F and oprZ-R) seems to be a homologue of the *oprA* genes from *P. aeruginosa* and *B. pseudomallei* (71% nucleotide identity and 57% amino acid identity). We plan to assess the contribution of OprZ to the high level of resistance to aminoglycosides.

In conclusion, we have demonstrated that AxyXY-OprZ confers on *A. xylosoxidans* a broad spectrum of antimicrobial agent resistance. The most interesting finding is that AxyXY-OprZ confers on *A. xylosoxidans* its intrinsic high level of resistance to aminoglycosides. Our results suggest the involvement of AxyXY-OprZ in acquired resistance to carbapenems and fluoroquinolones that are major antimicrobial components for the treatment of pulmonary infections in CF patients. This will be supported by further studies that will include more clinical isolates.

TABLE 2 Primers used in the study

Primer	Nucleotide sequence (5'–3')
INA-axyY-F	<u>CGGTACCCGGGGATCCAGGGCAGCTTCATGGCCAT</u> <sup>a</sup>
INA-axyY-R	<u>CGACTCTAGAGGATCGGGAAGCCGTTGTAGCGGTT</u> <sup>a</sup>
V-INA-axyY-F	CGCTGACCACGCGCTATA
M14F <sup>b</sup>	CCAGGGTTTTCCAGTCACGA
M14R <sup>b</sup>	GCGGATAACAATTTACACACAGGA
V-INA-axyY-R	CGGACAGCCGCTCTTCGTA
oprZ-F	CACGCTCAAGCTGACCCA
oprZ-R	CCTCCAGCATCTCCAGGT

<sup>a</sup> Underlined sequences comprise 15 bases of homology with the ends of the linearized vector pUC19.

<sup>b</sup> M14F and M14R are primers designed in suicide plasmids.

## ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge the contribution of Gael Belliot for revising the manuscript.

## REFERENCES

1. Aisenberg G, Rolston KV, Safdar A. 2004. Bacteremia caused by *Achromobacter* and *Alcaligenes* species in 46 patients with cancer (1989-2003). *Cancer* 101:2134–2140.
2. Tena D, Gonzalez-Praetorius A, Perez-Balsalobre M, Sancho O, Bisquert J. 2008. Urinary tract infection due to *Achromobacter xylosoxidans*: report of 9 cases. *Scand. J. Infect. Dis.* 40:84–87.
3. De Baets F, Schelstraete P, Van Daele S, Haerynck F, Vanechoutte M. 2007. *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance. *J. Cyst. Fibros.* 6:75–78.
4. Razvi S, Quittell L, Sewall A, Quinton H, Marshall B, Saiman L. 2009. Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995 to 2005. *Chest* 136:1554–1560.
5. Ridderberg W, Bendstrup KE, Olesen HV, Jensen-Fangel S, Nørskov-Lauritsen N. 2011. Marked increase in incidence of *Achromobacter xylosoxidans* infections caused by sporadic acquisition from the environment. *J. Cyst. Fibros.* 10:466–469.
6. Hansen CR, Pressler T, Nielsen KG, Jensen PO, Bjarnsholt T, Hoiby N. 2010. Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* 9:51–58.
7. Mantovani RP, Levy CE, Yano T. 2012. A heat-stable cytotoxic factor produced by *Achromobacter xylosoxidans* isolated from Brazilian patients with CF is associated with in vitro increased proinflammatory cytokines. *J. Cyst. Fibros.* 11:305–311.
8. Almuzara M, Limansky A, Ballerini V, Galanternik L, Famiglietti A, Vay C. 2010. In vitro susceptibility of *Achromobacter* spp. isolates: comparison of disk diffusion, Etest and agar dilution methods. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35:68–71.
9. Glupczynski Y, Hansen W, Freney J, Yourassowsky E. 1988. In vitro susceptibility of *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxidans* to 24 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:276–278.
10. Saiman L, Chen Y, Tabibi S, San Gabriel P, Zhou J, Liu Z, Lai L, Whittier S. 2001. Identification and antimicrobial susceptibility of *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 39:3942–3945.
11. Bador J, Amoureux L, Duez JM, Drabowicz A, Siebor E, Llanes C, Neuwirth C. 2011. First description of an RND-type multidrug efflux pump in *Achromobacter xylosoxidans*, AxyABM. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:4912–4914.
12. Aires JR, Kohler T, Nikaïdo H, Plesiat P. 1999. Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:2624–2628.
13. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. 2000. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:3322–3327.
14. Mine T, Morita Y, Kataoka A, Mizushima T, Tsuchiya T. 1999. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:415–417.
15. Muller C, Plesiat P, Jeannot K. 2011. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and beta-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:1211–1221.
16. Matsuo Y, Eda S, Gotoh N, Yoshihara E, Nakae T. 2004. MexZ-mediated regulation of mexXY multidrug efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa* by binding on the mexZ-mexX intergenic DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 238:23–28.
17. Mao W, Warren MS, Black DS, Satou T, Murata T, Nishino T, Gotoh N, 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.* 46:889–901.
18. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. 2012. Primary mechanisms mediating aminoglycoside resistance in the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate PA7. *Microbiology* 158:1071–1083.
19. Moore RA, DeShazer D, Reckseidler S, Weissman A, Woods DE. 1999. Efflux-mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:465–470.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

---



**Aendekerck, S., Ghysels, B., Cornelis, P., and Baysse, C.** (2002). Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology* 148, 2371–2381.

**Aeschlimann, J.R., Kaatz, G.W., and Rybak, M.J.** (1999). The effects of NorA inhibition on the activities of levofloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin against two genetically related strains of *Staphylococcus aureus* in an *in-vitro* infection model. *J. Antimicrob. Chemother.* 44, 343–349.

**Aires, J.R., and Nikaido, H.** (2005). Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187, 1923–1929.

**Aires, J.R., Köhler, T., Nikaido, H., and Plésiat, P.** (1999). Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2624–2628.

**Aisenberg, G., Rolston, K.V., and Safdar, A.** (2004). Bacteremia caused by *Achromobacter* and *Alcaligenes* species in 46 patients with cancer (1989-2003). *Cancer* 101, 2134–2140.

**Akama, H., Matsuura, T., Kashiwagi, S., Yoneyama, H., Narita, S.-I., Tsukihara, T., Nakagawa, A., and Nakae, T.** (2004). Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 279, 25939–25942.

**Almuzara, M., Limansky, A., Ballerini, V., Galanternik, L., Famiglietti, A., and Vay, C.** (2010). *In vitro* susceptibility of *Achromobacter* spp. isolates: comparison of disk diffusion, Etest and agar dilution methods. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 68–71.

**Alonso, A., and Martínez, J.L.** (2001). Expression of multidrug efflux pump SmeDEF by clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1879–1881.

**Alonso, A., and Martínez, J.L.** (2000). Cloning and characterization of SmeDEF, a novel multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 3079–3086.

**Alvarez-Ortega, C., Olivares, J., and Martínez, J.L.** (2013). RND multidrug efflux pumps: what are they good for? *Front. Microbiol.* 4, 7.

**Amoureux, L., Bador, J., Siebor, E., Taillefumier, N., Fanton, A., and Neuwirth, C.** (2013). Epidemiology and resistance of *Achromobacter xylosoxidans* from cystic fibrosis patients in Dijon, Burgundy: first french data. *J. Cyst. Fibros.* 12, 170–176.

**Angelis (De), F., Lee, J.K., O’Connell, J.D., 3rd, Miercke, L.J.W., Verschueren, K.H., Srinivasan, V., Bauvois, C., Govaerts, C., Robbins, R.A., Ruyschaert, J.-M., et al.** (2010). Metal-induced conformational changes in ZneB suggest an active role of membrane fusion proteins in efflux resistance systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 11038–11043.

**Askoura, M., Mottawea, W., Abujamel, T., and Taher, I.** (2011). Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan J. Med.* 6.

**Atalay, S., Ece, G., Samlioglu, P., Kose, S., Maras, G., and Gonullu, M.** (2012). Clinical and microbiological evaluation of eight patients with isolated *Achromobacter xylosoxidans*. *Scand. J. Infect. Dis.* 44, 798–801.

**Bador, J., Amoureux, L., Duez, J.-M., Drabowicz, A., Siebor, E., Llanes, C., and Neuwirth, C.** (2011). First description of an RND-type multidrug efflux pump in *Achromobacter xylosoxidans*, AxyABM. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 4912–4914.

- Bador, J., Amoureux, L., Blanc, E., and Neuwirth, C.** (2013). Innate aminoglycoside resistance of *Achromobacter xylosoxidans* is due to AxyXY-OprZ, an RND-type multidrug efflux pump. *Antimicrob. Agents Chemother.* *57*, 603–605.
- Baets (De), F., Schelstraete, P., Van Daele, S., Haerynck, F., and Vaneechoutte, M.** (2007). *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance. *J. Cyst. Fibros.* *6*, 75–78.
- Bagai, I., Liu, W., Rensing, C., Blackburn, N.J., and McEvoy, M.M.** (2007). Substrate-linked conformational change in the periplasmic component of a Cu(I)/Ag(I) efflux system. *J. Biol. Chem.* *282*, 35695–35702.
- Bailey, A.M., Paulsen, I.T., and Piddock, L.J.V.** (2008). RamA confers multidrug resistance in *Salmonella enterica* via increased expression of *acrB*, which is inhibited by chlorpromazine. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 3604–3611.
- Bay, D.C., Rommens, K.L., and Turner, R.J.** (2008). Small multidrug resistance proteins: a multidrug transporter family that continues to grow. *Biochim. Biophys. Acta* *1778*, 1814–1838.
- Bazzini, S., Udine, C., Sass, A., Pasca, M.R., Longo, F., Emiliani, G., Fondi, M., Perrin, E., Decorosi, F., Viti, C., et al.** (2011). Deciphering the role of RND efflux transporters in *Burkholderia cenocepacia*. *PLoS One* *6*, e18902.
- Bentzmann (de), S., Giraud, C., Bernard, C.S., Calderon, V., Ewald, F., Plesiat, P., Nguyen, C., Grunwald, D., Attree, I., Jeannot, K., et al.** (2012). Unique biofilm signature, drug susceptibility and decreased virulence in *Drosophila* through the *Pseudomonas aeruginosa* two-component system PprAB. *PLoS Pathog* *8*, e1003052.
- Biot, F.V., Valade, E., Garnotel, E., Chevalier, J., Villard, C., Thibault, F.M., Vidal, D.R., and Pages, J.-M.** (2011). Involvement of the efflux pumps in chloramphenicol selected strains of *Burkholderia thailandensis*: proteomic and mechanistic evidence. *PLoS One* *6*, e16892.
- Bissonnette, L., Champetier, S., Buisson, J.P., and Roy, P.H.** (1991). Characterization of the nonenzymatic chloramphenicol resistance (*cmlA*) gene of the In4 integron of Tn1696: similarity of the product to transmembrane transport proteins. *J. Bacteriol.* *173*, 4493–4502.
- Bizet, C., Mensah, K., and Philippon, A.** (1989). Sensibilité de *Alcaligenes faecalis* vis-à-vis de 31 antibiotiques. Comparaison avec celle de *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxidans*. *Méd. Mal. Inf.* *20*, 148–152.
- Bohnert, J.A., Karamian, B., and Nikaido, H.** (2010). Optimized Nile Red efflux assay of AcrAB-TolC multidrug efflux system shows competition between substrates. *Antimicrob. Agents Chemother.* *54*, 3770–3775.
- Borges-Walmsley, M.I., McKeegan, K.S., and Walmsley, A.R.** (2003). Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. *Biochem. J.* *376*, 313–338.
- Brenwald, N.P., Gill, M.J., and Wise, R.** (1997). The effect of reserpine, an inhibitor of multi-drug efflux pumps, on the *in-vitro* susceptibilities of fluoroquinolone-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae* to norfloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* *40*, 458–460.
- Brickman, T.J., and Armstrong, S.K.** (2005). *Bordetella* AlcS transporter functions in alcaligin siderophore export and is central to inducer sensing in positive regulation of alcaligin system gene expression. *J. Bacteriol.* *187*, 3650–3661.



- Brooke, J.S.** (2012). *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 25, 2–41.
- Brown, D.G., Swanson, J.K., and Allen, C.** (2007). Two host-induced *Ralstonia solanacearum* genes, *acrA* and *dinF*, encode multidrug efflux pumps and contribute to bacterial wilt virulence. Appl. Environ. Microbiol. 73, 2777–2786.
- Brown, M.H., Paulsen, I.T., and Skurray, R.A.** (1999). The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. Mol. Microbiol. 31, 394–395.
- Buckova, M., Godocikova, J., Zamocky, M., and Polek, B.** (2010). Screening of bacterial isolates from polluted soils exhibiting catalase and peroxidase activity and diversity of their responses to oxidative stress. Curr. Microbiol. 61, 241–247.
- Burger, H., Loos, W.J., Eechoute, K., Verweij, J., Mathijssen, R.H.J., and Wiemer, E.A.C.** (2011). Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance. Drug Resist. Updat. 14, 22–34.
- Buroni, S., Pasca, M.R., Flannagan, R.S., Bazzini, S., Milano, A., Bertani, I., Venturi, V., Valvano, M.A., and Riccardi, G.** (2009). Assessment of three Resistance-Nodulation-cell Division drug efflux transporters of *Burkholderia cenocepacia* in intrinsic antibiotic resistance. BMC Microbiol. 9, 200.
- Butaye, P., Cloeckert, A., and Schwarz, S.** (2003). Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. Int. J. Antimicrob. Agents 22, 205–210.
- Cattoir, V.** (2004). Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria. Pathol. Biol. 52, 607–616.
- Chan, Y.Y., Tan, T.M.C., Ong, Y.M., and Chua, K.L.** (2004). BpeAB-OprB, a multidrug efflux pump in *Burkholderia pseudomallei*. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 1128–1135.
- Chan, Y.Y., Ong, Y.M., and Chua, K.L.** (2007). Synergistic interaction between phenothiazines and antimicrobial agents against *Burkholderia pseudomallei*. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 623–630.
- Chen, C.-H., Huang, C.-C., Chung, T.-C., Hu, R.-M., Huang, Y.-W., and Yang, T.-C.** (2011). Contribution of resistance-nodulation-division efflux pump operon *smeU1-V-W-U2-X* to multidrug resistance of *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 5826–5833.
- Chen, H., Hu, J., Chen, P.R., Lan, L., Li, Z., Hicks, L.M., Dinner, A.R., and He, C.** (2008). The *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux regulator MexR uses an oxidation-sensing mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105, 13586–13591.
- Cheron, M., Abachin, E., Guerot, E., el-Bez, M., and Simonet, M.** (1994). Investigation of hospital-acquired infections due to *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxydans* by DNA restriction fragment length polymorphism. J. Clin. Microbiol. 32, 1023–1026.
- Chevalier, J., Bredin, J., Mahamoud, A., Malléa, M., Barbe, J., and Pagès, J.-M.** (2004). Inhibitors of antibiotic efflux in resistant *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* strains. Antimicrob. Agents Chemother. 48, 1043–1046.
- Chuanchuen, R., Narasaki, C.T., and Schweizer, H.P.** (2002). The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. J. Bacteriol. 184, 5036–5044.

- Chuanchuen, R., Murata, T., Gotoh, N., and Schweizer, H.P.** (2005). substrate-dependent utilization of OprM or OpmH by the *Pseudomonas aeruginosa* MexJK efflux pump. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 2133–2136.
- Coenye, T., Vancanneyt, M., Cnockaert, M.C., Falsen, E., Swings, J., and Vandamme, P.** (2003). *Kerstersia gyiorum* gen. nov., sp. nov., a novel *Alcaligenes faecalis*-like organism isolated from human clinical samples, and reclassification of *Alcaligenes denitrificans* Rüger and Tan 1983 as *Achromobacter denitrificans* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *53*, 1825–1831.
- Conway, S.P., Brownlee, K.G., Denton, M., and Peckham, D.G.** (2003). Antibiotic treatment of multidrug-resistant organisms in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Med.* *2*, 321–332.
- Coutinho, C.P., de Carvalho, C.C.C.R., Madeira, A., Pinto-de-Oliveira, A., and Sa-Correia, I.** (2011). *Burkholderia cenocepacia* phenotypic clonal variation during a 3.5-year colonization in the lungs of a cystic fibrosis patient. *Infect. Immun.* *79*, 2950–2960.
- Crossman, L.C., Gould, V.C., Dow, J.M., Vernikos, G.S., Okazaki, A., Sebahia, M., Saunders, D., Arrowsmith, C., Carver, T., Peters, N., et al.** (2008). The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol.* *9*, R74.
- Currie, B.J., Ward, L., and Cheng, A.C.** (2010). The epidemiology and clinical spectrum of melioidosis: 540 cases from the 20 year darwin prospective study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* *4*, e900.
- Dairi, T., Aisaka, K., Katsumata, R., and Hasegawa, M.** (1995). A self-defense gene homologous to tetracycline effluxing gene essential for antibiotic production in *Streptomyces aureofaciens*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *59*, 1835–1841.
- 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*, 972–978.
- Derber, C., Elam, K., Forbes, B.A., and Bearman, G.** (2011). *Achromobacter* species endocarditis: A case report and literature review. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* *22*, e17–20.
- Dina, J., Malbruny, B., and Leclercq, R.** (2003). Nonsense mutations in the *lsa*-like gene in *Enterococcus faecalis* isolates susceptible to lincosamides and streptogramins A. *Antimicrob. Agents Chemother.* *47*, 2307–2309.
- Doi, Y., and Arakawa, Y.** (2007). 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin. Infect. Dis.* *45*, 88–94.
- Doi, Y., Poirel, L., Paterson, D.L., and Nordmann, P.** (2008). Characterization of a naturally occurring class D beta-lactamase from *Achromobacter xylosoxidans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 1952–1956.
- Duggan, J.M., Goldstein, S.J., Chenoweth, C.E., Kauffman, C.A., and Bradley, S.F.** (1996). *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia: report of four cases and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* *23*, 569–576.
- Dumas, J.L., van Delden, C., Perron, K., and Köhler, T.** (2006). Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* *254*, 217–225.

**Eda, S., Mitsui, H., and Minamisawa, K.** (2011). Involvement of the SmeAB multidrug efflux pump in resistance to plant antimicrobials and contribution to nodulation competitiveness in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* *77*, 2855–2862.

**El'Garch, F., Jeannot, K., Hocquet, D., Llanes-Barakat, C., and Plésiat, P.** (2007). Cumulative effects of several nonenzymatic mechanisms on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 1016–1021.

**Elkins, C.A., and Nikaido, H.** (2002). Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. *J. Bacteriol.* *184*, 6490–6498.

**Emerson, J., McNamara, S., Buccat, A.M., Worrell, K., and Burns, J.L.** (2010). Changes in cystic fibrosis sputum microbiology in the United States between 1995 and 2008. *Pediatr. Pulmonol.* *45*, 363–370.

**Evans, K., and Poole, K.** (1999). The MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa* is growth-phase regulated. *FEMS Microbiol. Lett.* *173*, 35–39.

**Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J., and Poole, K.** (1998). Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *180*, 5443–5447.

**Everett, M.J., Jin, Y.F., Ricci, V., and Piddock, L.J.** (1996). Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob. Agents Chemother.* *40*, 2380–2386.

**Fierro, J.F., Hardisson, C., and Salas, J.A.** (1987). Resistance to oleandomycin in *Streptomyces antibioticus*, the producer organism. *J. Gen. Microbiol.* *133*, 1931–1939.

**Fraud, S., and Poole, K.** (2011). Oxidative stress induction of the *mexXY* multidrug efflux genes and promotion of aminoglycoside resistance development in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 1068–1074.

**Fukumori, F., Hirayama, H., Takami, H., Inoue, A., and Horikoshi, K.** (1998). Isolation and transposon mutagenesis of a *Pseudomonas putida* KT2442 toluene-resistant variant: involvement of an efflux system in solvent resistance. *Extremophiles* *2*, 395–400.

**Gillis, R.J., White, K.G., Choi, K.-H., Wagner, V.E., Schweizer, H.P., and Iglewski, B.H.** (2005). Molecular basis of azithromycin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 3858–3867.

**Glupczynski, Y., Hansen, W., Freney, J., and Yourassowsky, E.** (1988). *In vitro* susceptibility of *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxidans* to 24 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* *32*, 276–278.

**Gómez-Cerezo, J., Suárez, I., Ríos, J.J., Peña, P., García de Miguel, M.J., de José, M., Monteagudo, O., Linares, P., Barbado-Cano, A., and Vázquez, J.J.** (2003). *Achromobacter xylosoxidans* bacteremia: a 10-year analysis of 54 cases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *22*, 360–363.

**Goris, J., De Vos, P., Coenye, T., Hoste, B., Janssens, D., Brim, H., Diels, L., Mergeay, M., Kersters, K., and Vandamme, P.** (2001). Classification of metal-resistant bacteria from industrial biotopes as *Ralstonia campinensis* sp. nov., *Ralstonia metallidurans* sp. nov. and *Ralstonia basilensis* Steinle *et al.* 1998 emend. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *51*, 1773–1782.

- Gotoh, N., Tsujimoto, H., Tsuda, M., Okamoto, K., Nomura, A., Wada, T., Nakahashi, M., and Nishino, T.** (1998). Characterization of the MexC-MexD-OprJ multidrug efflux system in  $\Delta mexA\text{-}mexB\text{-}oprM$  mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *42*, 1938–1943.
- Gottesman, M.M., Pastan, I., and Ambudkar, S.V.** (1996). P-glycoprotein and multidrug resistance. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *6*, 610–617.
- Grass, G., Fan, B., Rosen, B.P., Lemke, K., Schlegel, H.G., and Rensing, C.** (2001). NreB from *Achromobacter xylosoxidans* 31A is a nickel-induced transporter conferring nickel resistance. *J. Bacteriol.* *183*, 2803–2807.
- Grkovic, S., Brown, M.H., and Skurray, R.A.** (2002). Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *66*, 671–701.
- Guazzaroni, M.-E., Teran, W., Zhang, X., Gallegos, M.-T., and Ramos, J.L.** (2004). TtgV bound to a complex operator site represses transcription of the promoter for the multidrug and solvent extrusion TtgGHI Pump. *J. Bacteriol.* *186*, 2921–2927.
- Guénard, S., Muller, C., Monlezun, L., Benas, P., Broutin, I., Jeannot, K., and Plésiat, P.** (2013). Multiple mutations lead to MexXY/OprM-dependant aminoglycoside resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* Oct 21 [Epub ahead of print].
- Gugliera, P., Pasca, M.R., De Rossi, E., Buroni, S., Arrigo, P., Manina, G., and Riccardi, G.** (2006). Efflux pump genes of the resistance-nodulation-division family in *Burkholderia cenocepacia* genome. *BMC Microbiol.* *6*, 66.
- Hansen, C.R., Pressler, T., Nielsen, K.G., Jensen, P.Ø., Bjarnsholt, T., and Høiby, N.** (2010). Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* *9*, 51–58.
- Hansen, L.H., Johannesen, E., Burmølle, M., Sørensen, A.H., and Sørensen, S.J.** (2004). Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 3332–3337.
- Hassan, M.T., van der Lelie, D., Springael, D., Römling, U., Ahmed, N., and Mergeay, M.** (1999). Identification of a gene cluster, *czr*, involved in cadmium and zinc resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Gene* *238*, 417–425.
- He, G.X., Kuroda, T., Mima, T., Morita, Y., Mizushima, T., and Tsuchiya, T.** (2004). An H<sup>+</sup>-coupled multidrug efflux pump, PmpM, a member of the MATE family of transporters, from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *186*, 262–265.
- Hearn, E.M., Dennis, J.J., Gray, M.R., and Foght, J.M.** (2003). Identification and characterization of the emhABC efflux system for polycyclic aromatic hydrocarbons in *Pseudomonas fluorescens* cLP6a. *J. Bacteriol.* *185*, 6233–6240.
- Hearn, E.M., Gray, M.R., and Foght, J.M.** (2006). Mutations in the central cavity and periplasmic domain affect efflux activity of the Resistance-Nodulation-Division pump EmhB from *Pseudomonas fluorescens* cLP6a. *J. Bacteriol.* *188*, 115–123.
- Helling, R.B., Janes, B.K., Kimball, H., Tran, T., Bundesmann, M., Check, P., Phelan, D., and Miller, C.** (2002). Toxic waste disposal in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *184*, 3699–3703.
- 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*, 9994–9999.

- Ho, Y.N., Mathew, D.C., Hsiao, S.C., Shih, C.H., Chien, M.F., Chiang, H.M., and Huang, C.C.** (2012). Selection and application of endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain F3B for improving phytoremediation of phenolic pollutants. *J. Hazard. Mater.* *219-220*, 43-49.
- 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*, 1371–1375.
- Hocquet, D., Nordmann, P., El Garch, F., Cabanne, L., and Plesiat, P.** (2006). Involvement of the MexXY-OprM efflux system in emergence of cefepime resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 1347–1351.
- Hocquet, D., Roussel-Delvallez, M., Cavallo, J.D., and 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*, 1582-1583.
- Hocquet, D., Muller, A., Blanc, K., Plésiat, P., Talon, D., Monnet, D.L., and Bertrand, X.** (2008). Relationship between antibiotic use and incidence of MexXY/OprM overproducers among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 1173-1175.
- Hogardt, M., Ulrich, J., Riehn-Kopp, H., and Tümmler, B.** (2009). EuroCareCF quality assessment of diagnostic microbiology of cystic fibrosis isolates. *J. Clin. Microbiol.* *47*, 3435–3438.
- Holmes, B., Snell, J.J., and Lapage, S.P.** (1977). Strains of *Achromobacter xylosoxidans* from clinical material. *J. Clin. Pathol.* *30*, 595–601.
- Igra-Siegman, Y., Chmel, H., and Cobbs, C.** (1980). Clinical and laboratory characteristics of *Achromobacter xylosoxidans* infection. *J. Clin. Microbiol.* *11*, 141–145.
- Iyobe, S., Kusadokoro, H., Takahashi, A., Yomoda, S., Okubo, T., Nakamura, A., and O'Hara, K.** (2002). Detection of a variant metallo-beta-lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 2014–2016.
- Jeannot, K., Sobel, M.L., El Garch, F., Poole, K., and Plésiat, P.** (2005). Induction of the MexXY efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on drug-ribosome interaction. *J. Bacteriol.* *187*, 5341–5346.
- Jeannot, K., Elsen, S., Köhler, T., Attree, I., van Delden, C., and Plésiat, P.** (2008). Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. *Antimicrob. Agents Chemother.* *52*, 2455-2462.
- Jencova, V., Strnad, H., Chodora, Z., Ulbrich, P., Vlcek, C., Hickey, W.J., and Paces, V.** (2008). Nucleotide sequence, organization and characterization of the (halo)aromatic acid catabolic plasmid pA81 from *Achromobacter xylosoxidans* A8. *Res. Microbiol.* *159*, 118-127.
- Jude, F., Arpin, C., Brachet-Castang, C., Capdepuy, M., Caumette, P., and Quentin, C.** (2004). TbtABM, a multidrug efflux pump associated with tributyltin resistance in *Pseudomonas stutzeri*. *FEMS Microbiol. Lett.* *232*, 7–14.
- Kaatz, G.W., McAleese, F., and Seo, S.M.** (2005). Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* *49*, 1857–1864.



- Kadlec, K., Kehrenberg, C., and Schwarz, S.** (2007). Efflux-mediated resistance to florfenicol and/or chloramphenicol in *Bordetella bronchiseptica*: identification of a novel chloramphenicol exporter. *J. Antimicrob. Chemother.* *59*, 191–196.
- Kang, H., and Gross, D.C.** (2005). Characterization of a resistance-nodulation-cell division transporter system associated with the *syr-syp* genomic island of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 5056–5065.
- Kaniga, K., Delor, I., and Cornelis, G.R.** (1991). A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* *109*, 137–141.
- Kidd, T.J., Ramsay, K.A., Hu, H., Bye, P.T.P., Elkins, M.R., Grimwood, K., Harbour, C., Marks, G.B., Nissen, M.D., Robinson, P.J., et al.** (2009). Low rates of *Pseudomonas aeruginosa* misidentification in isolates from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* *47*, 1503–1509.
- Kieboom, J., and de Bont, J.** (2001). Identification and molecular characterization of an efflux system involved in *Pseudomonas putida* S12 multidrug resistance. *Microbiology* *147*, 43–51.
- Kieboom, J., Dennis, J.J., de Bont, J.A., and Zylstra, G.J.** (1998). Identification and molecular characterization of an efflux pump involved in *Pseudomonas putida* S12 solvent tolerance. *J. Biol. Chem.* *273*, 85–91.
- Kieser, T.** (1984). Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* *12*, 19–36.
- Kim, H.-S., Nagore, D., and Nikaido, H.** (2010). Multidrug efflux pump MdtBC of *Escherichia coli* is active only as a B2C heterotrimer. *J. Bacteriol.* *192*, 1377–1386.
- Kim, J., Kim, J.-G., Kang, Y., Jang, J.Y., Jog, G.J., Lim, J.Y., Kim, S., Suga, H., Nagamatsu, T., and Hwang, I.** (2004). Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*. *Mol. Microbiol.* *54*, 921–934.
- Kindrachuk, K.N., Fernández, L., Bains, M., and Hancock, R.E.W.** (2011). Involvement of an ATP-dependent protease, PA0779/AsrA, in inducing heat shock in response to tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 1874–1882.
- Kobayashi, N., Nishino, K., and Yamaguchi, A.** (2001). Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *183*, 5639–5644.
- Köhler, T., Kok, M., Michea-Hamzhepour, M., Plesiat, P., Gotoh, N., Nishino, T., Curty, L.K., and Pechere, J.C.** (1996). Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *40*, 2288–2290.
- Köhler, T., Michéa-Hamzhepour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L.K., and Pechère, J.C.** (1997). Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* *23*, 345–354.
- Köhler, T., Epp, S.F., Curty, L.K., and Pechère, J.C.** (1999). Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* *181*, 6300–6305.
- Krishnamoorthy, G., Tikhonova, E.B., and Zgurskaya, H.I.** (2008). Fitting periplasmic membrane fusion proteins to inner membrane transporters: mutations that enable *Escherichia coli* AcrA to function with *Pseudomonas aeruginosa* MexB. *J. Bacteriol.* *190*, 691–698.

- Krulwich, T.A., Lewinson, O., Padan, E., and Bibi, E.** (2005). Do physiological roles foster persistence of drug/multidrug-efflux transporters? A case study. *Nat. Rev. Microbiol.* *3*, 566–572.
- Kumar, A., Chua, K.-L., and Schweizer, H.P.** (2006). Method for regulated expression of single-copy efflux pump genes in a surrogate *Pseudomonas aeruginosa* strain: identification of the BpeEF-OprC chloramphenicol and trimethoprim efflux pump of *Burkholderia pseudomallei* 1026b. *Antimicrob. Agents Chemother.* *50*, 3460–3463.
- Lambert, T., Ploy, M.-C., Denis, F., and Courvalin, P.** (1999). Characterization of the chromosomal *aac(6)-Iz* gene of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *43*, 2366–2371.
- Lambiase, A., Catania, M.R., Del Pezzo, M., Rossano, F., Terlizzi, V., Sepe, A., and Raia, V.** (2011). *Achromobacter xylosoxidans* respiratory tract infection in cystic fibrosis patients. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *30*, 973–980.
- Lambiase, A., Raia, V., Pezzo, M.D., Sepe, A., Carnovale, V., and Rossano, F.** (2006). Microbiology of airway disease in a cohort of patients with Cystic Fibrosis. *BMC Infect. Dis.* *6*, 4.
- Lee, A., Mao, W., Warren, M.S., Mistry, A., Hoshino, K., Okumura, R., Ishida, H., and Lomovskaya, O.** (2000). Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance. *J. Bacteriol.* *182*, 3142–3150.
- Levesque, R., and Roy, P.H.** (1982). Mapping of the plasmid (pLQ3) from *Achromobacter* and cloning of its cephalosporinase gene in *Escherichia coli*. *Gene* *18*, 69–75.
- Li, X.-Z., and Nikaido, H.** (2004). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* *64*, 159–204.
- Li, X.-Z., and Nikaido, H.** (2009). Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* *69*, 1555–1623.
- Li, X.Z., Nikaido, H., and Poole, K.** (1995). Role of MexA-MexB-OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *39*, 1948–1953.
- Li, X.Z., Barré, 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*, 885–893.
- Li, X.-Z., Zhang, L., Srikumar, R., and Poole, K.** (1998). Beta-lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *42*, 399–403.
- Li, X.-Z., Zhang, L., and Poole, K.** (2002). SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 333–343.
- Li, X.-Z., Poole, K., and Nikaido, H.** (2003a). Contributions of MexAB-OprM and an EmrE homolog to intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides and dyes. *Antimicrob. Agents Chemother.* *47*, 27–33.
- Li, Y., Mima, T., Komori, Y., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T.** (2003b). A new member of the tripartite multidrug efflux pumps, MexVW-OprM, in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* *52*, 572–575.
- Liesegang, H., Lemke, K., Siddiqui, R.A., and Schlegel, H.G.** (1993). Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol.* *175*, 767–778.

- Lister, P.D., Wolter, D.J., and Hanson, N.D.** (2009). Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 582–610.
- Llanes, C., Hocquet, D., Vogne, C., Benali-Baitich, D., Neuwirth, C., and Plésiat, P.** (2004). Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1797–1802.
- Llanes, C., Köhler, T., Patry, I., Dehecq, B., van Delden, C., and Plésiat, P.** (2011). Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 5676–5684.
- Llanes, C., Pourcel, C., Richardo, C., Plésiat, P., Fichant, G., Cavallo, J.D., and Mérens, A.** (2013). Diversity of  $\beta$ -lactam resistance mechanisms in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa* : a French multicentre study. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1763-1771.
- Lomovskaya, O., Warren, M.S., Lee, A., Galazzo, J., Fronko, R., Lee, M., Blais, J., Cho, D., Chamberland, S., Renau, T., et al.** (2001). Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 105–116.
- Long, F., Su, C.-C., Lei, H.-T., Bolla, J.R., Do, S.V., and Yu, E.W.** (2012). Structure and mechanism of the tripartite CusCBA heavy-metal efflux complex. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 367, 1047–1058.
- Maddocks, S.E., and Oyston, P.C.F.** (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology* 154, 3609–3623.
- Magni, A., Giordano, A., Mancini, C., Pecoraro, C., Varesi, P., Quattrucci, S., and Trancassini, M.** (2007). Emerging cystic fibrosis pathogens: incidence and antimicrobial resistance. *New Microbiol.* 30, 59–62.
- Mahamoud, A., Chevalier, J., Alibert-Franco, S., Kern, W.V., and Pagès, J.-M.** (2007). Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 1223–1229.
- Mantovani, R.P., Levy, C.E., and Yano, T.** (2012). A heat-stable cytotoxic factor produced by *Achromobacter xylosoxidans* isolated from Brazilian patients with CF is associated with *in vitro* increased proinflammatory cytokines. *J. Cyst. Fibros.* 11, 305–311.
- 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, 889–901.
- Maseda, H., Yoneyama, H., and Nakae, T.** (2000). Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 658-664.
- Maseda, H., Sawada, I., Saito, K., Uchiyama, H., Nakae, T., and Nomura, N.** (2004). Enhancement of the *mexAB-oprM* efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the *mexEF-oprN* efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1320-1328.



- Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., and Nishino, T.** (2000). Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *44*, 3322–3327.
- Matsumura, K., Furukawa, S., Ogihara, H., and Morinaga, Y.** (2011). Roles of multidrug efflux pumps on the biofilm formation of *Escherichia coli* K-12. *Biocontrol Sci.* *16*, 69–72.
- Matsuo, Y., Eda, S., Gotoh, N., Yoshihara, E., and Nakae, T.** (2004). MexZ-mediated regulation of MexXY multidrug efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa* by binding on the *mexZ-mexX* intergenic DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* *238*, 23–28.
- McMurry, L., Petrucci, R.E., Jr, and Levy, S.B.** (1980). Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *77*, 3974–3977.
- Mergeay, M., Monchy, S., Vallaey, T., Auquier, V., Benotmane, A., Bertin, P., Taghavi, S., Dunn, J., van der Lelie, D., and Wattiez, R.** (2003). *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS Microbiol. Rev.* *27*, 385–410.
- Mima, T., and Schweizer, H.P.** (2010). The BpeAB-OprB efflux pump of *Burkholderia pseudomallei* 1026b does not play a role in quorum sensing, virulence factor production, or extrusion of aminoglycosides but is a broad-spectrum drug efflux system. *Antimicrob. Agents Chemother.* *54*, 3113–3120.
- Mima, T., Sekiya, H., Mizushima, T., Kuroda, T., and Tsuchiya, T.** (2005). Gene cloning and properties of the RND-type multidrug efflux pumps MexPQ-OpmE and MexMN-OprM from *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.* *49*, 999–1002.
- Mima, T., Joshi, S., Gomez-Escalada, M., and Schweizer, H.P.** (2007). Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins. *J. Bacteriol.* *189*, 7600–7609.
- Mima, T., Kohira, N., Li, Y., Sekiya, H., Ogawa, W., Kuroda, T., and Tsuchiya, T.** (2009). Gene cloning and characteristics of the RND-type multidrug efflux pump MuxABC-OpmB possessing two RND components in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* *155*, 3509–3517.
- Minagawa, S., Inami, H., Kato, T., Sawada, S., Yasuki, T., Miyairi, S., Horikawa, M., Okuda, J., and Gotoh, N.** (2012). RND type efflux pump system MexAB-OprM of *Pseudomonas aeruginosa* selects bacterial languages, 3-oxo-acyl-homoserine lactones, for cell-to-cell communication. *BMC Microbiol.* *12*, 70.
- Mine, T., Morita, Y., Kataoka, A., Mizushima, T., and Tsuchiya, T.** (1999). Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *43*, 415–417.
- Mohanty, P., Patel, A., and Kushwaha Bhardwaj, A.** (2012). Role of H- and D- MATE-type transporters from multidrug resistant clinical isolates of *Vibrio fluvialis* in conferring fluoroquinolone resistance. *PLoS One* *7*, e35752.
- Moissenet, D., Baculard, A., Valcin, M., Marchand, V., Tournier, G., Garbarg-Chenon, A., and Vu-Thien, H.** (1997). Colonization by *Alcaligenes xylosoxidans* in children with cystic fibrosis: a retrospective clinical study conducted by means of molecular epidemiological investigation. *Clin. Infect. Dis.* *24*, 274–275.

- Molina-Cabrillana, J., Santana-Reyes, C., González-García, A., Bordes-Benítez, A., and Horcajada, I.** (2007). Outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* pseudobacteremia in a neonatal care unit related to contaminated chlorhexidine solution. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *26*, 435–437.
- Moore, R.A., DeShazer, D., Reckseidler, S., Weissman, A., and Woods, D.E.** (1999). Efflux-mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *43*, 465–470.
- Morita, Y., Kodama, K., Shiota, S., Mine, T., Kataoka, A., Mizushima, T., and Tsuchiya, T.** (1998). NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *42*, 1778–1782.
- Morita, Y., Kataoka, A., Shiota, S., Mizushima, T., and Tsuchiya, T.** (2000). NorM of *Vibrio parahaemolyticus* is an Na(+)-driven multidrug efflux pump. *J. Bacteriol.* *182*, 6694–6697.
- Morita, Y., Kimura, N., Mima, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T.** (2001). Roles of MexXY- and MexAB-multidrug efflux pumps in intrinsic multidrug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Gen. Appl. Microbiol.* *47*, 27–32.
- Morita, Y., Tomida, J., and Kawamura, Y.** (2012a). MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* *3*.
- Morita, Y., Tomida, J., and Kawamura, Y.** (2012b). Primary mechanisms mediating aminoglycoside resistance in the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate PA7. *Microbiology* *158*, 1071–1083.
- Mosqueda, G., and Ramos, J.-L.** (2000). A set of genes encoding a second toluene efflux system in *Pseudomonas putida* DOT-T1E is linked to the *tod* genes for toluene metabolism. *J. Bacteriol.* *182*, 937–943.
- Moyá, B., Beceiro, A., Cabot, G., Juan, C., Zamorano, L., Alberti, S., and Oliver, A.** (2012). Pan- $\beta$ -lactam resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: molecular mechanisms, penicillin-binding protein profiles, and binding affinities. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 4771–4778.
- Muller, C., Plesiat, P., and Jeannot, K.** (2011). A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and  $\beta$ -lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 1211–1221.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., and Yamaguchi, A.** (2002). Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* *419*, 587–593.
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., Matsumoto, T., and Yamaguchi, A.** (2006). Crystal structures of a multidrug transporter reveal a functionally rotating mechanism. *Nature* *443*, 173–179.
- Murata, T., Gotoh, N., and Nishino, T.** (2002). Characterization of outer membrane efflux proteins OpmE, OpmD and OpmB of *Pseudomonas aeruginosa*: molecular cloning and development of specific antisera. *FEMS Microbiol. Lett.* *217*, 57–63.
- Nagai, K., Murata, T., Ohta, S., Zenda, H., Ohnishi, M., and Hayashi, T.** (2003). Two different mechanisms are involved in the extremely high-level benzalkonium chloride resistance of a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Microbiol. Immunol.* *47*, 709–715.
- Nair, B.M., Cheung, K.-J., Jr, Griffith, A., and Burns, J.L.** (2004). Salicylate induces an antibiotic efflux pump in *Burkholderia cepacia* complex genomovar III (*B. cenocepacia*). *J. Clin. Invest.* *113*, 464–473.

- Neuwirth, C., Siébor, E., Duez, J.M., Péchinot, A., and Kazmierczak, A.** (1995). Imipenem resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* associated with alterations in penicillin-binding proteins. *J. Antimicrob. Chemother.* *36*, 335–342.
- Neuwirth, C., Freby, C., Ogier-Desserrey, A., Perez-Martin, S., Houzel, A., Péchinot, A., Duez, J.-M., Huet, F., and Siebor, E.** (2006). VEB-1 in *Achromobacter xylosoxidans* from cystic fibrosis patient, France. *Emerging Infect. Dis.* *12*, 1737–1739.
- Neuwirth, C., Siebor, E., Robin, F., and Bonnet, R.** (2007). First occurrence of an IMP metallo-beta-lactamase in *Aeromonas caviae*: IMP-19 in an isolate from France. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 4486–4488.
- Newman, P.E., Hider, P., Waring, G.O., 3rd, Hill, E.O., Wilson, L.A., and Harbin, T.S.** (1984). Corneal ulcer due to *Achromobacter xylosoxidans*. *Br. J. Ophthalmol.* *68*, 472–474.
- Neyfakh, A.A.** (1997). Natural functions of bacterial multidrug transporters. *Trends Microbiol.* *5*, 309–313.
- Neyfakh, A.A., Borsch, C.M., and Kaatz, G.W.** (1993). Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrob. Agents Chemother.* *37*, 128–129.
- Nies, D.H.** (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* *27*, 313–339.
- Nies, D., Mergeay, M., Friedrich, B., and Schlegel, H.G.** (1987). Cloning of plasmid genes encoding resistance to cadmium, zinc, and cobalt in *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol.* *169*, 4865–4868.
- Nies, D.H., Nies, A., Chu, L., and Silver, S.** (1989). Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *86*, 7351–7355.
- Nikaido, H.** (2011). Structure and mechanism of RND-type multidrug efflux pumps. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* *77*, 1–60.
- Nikaido, H., and Pagès, J.-M.** (2012). Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* *36*, 340–363.
- Nikaido, H., and Takatsuka, Y.** (2009). Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochim. Biophys. Acta* *1794*, 769–781.
- Nikaido, H., Basina, M., Nguyen, V., and Rosenberg, E.Y.** (1998). Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those beta-lactam antibiotics containing lipophilic side chains. *J. Bacteriol.* *180*, 4686–4692.
- Noguchi, N., Tamura, M., Narui, K., Wakasugi, K., and Sasatsu, M.** (2002). Frequency and genetic characterization of multidrug-resistant mutants of *Staphylococcus aureus* after selection with individual antiseptics and fluoroquinolones. *Biol. Pharm. Bull.* *25*, 1129–1132.
- Oh, J.Y., Shin, Y.J., and Wee, W.R.** (2005). A case of epidemic keratoconjunctivitis complicated by *Alcaligenes xylosoxidans* infection. *Korean J. Ophthalmol.* *19*, 233–234.
- Okamoto, K., Gotoh, N., and Nishino, T.** (2002). Alterations of susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* by overproduction of multidrug efflux systems, MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY/OprM to carbapenems: substrate specificities of the efflux systems. *J. Infect. Chemother.* *8*, 371–373.

- Omote, H., Hiasa, M., Matsumoto, T., Otsuka, M., and Moriyama, Y.** (2006). The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends Pharmacol. Sci.* *27*, 587–593.
- Otsuka, M., Matsumoto, T., Morimoto, R., Arioka, S., Omote, H., and Moriyama, Y.** (2005). A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 17923–17928.
- Ozer, K., Kankaya, Y., Baris, R., Bektas, C.I., and Kocer, U.** (2012). Calcaneal osteomyelitis due to *Achromobacter xylosoxidans*: a case report. *J. Infect. Chemother.* *18*, 915–918.
- Pagès, J.-M., and Amaral, L.** (2009). Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* *1794*, 826–833.
- Pagès, J.M., Monlezun, L., Broutin, I., and Davin-Regli, A.** (2011). Les mécanismes d'efflux et la résistance chez *Pseudomonas aeruginosa*. *Revue Francophone Des Laboratoires* *2011*, 63–72.
- Palumbo, J.D., Kado, C.I., and Phillips, D.A.** (1998). An isoflavonoid-inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots. *J. Bacteriol.* *180*, 3107–3113.
- Park, J.H., Song, N.H., and Koh, J.W.** (2012). *Achromobacter xylosoxidans* keratitis after contact lens usage. *Korean J. Ophthalmol.* *26*, 49–53.
- Parkins, M.D., and Elborn, J.S.** (2010). Newer antibacterial agents and their potential role in cystic fibrosis pulmonary exacerbation management. *J. Antimicrob. Chemother.* *65*, 1853–1861.
- Peleg, A.Y., Adams, J., and Paterson, D.L.** (2007). Tigecycline efflux as a mechanism for nonsusceptibility in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 2065–2069.
- Peng, W.T., and Nester, E.W.** (2001). Characterization of a putative RND-type efflux system in *Agrobacterium tumefaciens*. *Gene* *270*, 245–252.
- Pereira, R.H.V., Carvalho-Assef, A.P., Albano, R.M., Folescu, T.W., Jones, M.C.M.F., Leão, R.S., and Marques, E.A.** (2011). *Achromobacter xylosoxidans*: characterization of strains in Brazilian cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.* *49*, 3649–3651.
- Perrin, E., Fondi, M., Papaleo, M.C., Maida, I., Buroni, S., Pasca, M.R., Riccardi, G., and Fani, R.** (2010). Exploring the HME and HAE1 efflux systems in the genus *Burkholderia*. *BMC Evol. Biol.* *10*, 164.
- Perron, K., Caille, O., Rossier, C., Van Delden, C., Dumas, J.-L., and Köhler, T.** (2004). CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* *279*, 8761–8768.
- Pfaffl, M.W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* *29*, 2002–2007.
- Pilhofer, M., Bauer, A.P., Schrällhammer, M., Richter, L., Ludwig, W., Schleifer, K.-H., and Petroni, G.** (2007). Characterization of bacterial operons consisting of two tubulins and a kinesin-like gene by the novel Two-Step Gene Walking method. *Nucleic Acids Res.* *35*, e135.
- Pirnay, J.-P., De Vos, D., Mossialos, D., Vanderkelen, A., Cornelis, P., and Zizi, M.** (2002). Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa oprD* gene from clinical and environmental isolates. *Environ. Microbiol.* *4*, 872–882.

- Pompidor, G., Zoropogui, A., Kahn, R., and Covès, J.** (2007). Overproduction, purification and preliminary X-ray diffraction analysis of CzcE from *Cupriavidus metallidurans* CH34. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* *63*, 884–886.
- Pompilio, A., Pomponio, S., Crocetta, V., Gherardi, G., Verginelli, F., Fiscarelli, E., Dicuonzo, G., Savini, V., D'Antonio, D., and Di Bonaventura, G.** (2011). Phenotypic and genotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis: genome diversity, biofilm formation, and virulence. *BMC Microbiol.* *11*, 159.
- Poole, K.** (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* *56*, 20–51.
- Poole, K., Krebs, K., McNally, C., and Neshat, S.** (1993). Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.* *175*, 7363–7372.
- Poole, K., 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*, 713–724.
- Putman, M., van Veen, H.W., and Konings, W.N.** (2000). Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *64*, 672–693.
- Ramos, J.L., Duque, E., Godoy, P., and Segura, A.** (1998). Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* *180*, 3323–3329.
- Raso, T., Bianco, O., Grosso, B., Zucca, M., and Savoia, D.** (2008). *Achromobacter xylosoxidans* respiratory tract infections in cystic fibrosis patients. *APMIS* *116*, 837–841.
- Razvi, S., Quittell, L., Sewall, A., Quinton, H., Marshall, B., and Saiman, L.** (2009). Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995 to 2005. *Chest* *136*, 1554–1560.
- Reverdy, M.E., Freney, J., Fleurette, J., Coulet, M., Surgot, M., Marmet, D., and Ploton, C.** (1984). Nosocomial colonization and infection by *Achromobacter xylosoxidans*. *J. Clin. Microbiol.* *19*, 140–143.
- Riccio, M.L., Pallecchi, L., Fontana, R., and Rossolini, G.M.** (2001). In70 of plasmid pAX22, a *bla*(VIM-1)-containing integron carrying a new aminoglycoside phosphotransferase gene cassette. *Antimicrob. Agents Chemother.* *45*, 1249–1253.
- Ridderberg, W., Bendstrup, K.E., Olesen, H.V., Jensen-Fangel, S., and Nørskov-Lauritsen, N.** (2011). Marked increase in incidence of *Achromobacter xylosoxidans* infections caused by sporadic acquisition from the environment. *J. Cyst. Fibros.* *10*, 466–469.
- Ridderberg, W., Wang, M., and Nørskov-Lauritsen, N.** (2012). Multilocus sequence analysis of isolates of *Achromobacter* from patients with cystic fibrosis reveals infecting species other than *Achromobacter xylosoxidans*. *J. Clin. Microbiol.* *50*, 2688–2694.
- Roca, I., Espinal, P., Marti, S., and Vila, J.** (2011). First identification and characterization of an AdeABC-like efflux pump in *Acinetobacter* genomospecies 13TU. *Antimicrob. Agents Chemother.* *55*, 1285–1286.
- Rodríguez-Martínez, J.-M., Poirel, L., and Nordmann, P.** (2009). Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *53*, 4783–4788.



- Rojas, A., Duque, E., Mosqueda, G., Golden, G., Hurtado, A., Ramos, J.L., and Segura, A.** (2001). Three efflux pumps are required to provide efficient tolerance to toluene in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J. Bacteriol.* *183*, 3967–3973.
- Rojas, A., Segura, A., Guazzaroni, M.E., Teran, W., Hurtado, A., Gallegos, M.T., and Ramos, J.L.** (2003). *In vivo* and *in vitro* evidence that TtgV is the specific regulator of the TtgGHI multidrug and solvent efflux pump of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* *185*, 4755–4763.
- Rozycki (von), T., and Nies, D.H.** (2009). *Cupriavidus metallidurans*: evolution of a metal-resistant bacterium. *Antonie Van Leeuwenhoek* *96*, 115–139.
- Sader, H.S., and Jones, R.N.** (2005). Antimicrobial susceptibility of uncommonly isolated non-enteric Gram-negative bacilli. *Int. J. Antimicrob. Agents* *25*, 95–109.
- Saiman, L., and Siegel, J.** (2004). Infection control in cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* *17*, 57–71.
- Saiman, L., Chen, Y., Tabibi, S., San Gabriel, P., Zhou, J., Liu, Z., Lai, L., and Whittier, S.** (2001). Identification and antimicrobial susceptibility of *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* *39*, 3942–3945.
- Saiman, L., Chen, Y., San Gabriel, P., and Knirsch, C.** (2002). Synergistic activities of macrolide antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* *46*, 1105–1107.
- Saito, K., Yoneyama, H., and Nakae, T.** (1999). *nalB*-type mutations causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the *mexR* gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *FEMS Microbiol. Lett.* *179*, 67–72.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *74*, 5463–5467.
- Schaible, B., Taylor, C.T., and Schaffer, K.** (2012). Hypoxia increases antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* through altering the composition of multidrug efflux pumps. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 2114–2118.
- Schmidt, T., and Schlegel, H.G.** (1994). Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the *ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J. Bacteriol.* *176*, 7045–7054.
- 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*, 1295–1298.
- Sekiya, H., Mima, T., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., and Tsuchiya, T.** (2003). Functional cloning and characterization of a multidrug efflux pump, MexHI-OpmD, from a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Antimicrob. Agents Chemother.* *47*, 2990–2992.
- Sennhauser, G., Amstutz, P., Briand, C., Storchenegger, O., and Grütter, M.G.** (2007). Drug export pathway of multidrug exporter AcrB revealed by DARPin inhibitors. *PLoS Biol.* *5*, e7.
- Sennhauser, G., Bukowska, M.A., Briand, C., and Grütter, M.G.** (2009). Crystal structure of the multidrug exporter MexB from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* *389*, 134–145.
- Shibata, N., Doi, Y., Yamane, K., Yagi, T., Kurokawa, H., Shibayama, K., Kato, H., Kai, K., and Arakawa, Y.** (2003). PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by Gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J. Clin. Microbiol.* *41*, 5407–5413.

- Shigeta, S., Yasunaga, Y., Honzumi, K., Okamura, H., Kumata, R., and Endo, S.** (1978). Cerebral ventriculitis associated with *Achromobacter xylosoxidans*. *J. Clin. Pathol.* *31*, 156–161.
- Siebor, E., Llanes, C., Lafon, I., Ogier-Desserrey, A., Duez, J.M., Pechinot, A., Caillot, D., Grandjean, M., Sixt, N., and Neuwirth, C.** (2007). Presumed pseudobacteremia outbreak resulting from contamination of proportional disinfectant dispenser. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *26*, 195–198.
- Singh, M., Jadaun, G.P.S., Ramdas, Srivastava, K., Chauhan, V., Mishra, R., Gupta, K., Nair, S., Chauhan, D.S., Sharma, V.D., et al.** (2011). Effect of efflux pump inhibitors on drug susceptibility of ofloxacin resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Indian J. Med. Res.* *133*, 535–540.
- Smith, A.W., and Iglewski, B.H.** (1989). Transformation of *Pseudomonas aeruginosa* by electroporation. *Nucleic Acids Res.* *17*, 10509.
- Sofianou, D., Markogiannakis, A., Metzidie, E., Pournaras, S., and Tsakris, A.** (2005). VIM-2 metallo-beta-lactamase in *Achromobacter xylosoxidans* in Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* *24*, 854–855.
- Soto, S.M.** (2013). Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence* *4*, 223–229.
- Speakman, A.J., Binns, S.H., Osborn, A.M., Corkill, J.E., Kariuki, S., Saunders, J.R., Dawson, S., Gaskell, R.M., and Hart, C.A.** (1997). Characterization of antibiotic resistance plasmids from *Bordetella bronchiseptica*. *J. Antimicrob. Chemother.* *40*, 811–816.
- Spear, J.B., Fuhrer, J., and Kirby, B.D.** (1988). *Achromobacter xylosoxidans* (*Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans*) bacteremia associated with a well-water source: case report and review of the literature. *J. Clin. Microbiol.* *26*, 598–599.
- Srikumar, R., Kon, T., Gotoh, N., and Poole, K.** (1998). Expression of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive *Escherichia coli* strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* *42*, 65–71.
- Stoitsova, S.O., Braun, Y., Ullrich, M.S., and Weingart, H.** (2008). Characterization of the RND-type multidrug efflux pump MexAB-OprM of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* *74*, 3387–3393.
- Strnad, H., Ridl, J., Paces, J., Kolar, M., Vlcek, C., and Paces, V.** (2011). Complete genome sequence of the haloaromatic acid-degrading bacterium *Achromobacter xylosoxidans* A8. *J. Bacteriol.* *193*, 791–792.
- 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*, 7290–7296.
- Symmons, M.F., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C., and Koronakis, V.** (2009). The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 7173–7178.
- Tal, N., and Schuldiner, S.** (2009). A coordinated network of transporters with overlapping specificities provides a robust survival strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 9051–9056.
- Tamura, N., Murakami, S., Oyama, Y., Ishiguro, M., and Yamaguchi, A.** (2005). Direct interaction of multidrug efflux transporter AcrB and outer membrane channel TolC detected via site-directed disulfide cross-linking. *Biochemistry* *44*, 11115–11121.

- Taylor, D.L., Bina, X.R., and Bina, J.E.** (2012). *Vibrio cholerae* VexH encodes a multiple drug efflux pump that contributes to the production of cholera toxin and the toxin co-regulated pilus. *PLoS One* 7, e38208.
- Tena, D., González-Praetorius, A., Pérez-Balsalobre, M., Sancho, O., and Bisquert, J.** (2008). Urinary tract infection due to *Achromobacter xylosoxidans*: report of 9 cases. *Scand. J. Infect. Dis.* 40, 84–87.
- Tennent, J.M., Lyon, B.R., Midgley, M., Jones, I.G., Purewal, A.S., and Skurray, R.A.** (1989). Physical and biochemical characterization of the *qacA* gene encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 135, 1–10.
- Teran, W., Felipe, A., Segura, A., Rojas, A., Ramos, J.-L., and Gallegos, M.-T.** (2003). Antibiotic-dependent induction of *Pseudomonas putida* DOT-T1E TtgABC efflux pump is mediated by the drug binding repressor TtgR. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3067–3072.
- Thanassi, D.G., Cheng, L.W., and Nikaido, H.** (1997). Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179, 2512–2518.
- Tikhonova, E.B., Wang, Q., and Zgurskaya, H.I.** (2002). Chimeric analysis of the multicomponent multidrug efflux transporters from Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 184, 6499–6507.
- Traglia, G.M., Almuzara, M., Merkier, A.K., Adams, C., Galanternik, L., Vay, C., Centrón, D., and Ramírez, M.S.** (2012). *Achromobacter xylosoxidans*: an emerging pathogen carrying different elements involved in horizontal genetic transfer. *Curr. Microbiol.* 65, 673–678.
- Tran, Q.-T., Dupont, M., Lavigne, J.-P., Chevalier, J., Pagès, J.-M., Sotto, A., and Davin-Regli, A.** (2009). Occurrence of efflux mechanism and cephalosporinase variant in a population of *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 1652–1656.
- Trias, J., and Nikaido, H.** (1990). Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 52–57.
- Trunck, L.A., Propst, K.L., Wuthiekanun, V., Tuanyok, A., Beckstrom-Sternberg, S.M., Beckstrom-Sternberg, J.S., Peacock, S.J., Keim, P., Dow, S.W., and Schweizer, H.P.** (2009). Molecular basis of rare aminoglycoside susceptibility and pathogenesis of *Burkholderia pseudomallei* clinical isolates from Thailand. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e519.
- Ubukata, K., Itoh-Yamashita, N., and Konno, M.** (1989). Cloning and expression of the *norA* gene for fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33, 1535–1539.
- Umsumarng, S., Pintha, K., Pitchakarn, P., Sastraruji, K., Sastraruji, T., Ung, A., Jatisatienr, A., Pyne, S., and Limtrakul, P.** (2013). Inhibition of P-glycoprotein mediated multidrug resistance by stemofoline derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 61, 399-404.
- Vandamme, P., Heyndrickx, M., Vancanneyt, M., Hoste, B., De Vos, P., Falsen, E., Kersters, K., and Hinz, K.H.** (1996). *Bordetella trematum* sp. nov., isolated from wounds and ear infections in humans, and reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Rügner and Tan 1983. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 849–858.



- Vidailiac, C., Guillon, J., Arpin, C., Forfar-Bares, I., Ba, B.B., Grellet, J., Moreau, S., Caignard, D.-H., Jarry, C., and Quentin, C.** (2007). Synthesis of omeprazole analogues and evaluation of these as potential inhibitors of the multidrug efflux pump NorA of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 831–838.
- Viveiros, M., Leandro, C., and Amaral, L.** (2003). Mycobacterial efflux pumps and chemotherapeutic implications. *Int. J. Antimicrob. Agents* *22*, 274–278.
- 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*, 1676–1680.
- Waters, V.** (2012). New treatments for emerging cystic fibrosis pathogens other than *Pseudomonas*. *Curr. Pharm. Des.* *18*, 696–725.
- 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*, 2975–2983.
- Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K.C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., Weiss, T., et al.** (2002). Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Invest.* *109*, 317–325.
- Wu, G., Liu, J., and Ye, Z.** (2009). Characterization of phosphobacteria isolated from eutrophic aquatic ecosystems. *Microbiology.* *78*, 769–775.
- Yabuuchi, E., and Oyama, A.** (1971). *Achromobacter xylosoxidans* n. sp. from human ear discharge. *Jpn. J. Microbiol.* *15*, 477–481.
- Yabuuchi, E., Kawamura, Y., Kosako, Y., and Ezaki, T.** (1998). Emendation of genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi and Yano) and proposal of *Achromobacter ruhlandii* (Packer and Vishniac) comb. nov., *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian et al.) comb. nov., and *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* (Rüger and Tan) comb. nov. *Microbiol. Immunol.* *42*, 429–438.
- Yamamoto, M., Nagao, M., Hotta, G., Matsumura, Y., Matsushima, A., Ito, Y., Takakura, S., and Ichiyama, S.** (2012). Molecular characterization of IMP-type metallo- $\beta$ -lactamases among multidrug-resistant *Achromobacter xylosoxidans*. *J. Antimicrob. Chemother.* *67*, 2110–2113.
- Yamane, K., Wachino, J.-I., Suzuki, S., Kimura, K., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Konda, T., and Arakawa, Y.** (2007). New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* *51*, 3354–3360.
- Yang, L., Chen, L., Shen, L., Surette, M., and Duan, K.** (2011). Inactivation of MuxABC-OpmB transporter system in *Pseudomonas aeruginosa* leads to increased ampicillin and carbenicillin resistance and decreased virulence. *J. Microbiol.* *49*, 107–114.
- 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*, 103–119.
- Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, S., Ubukata, K., and Konno, M.** (1990). Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones. *J. Bacteriol.* *172*, 6942–6949.

**Yoshida, K., Nakayama, K., Yokomizo, Y., Ohtsuka, M., Takemura, M., Hoshino, K., Kanda, H., Namba, K., Nitanai, H., Zhang, J.Z., et al.** (2006). MexAB-OprM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 6: exploration of aromatic substituents. *Bioorg. Med. Chem.* *14*, 8506–8518.

**Yoshida, K.-I., Nakayama, K., Ohtsuka, M., Kuru, N., Yokomizo, Y., Sakamoto, A., Takemura, M., Hoshino, K., Kanda, H., Nitanai, H., et al.** (2007). MexAB-OprM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 7: highly soluble and *in vivo* active quaternary ammonium analogue D13-9001, a potential preclinical candidate. *Bioorg. Med. Chem.* *15*, 7087–7097.

**Zgurskaya, H.I., and Nikaido, H.** (1999). Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 7190–7195.

**Zgurskaya, H.I., Yamada, Y., Tikhonova, E.B., Ge, Q., and Krishnamoorthy, G.** (2009). Structural and functional diversity of bacterial membrane fusion proteins. *Biochim. Biophys. Acta* *1794*, 794–807.

**Zhang, L., and Mah, T.-F.** (2008). Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. *J. Bacteriol.* *190*, 4447–4452.

**Zhang, L., Li, X.Z., and Poole, K.** (2001). SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *45*, 3497–3503.

*Imprim' Service*



**IMPRIM' SERVICE**  
90, rue de Mirande  
21000 DIJON  
Tél & Fax: 03 80 65 30 74