SOMMAIRE

AVANT-PROPOS

CHAPITRE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. Les entérobactéries du groupe *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* (KES) : description et données épidémiologiques

1.1. *Serratia* spp.

1.2. *Klebsiella* spp.

1.3. *Enterobacter* spp.

1.3.1. *Enterobacter cloacae*

1.3.2. *Enterobacter aerogenes*

2. La résistance aux antibiotiques

2.1. Les mécanismes de résistance

2.1.1. Résistance par altération de la cible

2.1.2. Résistance par modification ou dégradation enzymatique de l'antibiotique

2.1.3. Résistance par diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique

2.1.3.1. Organisation générale de l'enveloppe des bactéries gram-négatives : les facteurs de la résistance intrinsèque

2.1.3.2. La résistance par perte ou modification des porines

2.1.3.3. La résistance par efflux

2.2. Les facteurs favorisant la (multi)résistance

3. L'efflux actif : un mécanisme ubiquitaire à l'origine de la multirésistance

3.1. Distribution et classification phylogénique des transporteurs d'efflux

3.1.1. La superfamille « ATP Binding Cassette » (ABC)

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

3.1.2. La superfamille « Major Facilitator » (MF)

3.1.3. La famille « Multidrug And Toxic compound Extrusion » (MATE)

3.1.4. La famille « Small Multidrug Resistance » (SMR)

3.1.5. La superfamille « Resistance/Nodulation/Cell division » (RND)

3.2. Pompes d'efflux chez *Escherichia coli* et autres entérobactéries

3.3. Pompes d'efflux chez *Pseudomonas aeruginosa* et autres bactéries non-fermentatives

3.4. Les protéines des pompes d'efflux tripartites

3.4.1. La protéine canal de membrane externe

3.4.1.1. Structure tridimensionnelle de la protéine TolC d'*Escherichia coli*

3.4.1.2. Les homologues de TolC chez les bactéries gram-négatives

3.4.1.3. Caractérisation biophysique des protéines d'efflux de la membrane externe

3.4.2. Le transporteur de membrane interne : structure et bases moléculaires de la large spécificité de substrats

3.4.3. La protéine périplasmique adaptatrice : données structurales

3.4.4. Assemblage des pompes d'efflux tripartites

3.5. Régulation du locus *acrAB* chez les entérobactéries

4. Les stratégies thérapeutiques futures : vers des inhibiteurs d'efflux ?

CHAPITRE II : RESULTATS

1. Article 1 : Masi M., Pagès J.M., Villard C., and Pradel E. « The *eefABC* multidrug efflux pump operon is repressed by H-NS in *Enterobacter aerogenes* », J. Bacteriol., 2005, **187:** 3894-3897.
2. Article 2 : Ghisalberti D.[*], Masi M.[*], Pagès J.M. and Chevalier J. « Chloramphenicol and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes* », Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005, **328:** 1113-1118.
3. Article 3 : Masi M., Pagès J.M. and Pradel E. « Overexpression and purification of the three components of the *Enterobacter aerogenes* AcrA-AcrB-TolC multidrug efflux pump », J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 2003, **786:**197-205.
4. Etude comparative des propriétés biophysiques de TolC et EefC, deux protéines d'efflux de la membrane externe d'*Enterobacter aerogenes* (article en cours de préparation)
5. Revue : Pagès, J. M, Masi, M. and J. Barbe. « Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria », Trends Mol. Med., 2005, **11:** 382-389.

CHAPITRE III : DISCUSSION

LISTE DES ABBREVIATIONS

C-CLINs : Centre de Coordination Interrégionale de la Lutte contre les Infections Nosocomiales

RAISIN : Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales

InVS : Institut de Veille Sanitaire

ESAC : European Surveillance of Antimicrobial Consumption

DDD : Defined Daily Dose

KES: *Klebsiella – Enterobacter – Serratia*

VP+ : réaction Voges Proskauer positive

BLSE : β-lactamase à spectre étendu

TEM :

SHV :

PLPs : Protéines liant les pénicillines

QRDR : Quinolone Resistant Determining Region

LPS : Lipopolysaccharide

ABC : ATP-binding cassette

MF : Major Facilitator

SMR : Small Multidrug Resistance

MATE : Multidrug And Toxic compound Extrusion

RND : Resistance – Nodulation – cell Division

MFP : Membrane Fusion Protein

ITC : Isothermal calorimetry

P_{K^+} : perméabilité au ions potassium

P_{Cl^-} : perméabilité au ions chlorure

CCCP : carbonyl cyanure *m*-chlorophenylhydrazone

PAβN: Phénylalanine – arginyl – β – naphthylamide

EPIs: Efflux Pump Inhibitors

AVANT-PROPOS

Depuis leur découverte en 1950 et jusqu'à quelques années seulement, les antibiotiques ont été considérés comme des médicaments dont l'efficacité clinique n'était jamais mise en doute. Ceci n'est plus vrai aujourd'hui. Les bactéries ont développé des mécanismes de résistance aux antibiotiques nombreux et variés.

L'émergence des résistances aux antibiotiques est multi-factorielle. En tant que population, les bactéries présentent une grande capacité d'adaptation aux changements environnementaux par des processus de mutation et/ou d'acquisition de gènes, puis de sélection. Dans la plupart des pays développés, un usage excessif et/ou inapproprié des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire a conduit à une prolifération rapide de micro-organismes adaptés. La conséquence la plus grave est l'apparition de souches bactériennes multirésistantes. En milieu hospitalier, la pression médicamenteuse constante, l'immunodépression générale de certains patients, l'utilisation de techniques invasives et la transmission rapide des microbes facilitent l'émergence et la dissémination de souches bactériennes multirésistantes. Les infections nosocomiales sont une cause importante d'échec thérapeutique avec des risques accrus de complications cliniques et des durées d'hospitalisation prolongées. Cela se traduit par des coûts humains et économiques élevés pour la société. Longtemps limitée aux isolats hospitaliers, la résistance est maintenant présente en médecine ambulatoire.

En France, cinq C-CLINs (Centre de Coordination Interrégionale de la Lutte contre les Infections Nosocomiales) surveillent les infections nosocomiales et la résistance des bactéries nosocomiales aux antibiotiques depuis 1992. Un réseau national a été crée (RAISIN, Réseau d'Alerte, d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales) autour des CCLINs en collaboration avec l'InVS (Institut de Veille Sanitaire). En 2001, une grande enquête de prévalence a eu lieu dans 1533 établissements représentant 77 % des lits hospitaliers français et incluant 305 656 patients. Parmi eux, 21 010 avaient une ou plusieurs infections le jour de l'enquête soit un taux de prévalence de 6,87 %.

En février 2005, le groupe du projet ESAC (*European Surveillance of Antimicrobial Consumption*) publiait les résultats d'une étude sur la prescription d'antibiotiques en consultation externe (Goossens *et al.*, 2005). Sur les 26 pays qui ont participé à l'enquête, la France présente le plus haut taux d'antibiotiques prescrits en premiers soins, avec 32,2 DDD (*defined daily dose*) par 1000 habitants par jour, et le plus haut niveau de résistance aux antibiotiques. Comme chez nos voisins européens, les anciens antibiotiques à spectre d'action étroit ont été remplacés par de nouveaux antibiotiques à spectre plus large, favorisant ainsi la

dissémination inter-espèce des gènes de résistance. Il nous faut donc impérativement changer notre culture abusive de prescription et de consommation d'antibiotiques, sinon nous finirons par enterrer un des miracles du 20ème siècle.

Parmi les micro-organismes responsables d'infections nosocomiales, l'espèce *Enterobacter aerogenes* s'est distinguée ces 10 dernières années par une remarquable évolution de son profil de résistance aux antibiotiques et une étonnante faculté d'adaptation au milieu hospitalier. Dès 1998, plusieurs isolats cliniques d'*E. aerogenes* présentant une multirésistance aux antibiotiques ont été caractérisés dans le laboratoire EA2197. Deux mécanismes de résistance ont été mis en évidence chez ces isolats : la disparition de porines, réduisant l'entrée des antibiotiques, et la mise en place d'un efflux actif de ces mêmes produits. Afin de parvenir à un schéma intégré des évènements conduisant au développement de la multirésistance chez *E. aerogenes*, le laboratoire EA2197 étudie les mécanismes effecteurs associés aux membranes ainsi que leur régulation. Ces processus biologiques sont étudiés en utilisant des approches génétiques, moléculaires et biochimiques. Dans ce contexte, le premier objectif de ce travail était d'identifier et de caractériser les différents systèmes d'efflux à l'origine de la multirésistance chez *E. aerogenes*. Pour mieux comprendre les mécanismes de translocation permettant l'expulsion de molécules très diverses, le second objectif de ce travail était de réaliser une étude structurale et fonctionnelle des protéines d'efflux d'*E. aerogenes*.

CHAPITRE I :

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Rapport-Gratuit.com

1. Les entérobactéries du groupe *Klebsiella, Enterobacter, Serratia* (KES) : description et données épidémiologiques

Les *Enterobacteriaceae* sont des commensaux du tube intestinal des mammifères. Ce sont des bacilles gram-négatifs, ne formant pas de spores et présentant une ciliature péritriche lorsqu'ils sont mobiles. Anaérobies facultatives, les entérobactéries se développent facilement sur des milieux ordinaires, fermentent le glucose avec ou sans gaz et plusieurs autres sucres, transforment les nitrates en nitrites et ne possèdent pas d'oxydase (Freney, 2000).

Parmi les entérobactéries, les genres *Klebsiella*, *Citrobacter* et *Enterobacter* peuvent être isolés à partir de nombreux écosystèmes tels que le tube digestif de l'homme et des animaux, l'eau, le sol, les végétaux…, à l'inverse d'*Escherichia coli* et des *Shigella* spp. qui ne se retrouvent pas dans l'environnement. Ce caractère ubiquiste est sans doute le plus accentué dans le groupe *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* (KES). Les bactéries du groupe KES utilisent une voie métabolique de fermentation des sucres particulière qui aboutit à la production d'acétoïne, mise en évidence par la réaction de Voges Proskauer (VP), et sont dites VP+ (Freney, 2000). Le groupe KES est très souvent responsable d'infections nosocomiales, représentant entre 10 et 30 % des bactéries multirésistantes en France selon les régions (source C-CLINs).

1.1. *Serratia* spp.

Les *Serratia* sont très répandues dans la nature, l'eau constituant leur principale niche écologique. Ce sont des bactéries mobiles, qui forment des colonies pigmentées en rouge caractéristique par production d'un pigment non-diffusible, la prodigiosine (Monnet & Freney, 2000). Bien avant leur description, ces « bactéries rouges » à l'aspect de gouttes de sang ont régulièrement animé l'histoire par des phénomènes de pains et d'hosties sanglants. Présageant malédictions, ces épisodes sont souvent malheureusement souvent soldés par le massacre d'innocents. Le genre *Serratia* est facile à identifier puisque les souches sont généralement résistantes à la polymyxine et à la céfalotine et possèdent une gélatinase, une lipase et une désoxyribonucléase extracellulaires.

Dans le genre *Serratia*, seule l'espèce type *S. marcescens* est responsable d'infections chez l'homme. Depuis une trentaine d'années, *S. marcescens* est impliquée dans des infections nosocomiales, causant principalement des infections respiratoires et urinaires (Hejazi & Falkiner, 1997). La prévalence du genre *Serratia* dans les infections nosocomiales est en diminution, mais ces bactéries sont toujours capables d'engendrer des épisodes épidémiques surtout dans les unités de soins intensifs. Les souches de *S. marcescens* sont naturellement résistantes à l'ampicilline, à la céfalotine et à la polymyxine. Cependant, elles sont aussi de plus

en plus résistantes à la ticarcilline et aux céphalosporines de 2ème génération, voire à certaines céphalosporines de la 3ème génération par la dé-répression d'une β–lactamase chromosomique de type céphalosporinase ou par diminution de la perméabilité membranaire, ainsi qu'à certains aminosides (l'amikacine restant le plus efficace), à l'acide nalidixique et au cotrimoxazole. De plus, on connaît maintenant des souches résistantes à l'imipénème (Troillet *et al.*, 1999).

1.2. *Klebsiella* spp.

Le genre *Klebsiella* regroupe actuellement cinq espèces toutes immobiles et généralement encapsulées. D'un point de vue biochimique, elles produisent une lysine décarboxylase mais pas d'ornithine décarboxylase, sont oxydase négatives, catalase positives, indole et uréase positives (Drancourt, 2000).

Les *Klebsiella* sont bien connues des cliniciens comme agents de pneumonies communautaires. Toutefois, la grande majorité des infections à *Klebsiella* est associée au secteur hospitalier (Podschun & Ullmann, 1998). En tant que pathogènes opportunistes, *Klebsiella* spp. infectent préférentiellement les individus immunodéprimés ou présentant une pathologie sous-jacente sévère telle que le diabète. Chez l'homme, *K. pneumoniae* est une espèce saprophyte présente dans le tractus intestinal et le nasopharynx, mais elle représente aussi l'espèce la plus importante du genre sur le plan médical, à l'origine des infections nosocomiales. A un moindre degré, *K. oxytoca* est également isolée à partir de prélèvements humains. En 1998, on estimait que *Klebsiella* spp. représentaient 8 % des infections nosocomiales aux Etats-Unis et en Europe, le tractus urinaire constituant le site d'infection le plus fréquent (Podschun & Ullmann, 1998). Le fait le plus inquiétant est l'émergence de souches multirésistantes aux antibiotiques, responsables de véritables épidémies nosocomiales. En effet, depuis les années 80, la production de β–lactamases à spectre étendu (BLSE) rend les souches résistantes à une large gamme de β–lactamines y compris des céphalosporines de 3ème génération (De Champs *et al.*, 1991 ; Bauernfeind *et al.*, 1993 ; Bradford, 2001 ; Karlowsky *et al.*, 2003). En Europe, les BLSEs produites par *Klebsiella* sont de type SHV-5, alors qu'aux Etats-Unis il s'agit surtout des enzymes TEM-10 et TEM-12 (Podschun & Ullmann, 1998). L'incidence de ces isolats de *K. pneumoniae* producteurs de BLSEs a été estimée à 5 % aux Etats-Unis (Jacoby, 1996). En Europe, cette fréquence est plus élevée, atteignant les 15 % en France et au Royaume-Uni (Sirot, 1995). Les BLSEs ont une origine plasmidique ; ces plasmides sont facilement transmissibles au sein des entérobactéries et sont très stables par les avantages qu'ils offrent à la survie des bactéries en milieu hospitalier. La production de BLSEs est associée à un phénotype multirésistant et limite donc les possibilités thérapeutiques. A ce

jour, la plupart les isolats de *K. pneumoniae* producteurs de BLSEs restent sensibles aux β–lactamines de la famille des carbapénèmes (imipénème et méropénème). Néanmoins, des souches de *K. pneumoniae* résistantes à l'imipénème ont été observées récemment et leur développement est très surveillé (Bradford *et al.*, 1997 ; Hasdemir *et al.*, 2004).

Les facteurs de pathogénicité ont été étudiés chez *K. pneumoniae* et comportent les adhésines qui entraînent une hémo-agglutination, la résistance au pouvoir bactéricide des anticorps, les antigènes capsulaires qui déterminent 77 sérotypes, les antigènes du polyliposaccharide qui déterminent 8 sérotypes et les sidérophores (Drancourt, 2000).

Depuis une quinzaine d'années, on note en France une diminution constante de la représentation de *K. pneumoniae* au profil d'une autre entérobactérie, *Enterobacter aerogenes* (source C-CLINs).

1.3. *Enterobacter* spp.

Le genre *Enterobacter* est très proche du genre *Klebsiella* mais s'en distingue par sa mobilité et ses caractéristiques biochimiques : généralement ornithine décarboxylase positif et uréase négatif. Le genre *Enterobacter* regroupe actuellement 14 espèces ; parmi elles *E. cloacae* (espèce type du genre) et *E. aerogenes* sont les espèces pathogènes pour l'homme les plus fréquemment isolées en clinique (Farmer, 1985 ; Sanders & Sanders, 1997).

Le genre *Enterobacter* a pris ces dernières années une importance croissante du fait de son émergence comme agent nosocomial et de sa capacité à acquérir des mécanismes de résistance aux antibiotiques. En milieu hospitalier, le risque de colonisation et d'infection est associé à plusieurs facteurs : l'hospitalisation elle-même qui entraîne une modification de la flore intestinale du patient, l'immunodépression quelle que soit son origine (traitements médicamenteux, situations post-opératoires, patients âgés, VIH…), la pose d'appareillages médicaux invasifs (cathéters veineux ou urinaires), et surtout la prise d'antibiotiques.

En tant que pathogènes nosocomiaux émergents, on connaît encore très mal les facteurs de pathogénicité et de virulence d'*Enterobacter* spp., en dehors de l'endotoxine commune à toutes les bactéries gram-négatives (Bone, 1993). La plupart des aspects épidémiologiques des infections à *Enterobacter* reflètent plus le caractère opportuniste que la virulence intrinsèque du microorganisme. En effet, la « pathogénicité » d'*Enterobacter* spp. et leur prévalence comme pathogènes nosocomiaux résident dans leur niveau de résistance aux agents antibactériens (désinfectants et antibiotiques), considéré comme le plus élevé parmi toutes les entérobactéries (Sanders & Sanders, 1997).

1.3.1. *Enterobacter cloacae*

C'est l'espèce type du genre *Enterobacter*. Les souches sont ornithine décarboxylase positives, arginine décarboxylase positives et lysine décarboxylase négatives. Elles fermentent le D-sorbitol, le saccharose et la mélibiose (Farmer, 1985).

E. cloacae possède une pénicillinase chromosomique constitutive ainsi qu'une céphalosporinase chromosomique inductible, qui rendent compte de sa résistance naturelle à de nombreuses β–lactamines. En 1989, De Champs et collaborateurs décrivent les premiers cas d'infections nosocomiales à des souches productrices d'une BLSE, entraînant un niveau de résistance élevé aux céphalosporines de 3ème génération (De champs *et al.*, 1989). Les céphalosporines de « 4ème génération » (céfépime et cefpirome) ainsi que les carbapénèmes (imipénème et méropénème), diffusant très rapidement à travers la membrane externe, restent le plus souvent actifs.

La présence de facteurs de virulence chez *E. cloacae* est peu documentée. Deux groupes ont pourtant mis en évidence la production d'un sidérophore, l'aérobactine, une capacité d'hémo-agglutination et une activité hémolytique dans plusieurs isolats cliniques (Barnes *et al.*, 1996 ; Keller *et al.*, 1997). Une de ces études a abouti à la purification et à la caractérisation biochimique d'une cytotoxine de 13 kDa, proche de celle de *Shigella* (Barnes *et al.*, 1996 ; Paton & Paton, 1996). L'expression de facteurs de virulence représente une valeur ajoutée pour des pathogènes opportunistes, en leur permettant de s'adapter à la vie dans l'hôte.

1.3.2. *Enterobacter aerogenes*

Cette espèce est phénotypiquement et génotypiquement très proche de *K. pneumoniae*. Elle est mobile, ornithine décarboxylase positive, uréase et indole négative (Farmer, 1985).

Avant 1993, *E. cloacae* était l'espèce du genre *Enterobacter* la plus fréquemment isolée à partir de prélèvements cliniques humains et *E. aerogenes* n'était alors que très rarement retrouvée (Gaston, 1988). Depuis 1995, cette tendance s'est inversée et *E. aerogenes* a émergé en tant qu'agent d'infections nosocomiales important et des souches multirésistantes aux antibiotiques sont à l'origine de nombreux épisodes épidémiques en France (Arpin *et al.*, 1996 ; Davin-Régli *et al.*, 1996, Neuwirth *et al.*, 1996 ; Albertini *et al.*, 2002 ; Arpin *et al.*, 2003 ; Lavigne *et al.*, 2004), mais aussi en Belgique (De Gheldre *et al.*, 2001), en Espagne (Cantòn *et al.*, 2002 ; Salso *et al.*, 2003) et aux Etats-Unis (Streit *et al.*, 2004). En France, *E. aerogenes* représente aujourd'hui la 3ème cause d'infections urinaires et est fréquemment associée à des infections respiratoires et gastro-intestinales en unités de soins intensifs (Bornet *et al.*, 2000a). Cette espèce est naturellement résistante aux aminopénicillines, aux céphamycines et aux

premières céphalosporines par l'intermédiaire d'une pénicillinase et d'une céphalosporinase chromosomiques. La dé-répression de la céphalosporinase chromosomique ou l'acquisition d'une BLSE plasmidique lui confère un haut niveau de résistance vis-à-vis des dernières céphalosporines jusqu'ici actives. Depuis une dizaine d'années, de nombreuses études rendent compte de l'évolution de la résistance chez *E. aerogenes* et de sa capacité à acquérir des mécanismes de résistance efficaces lui permettant de s'adapter à l'environnement hospitalier (Charrel *et al.*, 1996 ; Malléa *et al.*, 1998 ; Sirot *et al.*, 2002 ; Karlowsky *et al.*, 2003 ; Wenzel *et al.*, 2003). Les premiers isolats d'*E. aerogenes* porteurs de BLSE de type TEM-24 ont été isolés et caractérisés en 1988 dans l'hôpital universitaire de Clermont-Ferrand (De Champs *et al.*, 1991). Aujourd'hui la grande majorité des isolats d'*E. aerogenes* expriment cette enzyme et correspondent en fait à un seul et même clone qui s'est répandu dans les hôpitaux français (Bosi *et al.*, 1999 ; Dumarche *et al.*, 2002). Une rétrospective chronologique des enquêtes menées en France donne une bonne illustration de la dissémination de ce clone. En 1994, Davin-Régli et coll. recueillent 185 isolats d'*E. aerogenes* à l'hôpital de S^{te} Marguerite à Marseille et mettent en évidence la prévalence d'un clone producteur de BLSE de type TEM-24 (Davin-Régli *et al.*, 1996). En 1996, Arpin et coll. rapporte une épidémie dans l'hôpital Pellegrin à Bordeaux causée par des souches d' *E. aerogenes* résistantes à la ceftazidime et produisant une BLSE de type TEM ou SHV (Arpin *et al.*, 1996). Toujours en 1996, Neuwirth et coll. caractérisent 10 isolats d' *E. aerogenes* recueillis dans l'hôpital Bocage à Dijon. Tous appartiennent à un même clone producteur de BLSE de type TEM-24 (Neuwirth *et al.*, 1996). En 1999, Bosi et coll. établissent la prévalence de ce clone dans 23 hôpitaux français (Bosi *et al.*, 1999). Depuis 2000, la dissémination à long terme de ce clone dans les hôpitaux français est confirmée (Galdbart *et al.*, 2000 ; Dumarche *et al.*, 2002). Pour *E. aerogenes*, l'acquisition de TEM-24 comme mécanisme de résistance à l'action des céphalosporines à large spectre représente un facteur sélectif à l'origine de ses capacités d'adaptation et de dissémination. Le grand plasmide (environ 85-kb) codant TEM-24 confère également une résistance aux sulfamides, au chloramphénicol et aux aminoglycosides (Marchandin *et al.*, 2000). Depuis quelques années, ce clone est isolé lors d'épidémies nosocomiales en Belgique et en Espagne (De Gheldre *et al.*, 2001 ; Cantòn *et al.*, 2002).

La situation épidémiologique des *Enterobacteriaceae* est très dynamique et représente un problème grandissant. Le plasmide TEM-24 a été détecté dans d'autres espèces bactériennes de la famille des *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *E. coli* et *Proteus* spp.) mais aussi dans *Pseudomonas aeruginosa* co-isolées avec *E. aerogenes* en clinique (Marchandin *et al.*, 1999 ; Marchandin *et al.*, 2000 ; Neuwirth *et al.*, 2001). Cela résulte d'un transfert

horizontal inter-espèces. Le clone d'*E. aerogenes* producteur de TEM-24 est donc une double menace : il se répand rapidement et constitue un réservoir pour la dissémination de TEM-24.

L'émergence d'*E. aerogenes* comme pathogène nosocomial est principalement liée à l'utilisation des céphalosporines et des fluoroquinolones à large spectre. De façon alarmante, on observe aujourd'hui l'apparition de souches d'*E. aerogenes* résistantes à l'imipénème (De Gheldre *et al.*, 1997). Ces souches représentent déjà plus de 5 % de la collection d'isolats cliniques au laboratoire. Dans ces isolats, la résistance à l'imipénème est due à une disparition des portes d'entrée que sont les porines de la membrane externe (Chow *et al.*, 1991 ; Tzouvelekis *et al.*, 1994 ; Charrel *et al.*, 1996 ; Bornet *et al.*, 2000b). L'incidence de ce mécanisme chez *E. aerogenes* va certainement augmenter avec l'usage de l'imipénème en clinique.

Depuis 1998, on décrit des isolats d'*E. aerogenes* multirésistants présentant une production de BLSE associée à la disparition des porines et la présence d'un efflux actif, aboutissant à un échec thérapeutique (Malléa *et al.*, 1998 ; Pradel & Pagès, 2002 ; Gayet *et al.*, 2003).

En France, les rapports d'enquêtes des C-CLINs (Sud-Est, Est, Paris-Nord et Ouest) fournissent des informations importantes sur la fréquence d'isolement des bactéries multirésistantes en clinique et sur l'évolution de leur phénotype au cours du temps. Les résultats de ces enquêtes n'étant pas recueillis de manière uniforme entre les régions, il est difficile de les regrouper pour en faire une synthèse. Par exemple, le C-CLIN Paris-Nord ne considère que les entérobactéries productrices de BLSE alors que les C-CLINs Sud-Est et Ouest recherchent la présence de BLSE parmi toutes les entérobactéries isolées. Les C-CLINs Paris-Nord et Ouest rapportent le niveau de résistance des souches isolées à plusieurs familles d'antibiotiques utilisés en clinique alors que le C-CLIN Sud-Est ne considère que la résistance aux céphalosporines de 3ème génération. Néanmoins, nous pouvons globalement en déduire que :

- les entérobactéries représentent une forte proportion des bactéries multirésistantes isolées (entre 18 et 34 %),
- parmi les entérobactéries multirésistantes recueillies, *E. aerogenes* représente l'espèce majoritaire (entre 10 et 40 %),
- la production de BLSE parmi des entérobactéries multirésistantes est très répandue (entre 28 et 43 %),
- l'espèce *E. aerogenes* représente le réservoir majeur de BLSE (entre 18 et 70 %)
- l'imipénème et la gentamycine sont les deux seuls antibiotiques encore efficaces contre les entérobactéries multirésistantes.

2. La résistance aux antibiotiques

2.1. Les mécanismes de résistance

D'origine naturelle, semi-synthétique ou synthétique, les antibiotiques peuvent être classés en quatre grandes catégories selon leur activité. Les glycopeptides et les β-lactamines empêchent la formation de la paroi de peptidoglycane. Les aminoglycosides, les tétracyclines, le chloramphénicol et les macrolides bloquent la synthèse protéique. La rifampicine, les quinolones, les sulfamides et le triméthoprime inhibent la synthèse des acides nucléiques. Enfin, les polymyxines agissent sur les membranes mais sont réservées à un usage local externe du fait de leurs effets secondaires importants. Bien que le développement des antibiotiques ait connu un essor sans précédent au cours de ces dernières années, les bactéries, en parallèle, ont su rapidement mettre en place des mécanismes de résistance appropriés.

La description des différents mécanismes de résistance qui suit concerne surtout les bactéries gram-négatives. Ils peuvent être classés en trois catégories illustrées dans la figure 1:

- l'altération de la cible bactérienne,
- la modification ou la dégradation enzymatique de l'antibiotique,
- la réduction de la concentration intracellulaire de l'antibiotique

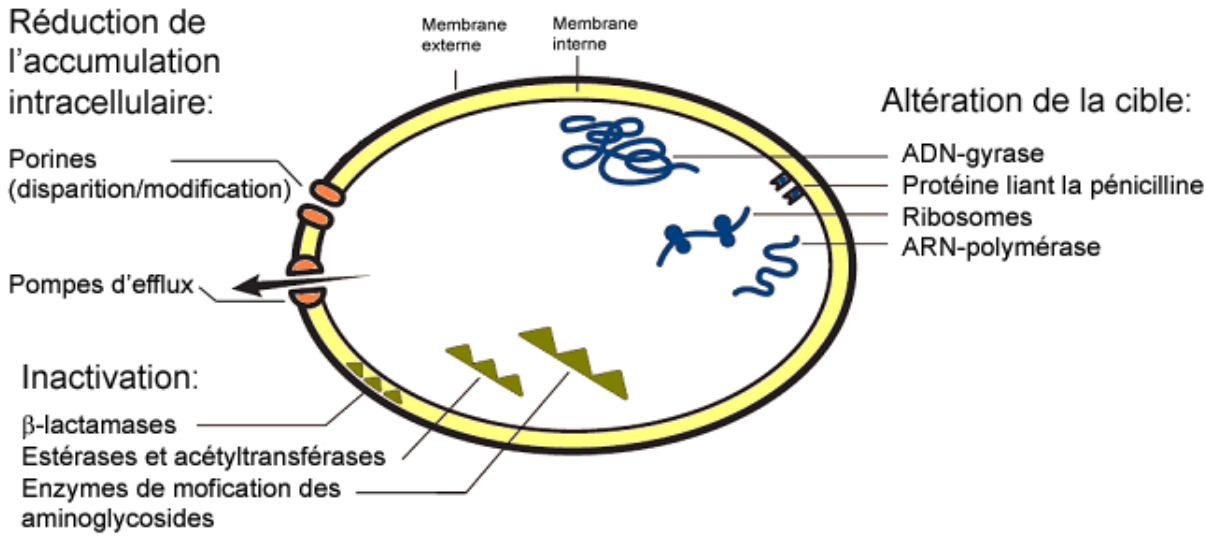


Figure 1 : Mécanismes généraux de résistance aux antibiotiques chez les bactéries gram-négatives

On distingue les résistances naturelles, présentes chez toutes les bactéries d'une même espèce, des résistances acquises par certaines souches au sein d'une espèce théoriquement sensible. Le support génétique d'une résistance acquise résulte soit d'une mutation chromosomique, soit de l'acquisition d'éléments mobiles tels que les plasmides, les transposons ou les intégrons. Chez les isolats cliniques, 80 à 90 % des résistances acquises sont d'origine plasmidique. Ce type de résistance est facilement transférable entre les espèces bactériennes et concerne souvent plusieurs familles d'antibiotiques car ces plasmides portent en général plusieurs gènes de résistance. Les mutations chromosomiques ont une importance plus restreintes : elles n'ont d'effet que sur un seul antibiotique ou une seule classe d'antibiotiques et ne sont pas transférables. De plus, l'usage large d'antibiotiques en clinique sélectionne des souches multirésistantes aux antibiotiques par l'action combinée de plusieurs de ces mécanismes.

2.1.1. Résistance par altération de la cible

La modification d'une cible bactérienne limite l'interaction avec l'antibiotique et devient insensible à son action. Par ce mécanisme, la résistance s'étend ainsi à tous les antibiotiques d'une même famille.

Chez les bactéries gram-négatives, les β-lactamines atteignent leurs cibles, les protéines liant la pénicilline (PLPs), dans le périplasme après avoir traversé la membrane externe par l'intermédiaire des porines. Les PLPs sont des protéines assurant l'assemblage des sous-unités de la paroi bactérienne. La résistance aux β-lactamines par altération des PLPs concerne surtout les bactéries gram-positives, mais quelques exemples ont été décrits chez *Neisseria gonorrhoeae* (Hakenbeck & Coyette, 1998). Dans ce cas, les bactéries résistantes produisent des PLPs modifiées de faible affinité pour l'antibiotique.

La résistance aux fluoroquinolones est généralement attribuée à des mutations de leurs cibles, représentées par l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (respectivement *gyrA* et *parC*), deux enzymes jouant un rôle capital dans la conformation de l'ADN. Les mutations décrites se situent dans une région de 40 acides aminés de la sous-unité A de la gyrase. Cette zone, commune à de nombreuses espèces bactériennes, est appelé *Quinolone Resistant Determining Region* (QRDR) (Hooper, 2000).

Enfin, la modification de la cible ribosomale est le principal mécanisme de résistance aux tétracyclines (Chopra & Roberts, 2001), aux macrolides (Leclercq & Courvalin, 1991) et, dans une moindre mesure, aux aminoglycosides (Wright *et al.*, 1998).

2.1.2. Résistance par modification ou dégradation enzymatique de l'antibiotique

Le mécanisme majeur de résistance aux β-lactamines est la production de β-lactamases. Ces enzymes inactivent les pénicillines et les céphalosporines en hydrolysant leur noyau β-lactame commun. Aujourd'hui, quatre classes de β-lactamases sont reconnues selon leurs substrats: les pénicillinases (classe A), les métallo-β-lactamases (classe B), les céphalosporinases (classe C) et les oxacillinases (classe D) (Thomson & Smith, 2000). Les bactéries productrices de β-lactamases sécrètent ces enzymes dans l'espace périplasmique pour détruire les β-lactamines avant qu'elles n'atteignent leur cible. On estime qu'une β-lactamase est capable d'hydrolyser 10^3 molécules de pénicilline par seconde. Donc, si 10^5 enzymes sont sécrétées par une bactérie résistante, alors 100 millions de molécules de pénicilline sont détruites toutes les secondes (Walsh, 2000). Clairement, c'est un mécanisme de résistance très efficace. A l'exception de quelques espèces telles que *E. coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia pestis*, *Shigella* spp. et *Proteus mirabilis*, les *Enterobacteriaceae* et les *Pseudomonas* sont naturellement résistantes aux pénicillines voire à certaines céphalosporines par l'expression d'une pénicillinase et/ou d'une céphalosporinase chromosomiques (Freney, 2000). Pour résoudre ce problème, plusieurs alternatives s'envisagent : l'association des β-lactamines avec des inhibiteurs des β-lactamases (acide clavulanique, sulbactame et tazobactame) ou l'utilisation de céphalosporines stables (céfépime et cefpirome, carbapénèmes, monobactame). L'expression de la céphalosporinase chromosomique peut être soit constitutive soit inductible par la présence des β-lactamines elles-mêmes. De plus, ce type de résistance n'est pas levé par l'utilisation d'inhibiteurs des β-lactamases. En clinique, le mode de production inductible est répandu et bien décrit, notamment chez *Enterobacter* spp. (Livermore, 1995). La résistance aux β-lactamines peut être également due à l'acquisition de BLSEs d'origine plasmidique (Bradford, 2001). Les BLSEs les plus fréquemment rencontrées chez les *Enterobacteriaceae* sont de type TEM ou SHV, et de nombreux variants en dérivent par mutations ponctuelles (Jacoby & Medeiros, 1991 ; Ehrhardt & Sanders, 1993 ; Davies, 1994). A l'inverse des céphalosporinases, la plupart des BLSEs sont sensibles aux inhibiteurs des β-lactamases *in vitro* et *in vivo*. Cependant, il existe des variants « TEM résistantes aux inhibiteurs », comme par exemple TEM-24 retrouvée dans le clone prévalent d'*E. aerogenes*.

Les aminoglycosides ne sont pas hydrolysables, mais ceux-ci peuvent être rendus inactifs par trois types de substitutions chimiques qui empêchent leur fixation sur l'ARN ribosomal cible. Les enzymes de résistance aux aminoglycosides peuvent être des O-phosphotransférases, des O-adényltransférases ou des N-acétyltransférases, et les gènes correspondants sont bien souvent portés par des éléments mobiles (Wright *et al.*, 1998 ; Wright, 1999). Chez *E. aerogenes* par

exemple, l'enzyme de type AAC6' est associée à la BLSE de type TEM-24 sur le même plasmide. Cette enzyme inactive la nétilmicine, la kanamycine, la tobramycine et l'amikacine, mais reste sans effet sur la gentamycine (Marchandin *et al.*, 2000).

Enfin, la résistance aux phénicolés est liée à la synthèse d'une chloramphénicol-acétyltransférase conférant un haut niveau de résistance à ces antibiotiques (Murray & Shaw, 1997).

2.1.3. Résistance par diminution de la concentration intracellulaire de l'antibiotique

Pour que les antibiotiques puissent exercer leur action, ils doivent avoir accès à leur cible intracellulaire. Dans le cas des bactéries gram-négatives, ceci implique la traversée de la membrane externe. Or celle-ci constitue une barrière imperméable à la pénétration des antibiotiques et explique, du moins en partie, le niveau de résistance intrinsèque élevé des bactéries gram-négatives comparées aux bactéries gram-positives vis-à-vis de nombreux antibiotiques (Nikaido, 2003).

2.1.3.1. Organisation générale de l'enveloppe des bactéries gram-négatives : les facteurs de la résistance intrinsèque

L'enveloppe des bactéries gram-négatives est constituée de deux membranes : la membrane interne ou cytoplasmique et la membrane externe. Ces deux membranes délimitent l'espace périplasmique ou se situe le peptidoglycane, qui contribue à la résistance mécanique de l'enveloppe (figure 2).

La membrane externe joue un rôle important dans la physiologie des bactéries gram-négatives. Dans le cas des entérobactéries, dont l'habitat naturel est le tractus intestinal des mammifères, la membrane externe agit comme une véritable barrière de protection contre l'action détergente des sels biliaires et contre la dégradation par les enzymes digestives (Nikaido & Nakae, 1979). En même temps, la membrane externe des entérobactéries et d'autres bactéries gram-négatives est imperméable à de nombreux antibiotiques (Nikaido & Nakae, 1979). La membrane externe présente une organisation asymétrique. Son feuillet externe caractéristique presque exclusivement formé par le lipopolysaccharide (LPS) est à la base de cette imperméabilité (figure 2). Le LPS est un lipide polyanionique constitué de trois régions : le lipide A, le noyau oligosaccharidique et l'antigène O. Deux facteurs contribuent à faire du LPS une structure hautement imperméable. D'une part, les acides gras qui forment le LPS des entérobactéries sont tous saturés. Une telle composition offre une très faible fluidité et le domaine hydrocarboné se présenterait alors sous l'état d'un « gel » même à 37°C. D'autre part,

les molécules de LPS, riches en charges négatives, fixent des cations divalents (Mg^{2+}, Ca^{2+}) et ces interactions électrostatiques permettent un lien fort entre les molécules adjacentes (Nikaido, 2003). Par sa rigidité, le LPS tend à diminuer le taux de diffusion transmembranaire des antibiotiques lipophiles tels que les macrolides, les β-lactamines les plus hydrophobes, la novobiocine, l'acide fusidique… Néanmoins, les liens rigides du LPS qui assurent l'intégrité de la membrane externe en sont aussi le « tendon d'Achille ». Ainsi, les antibiotiques polycationiques que sont les polymyxines se complexent au LPS, à la place des cations divalents stabilisateurs, et entraînent sa désorganisation (Nikaido, 2003). Outre l'imperméabilité membranaire, le LPS offre également d'autres avantages : il permet aux bactéries gram-négatives d'échapper à la phagocytose et de se protéger contre les actions du complément et des anticorps circulants (Mäkelä *et al.*, 1980).

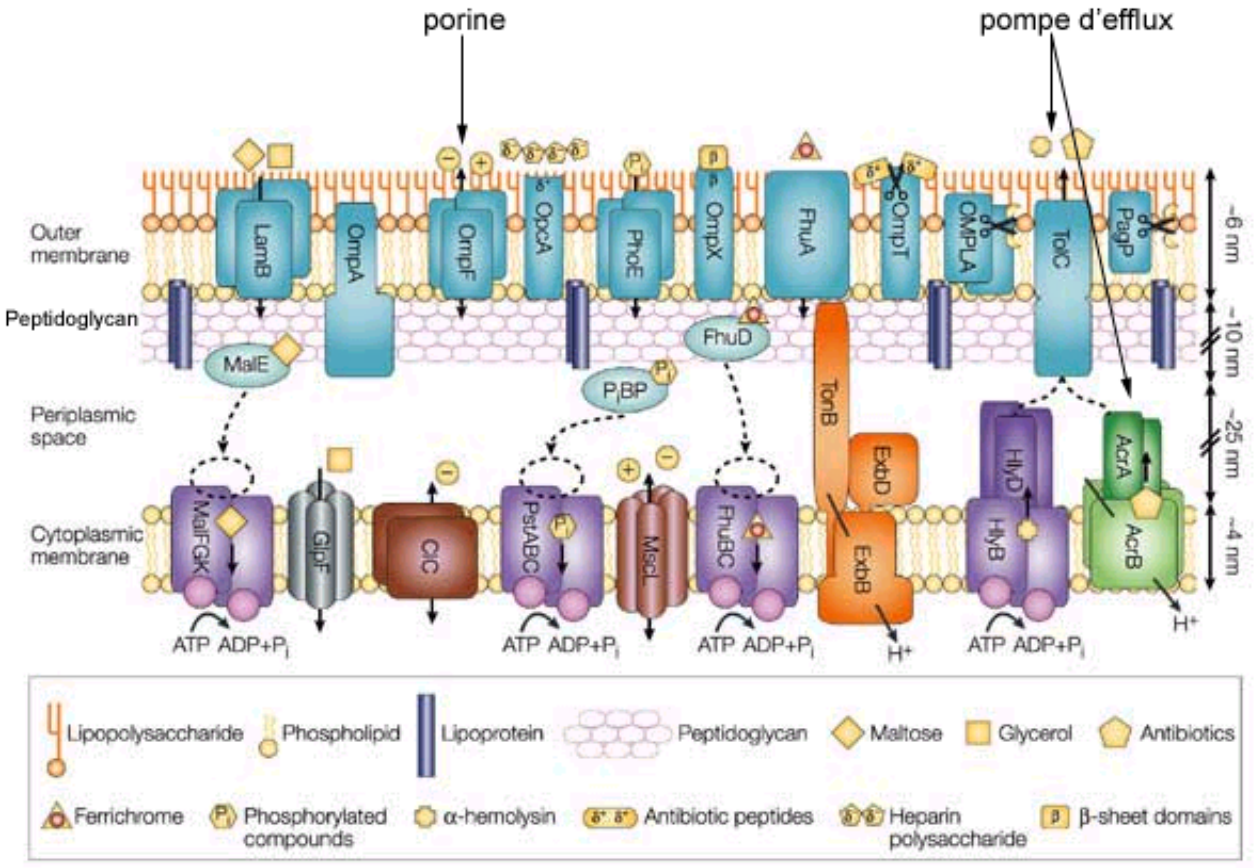


Figure 2 : Organisation schématique de l'enveloppe d'*E. coli*

La membrane externe des bactéries gram-négatives, comme toutes les autres membranes biologiques, est une bicouche lipidique et de ce fait elle est très peu perméable aux composés hydrophiles dont font partie la plupart des nutriments. Elle contient donc des protéines formant des canaux hydrophiles qui assurent l'entrée des substances nutritives, et sans doute aussi l'extrusion des métabolites toxiques. Ces protéines ont pris le terme générique de « porines » et sont présentes en grande quantité dans la membrane externe (figure 2). Il est souvent difficile de déterminer le trajet d' « influx » des antibiotiques. Chez les *Enterobacteriaceae*, l'ensemble des considérations théoriques et des données expérimentales indiquent que les petits antibiotiques hydrophiles (les β-lactamines, les tétracyclines, le chloramphénicol, et les fluoroquinolones) empruntent la voie des porines de haute perméabilité (Nikaido, 2003). D'autres espèces bactériennes, telles que *P. aeruginosa*, produisent des porines de faible perméabilité et sont résistantes à la plupart de ces agents (Hancock & Brinkman, 2002). A l'inverse, les grosses molécules lipophiles, telles que les macrolides, la novobiocine et l'acide fusidique, ont des difficultés pour pénétrer à travers les porines, et diffusent donc très lentement à travers la bicouche lipidique (Nikaido, 2003).

Le rôle de barrière imperméable n'est cependant pas la seule explication rendant compte de la résistance intrinsèque des bactéries gram-négatives. En effet, l'équilibre à travers la membrane externe est atteint très rapidement puisque le rapport surface sur volume est élevé pour une cellule bactérienne. Ainsi, on estime que les concentrations en antibiotiques dans le périplasme atteignent 50 % de leurs concentrations extracellulaires en 10 à 30 secondes pour *P. aeruginosa*, et en un temps encore plus court pour *E. coli* (Nikaido, 1989). Les études récentes mettent en évidence le rôle majeur des pompes d'efflux d'antibiotiques dans la résistance intrinsèque des bactéries gram-négatives (figure 2) (Nikaido, 1998).

2.1.3.2. La résistance par perte ou modification des porines

L'accès réduit aux cibles périplasmiques ou intracellulaires entraîne l'augmentation de la résistance bactérienne et permet aux bactéries de s'adapter à un environnement riche en antibiotiques. La diminution du nombre voire la disparition des porines ainsi que les modifications touchant à l'efficacité du pore représentent une première ligne de défense, à laquelle peuvent s'ajouter d'autres mécanismes de résistance. Dans ce domaine, la littérature fait état de nombreux exemples et trois types de réponses bactériennes s'en dégagent :

(i) le contrôle de l'expression des porines de haute perméabilité pouvant aboutir à la perte de porines,

(ii) le contrôle du type de porine exprimée,

(iii) l'expression de porines mutées de faible perméabilité.

Plusieurs voies de régulation et de facteurs extérieurs interviennent dans le contrôle de la perméabilité membranaire (Pagès, 2004).

Chez *P. aeruginosa*, la résistance intrinsèque aux β-lactamines est associée à l'expression de porines de faible perméabilité (Livermore, 2001 ; Hancock & Brinkman, 2002). Dans cette espèce, les carbapénèmes (imipénème et méropénème) empruntent la porine OprD pour traverser la membrane externe (Trias & Nikaido, 1990a). OprD est porine dite « spécifique » dont la fonction est le transport passif d'acides aminés basiques (Trias & Nikaido, 1990b). Plusieurs études ont permis de relier la résistance acquise à cette classe d'antibiotiques à une diminution de l'expression d'OprD dans des souches isolées *in vivo* et *in vitro* (Trias *et al.*, 1989 ; Kolher *et al.*, 1999 ; Pai *et al.*, 2001 ; Epp *et al.*, 2001). Dans tous les cas, un tel phénotype est apparu alors que les souches étaient en contact avec l'imipénème (antibiothérapie *in vivo* ou sélection *in vitro*).

Chez les *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp.), les porines de type OmpF et OmpC jouent un rôle important dans la résistance aux antibiotiques. Ces deux porines majoritaires sont trimériques, donc très perméables, et sont dites « non-spécifiques » car elles permettent le passage de toute molécule hydrophile d'un poids moléculaire inférieur ou égal à 600 Da (figure 3A). Chez *E. coli*, leur expression est finement régulée en fonction de l'habitat. Le but de cette régulation est clair : OmpF forme des canaux plus larges qu'OmpC (Nikaido & Rosenberg, 1983). Ainsi, les agents toxiques tels que les antibiotiques et les sels biliaires diffusent bien mieux à travers OmpF (Nikaido *et al.*, 1983). Dans l'environnement intestinal, *E. coli* qui se trouve en présence de hautes concentrations en sels biliaires (4-16 mM) va tout faire pour minimiser les dégâts (Borgstrom, 1974). La haute force ionique et la haute température de ce milieu, sont deux conditions qui favorisent la production d'OmpC et répriment la production d'OmpF (Pratt *et al.*, 1996). On assiste au même scénario lorsque la bactérie est au contact des antibiotiques et celui-ci est retrouvé dans toutes les espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* (Gutmann *et al.*, 1985 ; Medeiros *et al.*, 1987 ; Charrel *et al.*, 1996, Martinez-Martinez *et al.*, 1996).

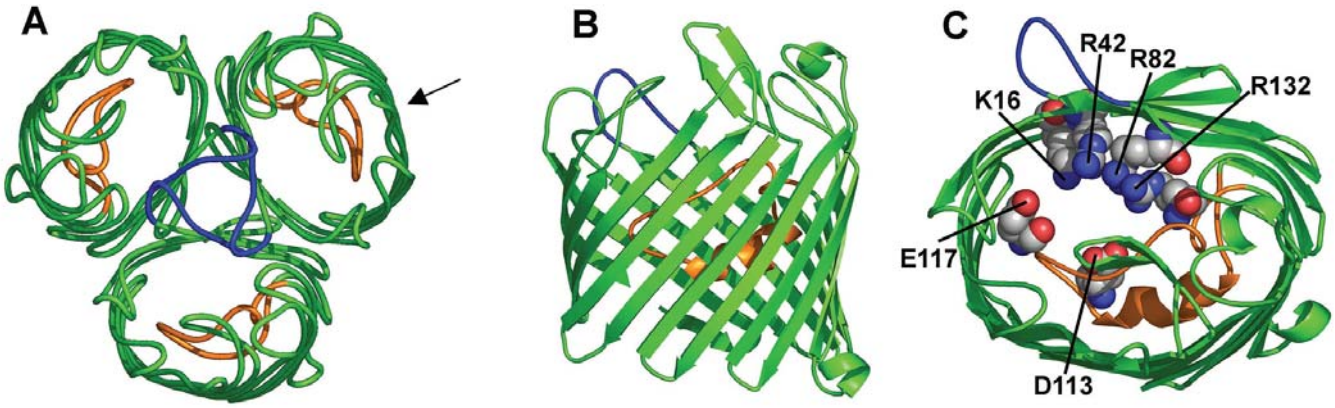


Figure 3 : Structure tridimensionnelle de la porine OmpF d'*E. coli.*

(A) Vue extracellulaire du trimère dans une direction perpendiculaire au plan de la membrane. La boucle L2, en bleu, joue un rôle dans les interactions entre les trois monomères. La boucle L3, en orange, réduit le diamètre intérieur du canal. (B) Vue d'un monomère du coté indiqué par la flèche en A. (C) Vue extracellulaire d'un monomère montrant la région de constriction du canal. Cette région est formée par 2 résidus acides Glu117 et Asp113 de le boucle L3 et 4 résidus basiques en miroir Lys16, Arg42, Arg82 et Arg132. (Nikaido H., Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2003)

Plusieurs études rapportent des modifications du profil d'expression des porines dans des isolats cliniques de *K. pneumoniae* résistants. Cet organisme exprime les porines OmpK35 (homologue d'OmpF d'*E. coli*) et OmpK36 (homologue d'OmpC d'*E. coli*) de façon constitutive. Dans les isolats présentant un haut niveau de résistance aux céphalosporines à large spectre, OmpK35 n'est presque jamais exprimée au profit de OmpK36, dont le canal est plus étroit (Martinez-Martinez *et al.*, 1996, Hernandez-Alles *et al.*, 1999). De façon intéressante, il existe des isolats qui n'expriment aucune de ces deux porines mais qui survivent apparemment en exprimant une porine quiescente dans des conditions standard, OmpK37, dont le pore est encore plus étroit qu'OmpK36 (Domenech-Sanchez *et al.*, 1999).

La perte des porines a des effets délétères sur la survie bactérienne. Aussi, plutôt que perdre leurs porines les bactéries peuvent produire des porines modifiées, présentant une activité canal réduite. Les substitutions identifiées dans les porines d'*E. aerogenes* et *K. pneumoniae* sont intéressantes à la lumière de leur structure tri-dimensionnelle (figure 3C). En 1998, l'équipe de EA2197 a identifié des isolats cliniques d'*E. aerogenes* résistants à de nombreuses β-lactamines et autres antibiotiques (chloramphénicol, tétracycline et fluoroquinolones). Dans ces, isolats la

porine Omp36 est exprimée à un niveau normal mais sa capacité à former des trimères stables est altérée (Malléa *et al.*, 1998). En 2001, une étude détaillée permet d'identifier une substitution localisée à l'intérieur de la boucle L3, qui définit la zone de constriction du canal (figure 3C). Cette mutation a pour conséquence des modifications drastiques du comportement électrophysiologique du canal et est responsable de la diffusion limitée des β-lactamines à travers le pore (Dé *et al.*, 2001). Depuis, la même mutation a été identifiée dans d'autres isolats cliniques d'*E. aerogenes* multirésistants (Thiolas *et al.*, 2004). Avec l'usage large d'antibiotiques résistants à la dégradation par les β-lactamases, on peut s'attendre à ce que ce genre de mutation avantageuse soit de plus en plus fréquent en clinique.

2.1.3.3. La résistance par efflux

Ce sont les travaux de Stuart Levy sur la résistance aux tétracyclines qui ont mis en évidence pour la première fois la capacité d'*E. coli* à expulser ces antibiotiques hors de la cellule *via* les protéines Tet (passées en revue dans Levy, 1992). Depuis, plusieurs pompes d'efflux ont été identifiées et caractérisées dans de nombreuses bactéries (Li & Nikaido, 2004). Du fait de leur large spécificité de substrat, les pompes d'efflux jouent un rôle essentiel dans la résistance intrinsèque des bactéries gram-négatives et leur surexpression entraîne l'apparition d'un phénotype multirésistant de niveau élevé.

Chez les bactéries gram-négatives, la grande majorité des systèmes d'efflux décrits présentent une organisation commune à trois composants (figure 2). Les systèmes AcrAB-TolC chez *Escherichia coli* et MexAB-OprM chez *Pseudomonas aeruginosa* en sont les représentants les plus étudiés, et sont responsables de la multirésistance dans ces espèces (Ma *et al.*, 1993 ; Poole *et al.*, 1993b ; Li *et al.*, 1995 ; Fralick, 1996 ; Okusu *et al.*, 1996). Le transporteur localisé dans la membrane interne (AcrB, MexB) forme un complexe tripartite avec une protéine périplasmique ancrée dans la membrane interne (AcrA, MexA) et une protéine canal localisée dans la membrane externe (TolC, OprM). Une telle organisation traverse les deux membranes, et facilite ainsi le passage des substrats directement du cytoplasme et/ou du périplasme vers le milieu extracellulaire (figure 2). L'efflux direct des antibiotiques dans le milieu extérieur est un avantage non-négligeable pour les bactéries gram-négatives car pour re-pénétrer dans les cellules les antibiotiques se heurtent de nouveau à la membrane externe. Ainsi, l'efflux agit en synergie avec la faible perméabilité membranaire, assurant un haut niveau de résistance intrinsèque ou acquise .

L'efflux d'antibiotiques est un mécanisme actif qui consomme l'énergie de la force proton-motrice. Ainsi, la présence d'un efflux actif peut être déterminée en comparant le niveau

d'accumulation d'un antibiotique radiomarqué en présence et en absence d'un agent découplant énergétique (carbonyl cyanure *m*-chlorophenylhydrazone ou CCCP). Dans deux études, cette méthode a permis au laboratoire de mettre en évidence la présence d'un efflux actif dans plusieurs isolats cliniques d'*E. aerogenes* présentant un phénotype de multirésistance aux antibiotiques (β-lactamines, mais aussi chloramphénicol, tétracycline, fluoroquinolones et aminoglycosides) (Malléa *et al.*, 1998 ; Gayet *et al.*, 2003). Les loci *acrAB* et *tolC* d'*E. aerogenes* ont récemment été clonés et séquencés au laboratoire, et nous avons montré que la surexpression de la pompe AcrAB-TolC contribuait à la multirésistance d'un isolat clinique. Les protéines AcrA, AcrB et TolC d'*E. aerogenes* présentent plus de 80 % d'identité de séquence avec leurs homologues respectifs chez *E. coli*, ce qui suggère une organisation membranaire similaire (Pradel & Pagès, 2002). L'ensemble de ces résultats montre que la résistance par efflux est un mécanisme utilisé par *E. aerogenes* pour résister aux antibiotiques bien qu'il soit encore difficile d'en évaluer la prévalence en clinique (les études sur plusieurs isolats cliniques sont en cours de réalisation au laboratoire).

2.2. Les facteurs favorisant la (multi)résistance

L'émergence de la multirésistance aux antibiotiques est sans aucun doute le problème majeur de notre relation actuelle avec les bactéries. Pourtant la résistance bactérienne n'a rien de nouveau : depuis des millénaires d'existence, les bactéries sont confrontées à des molécules toxiques qui menacent leur survie et ont développé des parades contre ces agressions. Ce qui est nouveau en revanche, c'est que nous réalisons aujourd'hui la facilité avec laquelle les bactéries expriment et disséminent les facteurs de résistance.

L'émergence de la multirésistance bactérienne aux antibiotiques résulte de plusieurs facteurs tenant aussi bien du comportement de l'homme que de l'adaptation de la bactérie. Face aux doses croissantes d'antibiotiques administrées au cours de ces 60 dernières années, les bactéries ont répondu en déployant tout un arsenal de mécanismes de défense (cf. section 2.1). En milieu hospitalier, la pression de sélection exercée par l'utilisation excessive d'antibiotiques à large spectre est telle qu'elle favorise la colonisation des patients par les souches les plus résistantes, puis leur propagation. De plus, la dissémination des gènes de résistance entre les espèces bactériennes *via* des éléments génétiques mobiles amplifie ce problème. Enfin, avec l'accroissement du nombre de patients immunodéprimés et l'allongement des séjours de ces patients, les microorganismes opportunistes sont devenus de véritables pathogènes « spécialisés » envers les personnes les plus vulnérables.

Les traitements antibiotiques à long-terme représente une opportunité pour analyser l'évolution phénotypique d'isolats cliniques individuels *in vivo*. De telles études permettent ainsi d'étudier l'influence des prescriptions sur l'apparition de la multirésistance. Cependant ces investigations sont rares du fait de la dimension éthique et des problèmes techniques qui leurs sont associés. L'équipe EA2197 a obtenu des résultats intéressants en observant *a posteriori* l'impact d'un traitement à l'imipénème sur des isolats d'*E. aerogenes* recueillis sur plusieurs patients sur une période de 2 à 9 semaines. Le typage épidémiologique de ces isolats au cours du temps a tout d'abord révélé qu'ils appartenaient tous au clone prévalent en France précédemment décrit (Bosi *et al.*, 1999). Tous étaient également producteurs de la β-lactamase TEM-24 et l'imipénème était donc la seule alternative thérapeutique. Sensibles en début de traitement, tous ces isolats ont finalement développé une résistance à l'imipénème en cours de traitement, puis ont retrouvé leur sensibilité en quelques jours après l'arrêt du traitement. Une observation importante concernait la variation de la production de la porine majoritaire Omp36 pendant l'antibiothérapie. En effet, cette étude a montré une forte corrélation entre la présence d'Omp36 et la sensibilité aux β-lactamines dans ces isolats : la perte d'Omp36 était toujours associée à un phénotype résistant et inversement (Bornet *et al.*, 2000b). Ces données montrent clairement que le traitement antibiotique peut sélectionner ou favoriser l'émergence d'un phénotype résistant à partir d'une souche préexistante sensible, et cela de façon très rapide.

3. L'efflux actif : un mécanisme ubiquitaire à l'origine de la multirésistance

3.1. Distribution et classification phylogénique des transporteurs d'efflux

Toutes les cellules procaryotes et eucaryotes renferment une panoplie de transporteurs dans leur membrane cytoplasmique assurant des fonctions vitales telles que l'import de nutriments, l'expulsion des substances toxiques, de facteurs de virulence, de signaux effecteurs et la maintenance de l'homéostasie cellulaire. La littérature rapporte l'identification d'un nombre croissant de tels systèmes de transport, notamment grâce aux facilités de clonage et de séquençage actuelles.

L'activité de nombreux systèmes de transport confère une résistance vis-à-vis de composés toxiques, à la fois chez les bactéries et les eucaryotes. Par exemple, la résistance des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques anti-tumoraux est généralement due à l'activité d'efflux de la P-glycoprotéine. De même, chez les bactéries, la résistance aux antibiotiques et aux antiseptiques résulte de l'action de pompes membranaires qui expulsent ces composés hors des cellules.

Les transporteurs d'efflux peuvent être classés sur la base de trois critères principaux. Tout d'abord l'analyse comparative de la séquence primaire de ces transporteurs a permis leur regroupement en plusieurs familles ou superfamilles distinctes (http://www.biology.ucsd.edu/~msaier/transport/). A ce jour, cinq familles de pompes d'efflux ont été décrites : la superfamille *ATP-binding cassette* (ABC) (Higgins, 2001), la superfamille *major facilitator* (MF) (Saier *et al.*, 1999), la famille *small multidrug resistance* (SMR) (Chung *et al.*, 2001), la famille *multidrug and toxic compound extrusion* (MATE) (Brown *et al.*, 1999) et la famille *resistance-nodulation-cell division* (RND) (Saier *et al.*, 1994 ; Zgurskaya & Nikaido, 2000b). L'organisation membranaire de ces familles de pompes diffère selon qu'elles permettent l'efflux à travers une ou deux membranes (Nikaido, 1996). Cela paraît évident pour les bactéries gram-positives, qui ne sont enveloppées que d'une seule membrane, mais les deux arrangements existent chez les bactéries gram-négatives. Les pompes d'efflux de la famille SMR ne fonctionnent qu'avec un seul composant : le transporteur localisé dans la membrane interne (figure 4). Au contraire, les pompes appartenant aux familles ABC, MF, MATE et RND catalysent l'efflux à travers les membranes interne et externe en une seule étape, sans intermédiaire périplasmique. Dans ce cas, les transporteurs s'assemblent avec deux protéines supplémentaires : une protéine canal localisée dans la membrane externe et une protéine adaptatrice localisée dans le périplasme (figure 4). L'efflux est un mécanisme actif ; et on distingue deux types de transporteurs, primaires ou secondaires, selon qu'ils l'hydrolysent de l'ATP ou utilisent la force proton-motrice (gradient électrochimique transmembranaire de protons) comme source d'énergie. Chez les bactéries, la grande majorité des transporteurs identifiés et ayant une relevance clinique sont des transporteurs secondaires (figure 4) (Paulsen *et al.*, 1996 ; Nikaido, 1998). Cette prédominante est claire chez *E. coli* : sur les 37 transporteurs d'efflux putatifs identifiés dans cet organisme, seuls 7 sont de type ABC (Nishino & Yamaguchi, 2001). Enfin, nous pouvons différencier les transporteurs d'efflux selon leur spécificité de substrats. Les études pionnières de Stuart Levy dans les années 70 sur la résistance aux tétracyclines ont mis en évidence les protéines Tet capables d'expulser cette seule classe d'antibiotiques (Levy, 1992). A l'inverse, on identifie aujourd'hui un nombre croissant de pompes d'efflux capables d'expulser un large spectre de substances toxiques (multiples colorants, détergents, solvants, antibiotiques…) ne présentant aucune caractéristique structurale commune (Nikaido, 1998).

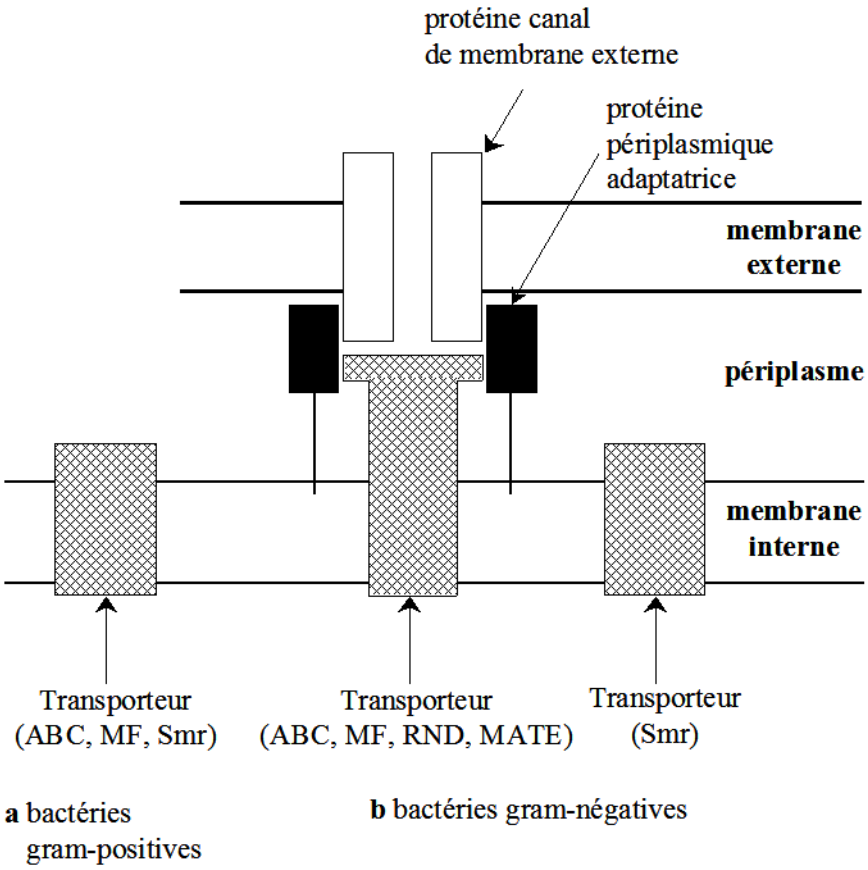


Figure 4 : Illustrations schématiques des différentes familles de pompes d'efflux.

3.1.1. La superfamille « ATP Binding Cassette » (ABC)

Cette superfamille présente une distribution ubiquitaire parmi tous les organismes vivants et regroupe actuellement plus de 30 familles de transporteurs (Saier, 1998). Les transporteurs ABC assurent, de façon spécifique ou non, le transport vital (import ou export) de molécules très variées telles que des sucres, des ions, des acides aminés, des complexes liés au fer et même des protéines (Higgins, 2001). Dans tous les cas, c'est l'ATP qui fournit l'énergie nécessaire au transport.

Les transporteurs ABC sont constitués par l'assemblage d'une protéine intégrale de membrane contenant 6 segments transmembranaires (TMS : *transmembrane segments*) en hélices α et d'une protéine fixant l'ATP localisée sur la face cytoplasmique de la membrane. Ces deux protéines peuvent être liées de façon non-covalente, ou covalente par l'intermédiaire d'une chaîne polypeptidique. Le système complet s'organise en dimère et contient alors 12 TMS. Alors que chez les eucaryotes les deux domaines sont fusionnés en une seule protéine codée par un seul gène, chez les procaryotes, les sous-unités sont codées par plusieurs gènes puis s'assemblent dans la membrane (Higgins, 2001).

Les systèmes d'efflux de type ABC ne sont pas vraiment répandus chez les bactéries, mais on peut citer par exemple le transporteur LmrA de *Lactobacillus lactis* (Bolhuis *et al.*, 1996) et la pompe MacAB d'*E. coli* spécifique de l'efflux des macrolides (Kobayashi *et al.*, 2001).

3.1.2. La superfamille « Major Facilitator » (MF)

Cette superfamille de transporteurs est retrouvée des bactéries jusqu'aux eucaryotes supérieurs ; elle assure le symport, l'antiport et l'uniport de nombreux substrats tels que des sucres, des intermédiaires de cycle de Krebs, des esters de phosphate, des oligosaccharides et des antibiotiques (Saier *et al.*, 1999). L'énergie nécessaire au transport est fournie par la force proton-motrice (FPM). Dans cette superfamille, les transporteurs d'antibiotiques peuvent être séparés en deux familles ou clusters selon qu'ils contiennent soit 12 soit 14 TMS. Les transporteurs spécifiques d'une classe d'antibiotiques et les transporteurs non-spécifiques se répartissent indifféremment dans ces deux familles, suggérant des mécanismes de reconnaissance et de fonctionnement similaires (Paulsen *et al.*, 1996). Les transporteurs spécifiques de la famille MF sont surtout impliqués dans la résistance aux tétracyclines et au phénicolés, respectivement les protéines Tet et FloR chez les entérobactéries (passées en revue dans Levy, 1992). Un grand nombre de pompes d'efflux de type MF conférant un phénotype de multirésistance ont été identifiées dans diverses bactéries. Les exemples les plus étudiés proviennent de bactéries gram-positives tels que la pompe NorA à 12 TMS chez *Staphylococcus aureus* et ses homologues Bmr et Blt chez *Bacillus subtilis*, et la pompe QacA à 14 TMS chez *S. aureus* (passées en revue dans Paulsen *et al.*, 1996 ; Li & Nikaido, 2004).

Les transporteurs d'efflux de type MF fonctionnent habituellement comme des pompes à composant unique (e.g. NorA et QacA chez *S. aureus* ; les protéines Tet chez *E. coli*) mais, chez les bactéries gram-négatives, certaines s'associent avec une protéine périplasmique et une protéine de membrane externe pour former des pompes d'efflux à trois composants (e.g. EmrAB-TolC chez *E. coli*) (Lomoskaya & Lewis, 1992).

Les analyses de séquences par alignements multiples ont révélé des caractéristiques intéressantes. Tout d'abord, des similarités de séquences significatives ont été observées entre les moitiés N et C-terminales des transporteurs à 12 TMS. Ces homologies internes suggèrent que cette famille a évolué par duplication à partir d'un gène ancestral à 6 TMS (Paulsen & Skurray, 1993). De telles observations sont beaucoup moins évidentes pour la famille des transporteurs à 14 TMS. De plus, le taux de conservation est beaucoup plus élevé entre les moitiés N-terminales qu'entre les moitiés C-terminales. Etant donné la large spécificité de substrats des transporteurs, il a donc été proposé que les régions N et C-terminales étaient

respectivement impliquées dans la translocation des protons et dans la reconnaissance des substrats (Griffith *et al.*, 1992). Ces analyses ont également mis en évidence plusieurs motifs conservés, signatures caractéristiques de chaque cluster de la superfamille. En particulier Paulsen et Skurray ont identifié deux motifs (A et B) conservés parmi tous les transporteurs de type MF, un motif (C) spécifique des transporteurs d'antibiotiques et enfin plusieurs motifs (de D à G) dont certains sont exclusifs au cluster des transporteurs à 12 TMS et d'autres au cluster des transporteurs à 14 TMS. La conservation de ces motifs suggère qu'ils jouent des rôles structuraux et/ou fonctionnels importants au sein de chaque cluster (Paulsen & Skurray, 1993). Cela a été démontré par plusieurs expériences de mutagenèse dirigée. Au contraire, aucun de ces motifs ne semblent être impliqués dans la discrimination des substrats.

3.1.3. La famille « Multidrug And Toxic compound Extrusion » (MATE)

Les transporteurs de la famille MATE présentent une topologie membranaire similaire à celle des transporteurs de la superfamille MF, mais ne montrent aucune homologie de séquence avec ces derniers (Brown *et al.*, 1999). Très peu de transporteurs de cette famille ont été identifiés et caractérisés à ce jour. Les protéines NorM chez la bactérie marine *Vibrio parahaemolyticus* et YdhE chez *E. coli* leur confèrent une résistance multiple vis-à-vis des colorants cationiques, des aminoglycosides et des fluoroquinolones. Ces deux transporteurs fonctionnent grâce au gradient électrochimique de sodium (Morita *et al.*, 1998).

3.1.4. La famille « Small Multidrug Resistance » (SMR)

Les transporteurs de la famille SMR sont des antiporteurs d'antibiotiques énergisés par la FPM. Ce sont de petites protéines membranaires d'environ 110 résidus d'acides aminés, contenant seulement 4 TMS et qui fonctionnent sous forme tétramérique (Ma *et al.*, 2004). Quelques membres de cette famille ont été caractérisés, comme par exemple les protéines Smr chez *S. aureus* (Grinius *et al.*, 1992) et EmrE chez *E. coli* (Schuldiner *et al.*, 1997). La gamme de leurs substrats est restreinte aux composés cationiques lipophiles dont font partie certains antiseptiques, désinfectants, colorants tels que bromure d'éthidium et quelques antibiotiques tels que l'érythromycine et la tétracycline.

3.1.5. La superfamille « Resistance/Nodulation/Cell division » (RND)

Cette superfamille compte au moins 7 familles distinctes de transporteurs. Initialement considérés comme spécifiques des bactéries, les transporteurs RND sont également présents chez les eucaryotes (Saier, 1994 ; Tseng *et al.*, 1999). Leur activité est énergisée par la FPM.

Les pompes d'efflux de type RND sont très répandues parmi les bactéries gram-négatives et représente la famille la plus documentée. Les transporteurs RND se caractérisent par une très large spécificité de substrats (figure 5). Ainsi, chez les bactéries gram-négatives, l'expression constitutive de certaines pompes d'efflux de type RND participe à la résistance intrinsèque. Lorsque leur taux d'expression est augmenté, à la suite d'une mutation génétique ou de l'induction d'une cascade de régulation, elles peuvent engendrer une multirésistance de haut niveau vis-à-vis de nombreux antibiotiques utilisés en clinique (Nikaido, 1998). Les transporteurs RND sont de grandes protéines d'environ 1000 résidus d'acides aminés et présentent une topologie membranaire inhabituelle contenant 12 TMS et deux larges boucles périplasmiques entre les TMS 1-2 et 7-8 (Zgurskaya & Nikaido, 2000b). Toutes les pompes d'efflux contenant un transporteur RND présentent une organisation transmembranaire commune. Le transporteur, localisé dans la membrane interne, forme un complexe tripartite avec une protéine périplasmique ancrée dans la membrane interne, et une protéine canal, localisée dans la membrane externe. Dans la plupart des cas, les gènes codant chaque composant de la pompe sont organisés sous forme d'opéron et leur transcription est sous le contrôle d'un promoteur unique. Des preuves biochimiques attestent aussi de cet assemblage à trois composants. Grâce à cette organisation, les antibiotiques peuvent être expulsés directement du cytoplasme et/ou du périplasme dans le milieu extracellulaire. Les protéines AcrB (membre du système AcrAB-TolC) chez *E. coli* et MexB (membre du système MexAB-OprM) chez *P. aeruginosa* sont les représentants les plus étudiés, et sont responsables de la multirésistance dans ces espèces.

Dans la suite de ce manuscrit, nous nous concentrerons surtout sur les pompes d'efflux des bactéries gram-négatives en prenant comme exemples *E. coli* et *P. aeruginosa*. En particulier, nous insisterons sur les composants, le mécanisme d'action, la régulation et l'importance en clinique des pompes de la famille RND.

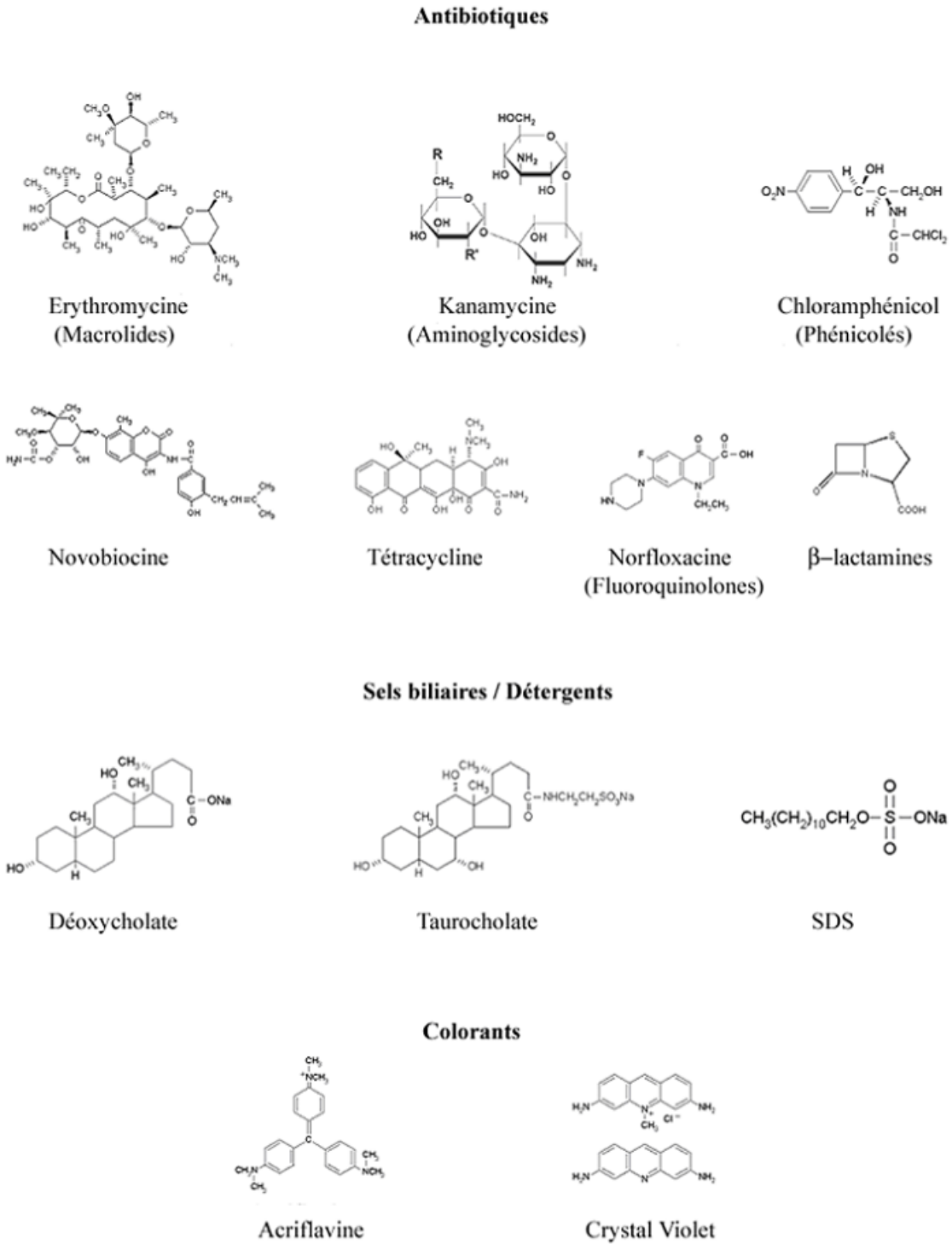


Figure 5 : Quelques substrats représentatifs des pompes d'efflux de type RND.

Les substrats des pompes d'efflux de type RND ne présentent aucune caractéristique structurale commune. Ils sont lipophiles ou amphiphiles, à l'exception des aminoglycosides et des β-lactamines. Ces molécules ont été définies comme substrats après détermination de leur concentration minimale inhibitrice sur des mutants surexprimant ou délétés d'une pompe d'efflux.

3.2. Pompes d'efflux chez *Escherichia coli* et autres entérobactéries

Les sels biliaires sont de puissants détergents synthétisés par le foie et sécrétés dans la bile afin d'aider la digestion enzymatique des graisses dans la lumière duodénale. Capables de désorganiser la structure en bicouche lipidique des membranes cellulaires, ces détergents sont nocifs pour tout type de cellules. Les entérobactéries, telles qu'*E. coli*, dont l'habitat naturel est justement le duodenum, doivent tolérer de fortes concentrations en sels biliaires pouvant atteindre 20 mM (Borgstrom, 1974). En effet, *E. coli* et les autres entérobactéries, présentent un haut niveau de résistance vis à vis des sels biliaires, et cette propriété est utilisée en pratique pour leur enrichissement sélectif sur agar MacConkey (contenant 1,5 % de sels biliaires). D'une part, la membrane externe joue son rôle de barrière imperméable contre la diffusion des sels biliaires. D'autre part, les pompes d'efflux exportent activement les sels biliaires hors des cellules.

Le génome d'*E. coli* comprend au moins 37 gènes codant des transporteurs d'efflux caractérisés ou putatifs : 7 ABC, 19 MFS, 1 MATE, 5 SMR et 7 RND (Nishino & Yamaguchi, 2001). Malgré ce nombre important, la pompe AcrAB-TolC de type RND joue un rôle prédominant dans la multirésistance de cet organisme (Nikaido, 1998).

En 1965, Nakamura isole des mutants *acr* d'*E. coli* hypersensibles aux colorants (comme l'acriflavine, d'où le nom *acr*), aux détergents et à de nombreux antibiotiques, dont les structures et les cibles cellulaires sont différentes (Nakamura, 1965). Ce phénotype pléiotrope rend compte du rôle majeur du locus *acr* dans la résistance intrinsèque d'*E. coli*. En 1993, Ma et coll. ont cloné le locus *acr* par complémentation fonctionnelle (Ma *et al.*, 1993). Les analyses de séquences ont montré la présence de deux gènes *acrA* et *acrB*, organisés en un seul opéron. *acrA* code une lipoprotéine périplasmique ancrée dans la membrane interne par sa portion lipidique N-terminale et *acrB* code une protéine intégrale de la membrane interne à 12 STM. De même que les mutants *acr*, les mutants *tolC* d'*E. coli* sont hypersensibles à de nombreux agents hydrophobes. AcrAB fonctionne avec la protéine TolC, localisée dans la membrane externe, pour former le complexe transmembranaire tripartite (Fralick, 1996). TolC est une protéine minoritaire de la membrane externe d'*E. coli* mais elle est multi-fonctionnelle, commune à de nombreux systèmes de transport (Koronakis, 2004). A ce jour, la pompe AcrAB-TolC d'*E. coli* est la plus étudiée. Des homologues de ce système ont été identifiés chez d'autres bactéries gram-négatives, telles qu'*E. aerogenes*, *Haemophilus influenzae* et *Salmonella enterica* serovar typhimurium (passées en revues dans Li & Nikaido, 2004). Dans tous les cas, ce système révèle une large spécificité de substrats, incluant la plupart des antibiotiques utilisés en clinique. Exprimé de façon constitutive, le système AcrAB-TolC est responsable de la résistance

intrinsèque d'*E. coli* vis-à-vis des grosses molécules hydrophobes, telles que l'érythromycine, l'acide fusidique, les colorants et les détergents, qui ont des difficultés à pénétrer par les porines (Ma *et al.*, 1995). Lorsqu'il est surexprimé, ce système entraîne des niveaux de résistance élevés vis à vis des antibiotiques de petite taille, tels que les fluoroquinolones, les tétracyclines et le chloramphénicol, capables de diffuser à grande vitesse à travers les canaux des porines (Okusu *et al.*, 1996).

D'autres systèmes d'efflux de type RND ont été caractérisés chez *E. coli*, tels que AcrEF, AcrD et YhiUV. Tous requièrent TolC comme canal de membrane externe (Nishino & Yamaguchi, 2001). L'inactivation de *acrEF* ou de *yhiUV* n'a pas d'influence sur le profil de résistance d'une souche d'*E. coli* sauvage cultivée dans des conditions standard de laboratoire, indiquant que ces transporteurs ne sont pas ou peu exprimés (Nishino & Yamaguchi, 2001 ; Sulavick *et al.*, 2001). Néanmoins, des mutants *acrAB* d'*E. coli* surexprimant AcrEF présentent un phénotype de multirésistance, similaire à celui de la souche sauvage $AcrAB^+$ (Xu *et al.*, 1993, données non-publiées). *acrD* n'est pas associé à un gène codant une protéine périplasmique partenaire. AcrD fonctionne avec AcrA et TolC, et confère une résistance spécifique aux aminoglycosides, un groupe d'antibiotiques très hydrophiles, ainsi qu'à une variété limitée de composés amphiphiles tels que le SDS, le déoxycholate et la novobiocine (Rosenberg *et al.*, 2000).

3.3. Pompes d'efflux chez *Pseudomonas aeruginosa* et autres bactéries non-fermentatives

P. aeruginosa est un pathogène opportuniste notoire, première cause d'infections pulmonaires chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose. *P. aeruginosa* se caractérise par un haut niveau de résistance intrinsèque vis à vis de nombreux agents antibactériens, dont la plupart des β-lactamines, les tétracyclines, le chloramphénicol et les fluoroquinolones. Ce phénotype est associé à une très faible perméabilité membranaire et à un efflux actif (Hancock & Speert, 2000).

L'analyse du génome de cette bactérie indique la présence d'au moins 12 gènes codant un transporteur d'efflux RND (Stover *et al.*, 2000). A ce jour, six systèmes d'efflux de type RND ont été identifiés et caractérisés : MexAB-OprM (Li *et al.*, 1995), MexCD-OrpJ (Poole *et al.*, 1996), MexEF-OprN (Kohler *et al.*, 1997), MexXY-OprM (Mine *et al.*, 1999), MexJK-OprM (Chuanchuen *et al.*, 2002) et MexGHI-OpmD (Aendekerk *et al.*, 2002). Chacun est codé par un opéron et contient un transporteur RND (MexB, MexD, MexF, MexY, MexK ou MexI) localisé dans la membrane interne ; une protéine canal (OprM, OprJ, OprN ou OpmD) localisée dans la

membrane externe ; et une protéine dite adaptatrice (MexA, MexC, MexE, MexX, MexJ ou MexH) localisée dans le périplasme. OprM, comme son homologue TolC chez *E. coli*, est capable de fonctionner avec plusieurs partenaires : MexAB (Li *et al.*, 1995), MexXY (Mine *et al.*, 1999) et MexJK (Chuanchuen *et al.*, 2002). Ceci confirme l'observation selon laquelle OprM est capable de conduire un efflux d'antibiotiques en l'absence de MexAB. De plus, OprM peut fonctionnellement remplacer OprJ, du système MexCD-OprJ, et OprN, du système MexEF-OprN, sans affecter le profil des substrats pris en charge (Gotoh *et al.*, 1998 ; Maseda *et al.*, 2000).

Le système MexAB-OprM a été initialement décrit comme responsable de la sécrétion d'un sidérophore, la pyoverdine, avant d'être impliqué dans la résistance aux antibiotiques (Poole *et al.*, 1993a ; Poole *et al.*, 1993b, Li *et al.*, 1994 ; Li *et al.*, 1995). Le système MexAB-OprM est exprimé de façon constitutive dans les cellules sauvages et surexprimé dans les mutants *nalB* et *nalC*, sélectionnés *in vivo* ou *in vitro*, multirésistants vis-à-vis de la plupart des antibiotiques (Masuda *et al.*, 1992 ; Ziha-Zarifi *et al.*, 1999). Ce système est très conservé parmi les souches d'origine clinique ou environnementale de *P. aeruginosa*, ce qui indique son rôle majeur dans la résistance naturelle de cet organisme. Le système MexXY-OprM confère une résistance aux fluoroquinolones et aux macrolides lorsqu'il est exprimé dans l'hôte hétérologue *E. coli*, alors que chez *P. aeruginosa* il est responsable de la résistance naturelle aux aminoglycosides (Mine *et al.*, 1999 ; Aires *et al.*, 1999). Les systèmes MexCD-OprJ et MexEF-OprN ne sont pas exprimés dans des souches sauvages de *P. aeruginosa* cultivées dans des conditions standard de laboratoire, mais sont respectivement surexprimés dans les mutants *nfxB* et *nfxC* multirésistants (Poole *et al.*, 1996 ; Kolher *et al.*, 1997 ; Kohler *et al.*, 1999b ; Masuda *et al.*, 2000). Les mutants de type *nfxB* sont résistants aux quinolones, au chloramphénicol, à la tétracycline et aux céphalosporines de 4ème génération (céfépime et cefpirome) mais restent en général sensibles à la plupart des autres β-lactamines. Les mutants de type *nfxC* présentent une résistance élevée vis-à-vis des quinolones, du chloramphénicol et du triméthoprime. Le phénotype *nfxC* est également associé à une résistance à l'imipénème, résultant d'une diminution coordonnée de l'expression de la porine OprD (Kohler *et al.*, 1999a). La multirésistance de haut niveau observée dans les mutants *nalB*, *nalC*, *nfxB* et *nfxC* résulte de mutations dans des gènes de régulation contrôlant l'expression des systèmes d'efflux.

Des homologues des pompes Mex ont été décrits dans d'autres bactéries non-fermentatives, telles que *Pseudomonas putida*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Acitobacter baumanii* et *Burkholderia* spp (passées en revues dans Li & Nikaido, 2004).

3.4. Les protéines des pompes d'efflux tripartites

Les structures tridimensionnelles (3D) des trois partenaires constituant une pompe d'efflux de type RND sont maintenant connues. Ces structures nous permettent de mieux comprendre les mécanismes de fonctionnement et l'assemblage des pompes d'efflux chez les bactéries gram-négatives.

3.4.1. Le canal de membrane externe

Les mutants *tolC* d'*E. coli* présentent un phénotype pléiotrope, dont une sensibilité (ou tolérance) à la colicine E1 (Nagel de Zwaig & Luria, 1967 ; Davies & Reeves, 1975) et au bactériophage TLS (German & Misra, 2001), une résistance aux agents toxiques de l'environnement (Whitney, 1970 ; Fralick & Burns-Keliher, 1994) et un défaut de sécrétion de facteurs de virulence (Wandersman & Delepaire, 1990 ; Hwang *et al.*, 1997 ; Yamanaka *et al.*, 1998). Alors que la tolérance illustre l'utilisation de TolC par la colicine et le phage comme récepteur de surface, les autres phénotypes reflètent le rôle central de TolC dans l'export d'une large gamme de molécules hors des cellules. Identifiées dans la plupart des bactéries gram-négatives, les protéines de la famille TolC interviennent dans la composition des systèmes de sécrétion de type I (tels que le système de sécrétion de l'hémolysine α HlyBD-TolC chez *E. coli*) ou des systèmes d'efflux d'antibiotiques. TolC est donc une protéine clé à la fois dans le développement de la multirésistance bactérienne aux antibiotiques et dans la survie des bactéries pathogènes au cours du processus d'infection. Dans cette section, nous discuterons en détail de la structure de la protéine TolC d'*E. coli* et de ses caractéristiques fonctionnelles.

3.4.1.1. Structure tri-dimensionnelle de TolC

Les expériences en microscopie électronique et les analyses de séquence suggéraient que TolC formait un pore par l'assemblage de trois monomères et contenait une large portion extra-membranaire (Koronakis *et al.*, 1997 ; Johnson & Church, 1999). La résolution de sa structure 3D par cristallographie aux rayons X confirme cette originalité. L'homotrimère TolC se présente comme un cylindre en forme de canon d'une longueur de 140 Å (Koronakis *et al.*, 2000). Il comprend un tonneau β de 40 Å de long (le domaine canal) perçant la membrane externe, qui se prolonge par un tonneau α (le domaine tunnel) s'étendant sur 100 Å à travers le périplasme (figure 6A). Un troisième domaine α/β forme une ceinture autour de la partie équatoriale du tunnel. Le cylindre est ouvert à son extrémité distale (extracellulaire) avec un diamètre intérieur

d'environ 20 Å et se restreint progressivement jusqu'à l'extrémité proximale (périplasmique) pour atteindre seulement 4 Å de diamètre (figure 6B).

Le domaine canal ancre TolC dans la membrane externe. Il consiste en 12 brins β arrangés de façon antiparallèle pour former un tonneau β. Alors que les tonneaux β sont caractéristiques des protéines de la membrane externe, l'architecture du canal de TolC est fondamentalement différente de celle des autres porines puisque ici les trois monomères s'assemblent en un tonneau unique, chacun apportant 4 brins β (figure 6A et C). L'intérieur du canal est également différent : il est environ 15 fois plus large que celui de la porine OmpF et ne contient ni boucle ni bouchon interne qui pourrait réduire son diamètre. Les petites boucles extracellulaires, deux par monomères, sont très flexibles et constituent les sites d'interaction avec la colicine E1 et le bactériophage TLS.

Le domaine tunnel, entièrement constitué d'hélices α, s'étend sur 100 Å dans le périplasme et représente plus de 80 % de la chaîne peptide de TolC. Le tonneau α périplasmique est constitué de 12 brins en hélices α, 4 de chaque monomère (2 longues hélices continues et 2 paires de petites hélices), arrangées de façon antiparallèle. Cette structure est unique, et les principes structuraux qui expliquent comment ces hélices sont maintenues ont été expliqués (Koronakis *et al.*, 2000 ; Calladine *et al.*, 2001 ; Sharff *et al.*, 2001). Dans la moitié supérieure du tunnel, les hélices sont situées à la surface du cylindre et maintiennent un diamètre constant de 20 Å. En revanche, dans la moitié inférieure du tunnel, 3 paires d'hélices (H7 et H8 dans chaque monomère) s'incurvent vers l'intérieur du cylindre, dans un arrangement particulier dit en « *coiled-coil* » (traduisez « rouleau enroulé »), et resserrent son diamètre à son extrémité proximale (figure 6A et C). L'entrée périplasmique constitue la seule zone de constriction du pore TolC. Pendant le processus de transport, cette constriction doit donc se dilater pour permettre le passage des molécules, qui peuvent atteindre une taille de 160 kDa dans le cas de l'hémolysine α.

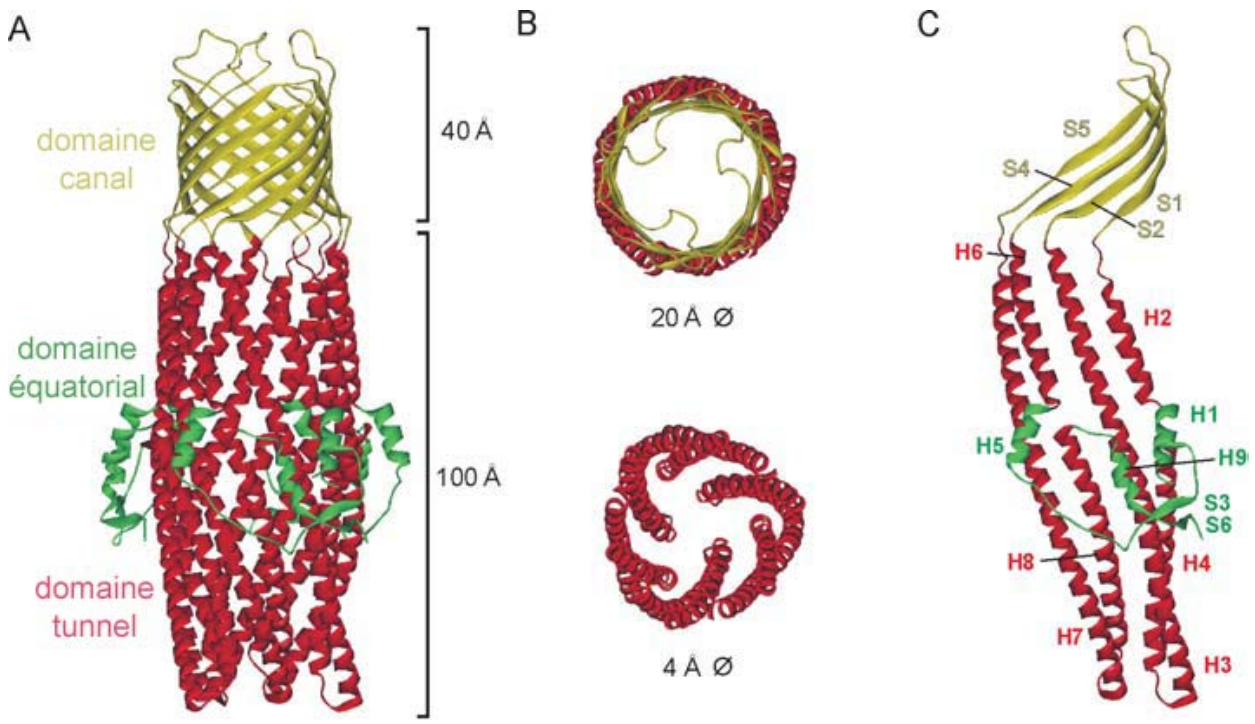


Figure 6 : Structure tridimensionnelle de la protéine TolC d'*E. coli*.

Le domaine canal (en jaune), le domaine tunnel (en rouge) et le domaine équatorial (en vert) sont indiqués. **A :** Homotrimère TolC. **B :** Vues sub- et sous équatoriales du trimère. Le diamètre interne des tonneaux β et α est constant de l'extrémité distale du trimère jusqu'au domaine équatorial et mesure environ 20 Å. L'arrangement « *coiled-coil* » des hélices α du domaine équatorial jusqu'à l'extrémité proximale du trimère réduit le diamètre du tonneau, pour atteindre un minimum de 4 Å à l'entrée du tunnel. C : Structure du monomère TolC. Les éléments de structure secondaire sont indiqués selon Koronakis *et al.* (2000). (Andersen, C., Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 2003)

3.4.1.2. Les homologues de TolC chez les bactéries gram-négatives

Les membres de la famille TolC semblent ubiquitaires parmi les bactéries gram-négatives, avec près de 100 homologues identifiés dans plus de 30 espèces bactériennes (Paulsen et al., 1997 ; Johnson & Church, 1999). Un arbre phylogénétique basé sur des similarités dans leur séquence primaire permet de regrouper ces protéines en trois sous-familles selon leur fonction dans la sécrétion de toxines, dans l'efflux de cations ou d'antibiotiques (Koronakis *et al.*, 2004). TolC d'*E. coli* est multi-fonctionnelle ; elle peut interagir avec plusieurs familles de transporteurs impliqués soit dans la sécrétion de protéines (e.g. les ATPases HlyB et CvaB des systèmes HlyBD-TolC et CvaAB-TolC, respectivement), soit dans l'efflux (e.g. la pompe RND AcrB et la pompe MF EmrB des systèmes AcrAB-TolC et EmrAB-TolC, respectivement). Les

protéines de la famille TolC peuvent varier en taille, surtout par extension des extrémités N- et C-terminales. Des délétions ou des insertions de séquence s'observent seulement dans le domaine équatorial et dans les boucles extracellulaires (Andersen, 2003). La longueur des séquences codant les domaines canal et tunnel ne varient pas de façon significative. Dans ces régions, les expériences de délétion ou d'insertion dans *oprM* et de substitutions dans *tolC* mènent à la synthèse de protéines instables ou non-fonctionnelles (Li & Poole, 2001 ; Wong *et al.*, 2001 ; Vakharia *et al.*, 2001 ; Augustus *et al.*, 2004). Les résidus jouant un rôle structural sont conservés parmi les homologues (Andersen, 2003). En particulier, les transitions entre les hélices α du domaine tunnel et les feuillets β du domaine canal sont assurées par des résidus glycine et proline conservés. Près de l'entrée périplasmique du tunnel des résidus glycine facilitent l'enroulement des hélices H3 sur H4 et H7 sur H8. D'autres petits résidus, sérine et alanine, permettent des interactions étroites à l'interface des hélices et déterminent le rétrécissement du diamètre du cylindre. Une surface interne électronégative à l'entrée périplasmique du tunnel est conservée, souvent formée par un anneau de résidus aspartate (Asp371 et Asp374 dans TolC d'*E. coli*). Enfin, des résidus aromatiques conservés forment un anneau à la base du canal β et pourraient avoir une fonction d'ancrage à la membrane externe. Ces éléments universels suggèrent une structure 3D et sans doute des fonctions communes entre les protéines de la famille TolC (Andersen, 2003). Cela est compatible d'une part avec les données génétiques qui indiquent que certains homologues sont interchangeables, et d'autre part avec les données cristallographiques de deux protéines homologues, OprM de *P. aeruginosa* et VceC de *Vibrio cholerae* (Akama *et al.*, 2004b ; Federici *et al.*, 2005). OprM est une protéine acylée et toutes les autres protéines d'efflux de membrane externe possèdent une boîte « lipoprotéine » caractéristique, avec une cystéine en aval de la séquence signal N-terminale (Paulsen *et al.*, 1997 ; Nakajima *et al.*, 2000). Après clivage de la séquence signal, la cystéine est modifiée par acylation pour permettre l'ancrage de la protéine dans la membrane externe. Cette modification n'est pas essentielle à la localisation correcte dans la membrane externe et à la fonction d'efflux (Nakajima *et al.*, 2000).

3.4.1.3. Caractérisation biophysique des protéines d'efflux de la membrane externe

La capacité de TolC d'*E. coli* à former des pores a été montrée pour la première fois par Benz et coll. en 1993 puis approfondie par Andersen et coll. en 2002. TolC forme des pores stables dans une bicouche lipidique plane. La structure asymétrique de TolC permet une insertion unidirectionnelle de la protéine dans les membranes : du fait de la surface hydrophile du domaine tunnel, le domaine canal s'insère toujours en premier et il est donc possible

d'interpréter ses caractéristiques en fonction de son orientation dans la membrane. La structure originale de cette protéine se reflète dans son comportement électrophysiologique.

La conductance unitaire du canal TolC est de l'ordre de 85 pS (+/– 80 mV, KCl 1 M) (Benz *et al.*, 1993 ; Andersen *et al.*, 2002a). Cette valeur est environ 20 fois inférieure à celle de la porine OmpF d'*E. coli*. Bien que le domaine canal de TolC présente une aire de section 15 fois supérieure à celle d'OmpF, cette faible conductance s'explique principalement par le diamètre très étroit du pore à son entrée périplasmique (Andersen *et al.*, 2002a). Les mesures sélectivité ionique ont montré que TolC était un pore sélectif aux cations, avec une préférence 16,5 fois supérieure pour les ions potassium que pour les ions chlore (Andersen *et al.*, 2002a). Cette caractéristique, commune à la plupart des protéines bactériennes de membrane externe, protègerait les cellules d'une entrée massive de substances toxiques chargées négativement, tels que les sels biliaires présents dans l'environnement naturel des entérobactéries (Benz, 1994). Les résidus chargés qui tapissent l'intérieur de l'entrée des canaux déterminent leurs propriétés électrophysiologiques. Dans TolC, 6 résidus aspartate (2 par monomère) délimitent une aire fortement électronégative à l'entrée périplasmique du tunnel (figure 7). La substitution de ces résidus en alanine a clairement démontré leurs rôles dans la sélectivité ionique, la dépendance au pH, et les interactions du pore avec des cations di- et trivalents (Andersen *et al.*, 2002b). Le mutant $TolC^{DADA}$ devient sélectif aux anions, avec une préférence dix fois plus importante pour les ions Cl^- que pour les ions K^+. La conductance unitaire des canaux $TolC^{DADA}$ est linéaire en fonction de concentration en électrolyte. Une telle corrélation indique qu'il n'y a plus de site d'interaction ionique à l'intérieur du canal. Malgré son diamètre étroit, la conductance unitaire des canaux $TolC^{WT}$ est plus élevée que celle des canaux $TolC^{DADA}$, à faible concentration en électrolyte. Ce comportement suggère que les résidus aspartate à l'entrée périplasmique constituent un site de fixation permettant l'accumulation des ions K^+ dans le canal. A l'inverse, à forte concentration en électrolyte, l'influence des charges négatives diminue car le flux d'ions à travers le canal est maximal. Les résidus alanine ont une chaîne latérale moins encombrante que les résidus aspartate. Ainsi, la conductance unitaire des canaux $TolC^{DADA}$ est plus élevée que celle des canaux $TolC^{WT}$. Une autre caractéristique de TolC est sa fermeture induite à pH acide (Andersen *et al.*, 2002a). D'autres porines d'*E. coli* présentent un comportement similaire qui serait une réponse cellulaire immédiate à l'acidification du milieu (Heyde & Portalier, 1987). $TolC^{DADA}$ ne présente aucune dépendance au pH, suggérant que les résidus aspartate sont seuls responsables du processus de fermeture. Le site d'interaction ionique a également été caractérisé par sa capacité à fixer des cations di- et trivalents. Le flux de potassium à travers TolC peut être bloqué par l'addition de cations di- ou trivalents du coté de la membrane

correspondant à l'espace « extracellulaire ». L'addition d'ions du coté de la membrane correspondant à l'espace « périplasmique » n'a aucun effet. Ceci signifie que le site de fixation des cations n'est pas accessible du côté périplasmique. En réponse à l'application d'un voltage négatif, les ions sont « tirés » vers l'intérieur du pore et accèdent à leur site fixation à partir du coté extracellulaire. Le radius de tous les cations testés dans leur état hydraté était supérieur à 2 Å, trop large pour passer à travers l'entrée périplasmique du tunnel dont la section transversale est inférieure à 4 Å. Les substitutions DADA lèvent cette inhibition. L'interaction entre TolC et les ions trivalents hexa-amino-cobalt $Co(NH_3)_6^{3+}$ à été confirmée par titration calorimétrique isothermique (ITC : *isothermal titration calorimetry*). La résolution du complexe par cristallographie aux rayons X montre que seuls les résidus D374 engagent des liaisons hydrogène (Higgins *et al.*, 2004b). Dans les expériences d'ITC, les deux protéines partenaires purifiées sont placées dans une cellule calorimétrique, sous agitation et sous isolation thermique. Une protéine est présente à une concentration fixe et la protéine titrante est injectée jusqu'à saturation. Deux paramètres sont mesurés par cette technique : les échanges de chaleur (enthalpie, ΔH) qui tendent vers la négativité, et l'évolution de désordre (entropie, ΔS) qui tend vers la positivité (Cooper, 1999). Ces deux paramètres régissent la deuxième loi de la thermodynamique selon la loi de Gibbs-Helmoltz : $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. Une variation d'énergie libre (ΔG) négative indique une interaction favorable spontanée entre deux partenaires.

L'entrée périplasmique, seule zone de constriction de TolC peut être bloquée de façon irréversible. La surface électronégative est conservée parmi toutes les protéines de cette famille. Des molécules actives dirigées contre cette région pourraient ainsi réduire la résistance et la virulence des bactéries gram-négatives.

Le diamètre de l'entrée périplasmique du pore est trop étroit pour laisser passer des protéines ou des antibiotiques. Les analyses par reconstitution en bicouche lipidique plane ont montré que la conformation fermée était très stable. Ni une concentration élevée en sels, ni l'application d'un haut potentiel n'ouvre le canal. La reconstitution en protéoliposomes et le traitement d'OprM à l'α-chymotrypsine permet l'ouverture du pore et la diffusion d'antibiotiques (Yoshihara *et al.*, 2002). A la lumière de la structure 3D d'OprM, les deux sites de clivage sont localisés du côté C-terminal de l'hélice 3, qui définit justement la zone de constriction périplasmique. Un mécanisme allostérique d'ouverture a également été proposé. Celui-ci est basé sur le réalignement de la paire d'hélices *coiled-coil* internes (H7 et H8) sur la paire d'hélices externe (figure 8) (Koronakis *et al.*, 2000). La résolution de la structure 3D de TolC a permis l'identification de plusieurs résidus localisés à l'entrée du tunnel et capables de maintenir la conformation fermée par les liaisons inter- et intra-monomériques (figure 7).

L'inactivation simultanée de ces connections s'accompagne d'une nette augmentation de la conductance du pore (850 pS), ce qui traduirait un diamètre d'ouverture d'environ 16 Å à l'extrémité périplasmique (Andersen *et al.*, 2002c). Des preuves complémentaires ont été obtenues *in vivo*. L'introduction de ponts di-sulfures dans cette région empêchent le mouvement des hélices et abolit l'export d'hémolysine α (Eswaran *et al.*, 2003).

Les résidus D153 et Y362 responsables des liens intra-moléculaires sont conservés parmi les homologues de TolC. L'état fermé des canaux « au repos » apparaît donc comme une caractéristique commune aux protéines de la famille TolC. *In vivo*, la transition vers l'état ouvert pourrait faire intervenir AcrA, la protéine périplasmique.

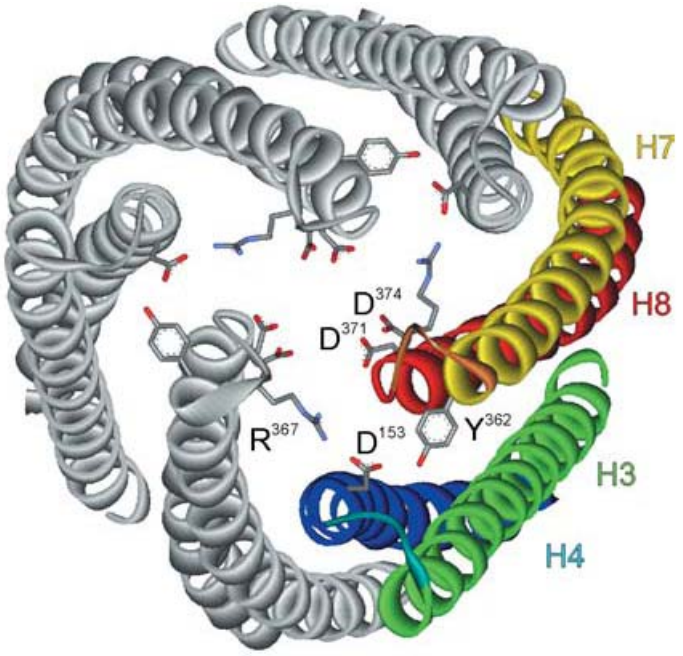


Figure 7 : Structure de TolC à son entrée périplasmique.

Les résidus D153, Y362 et R367 créent un réseau de liaisons inter- et intra-monomériques circulaires qui maintiennent l'entrée périplasmique du pore à l'état fermé. D371 et D374 forment une boucle électronégative à l'entrée du pore. (Andersen, C., Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 2003)

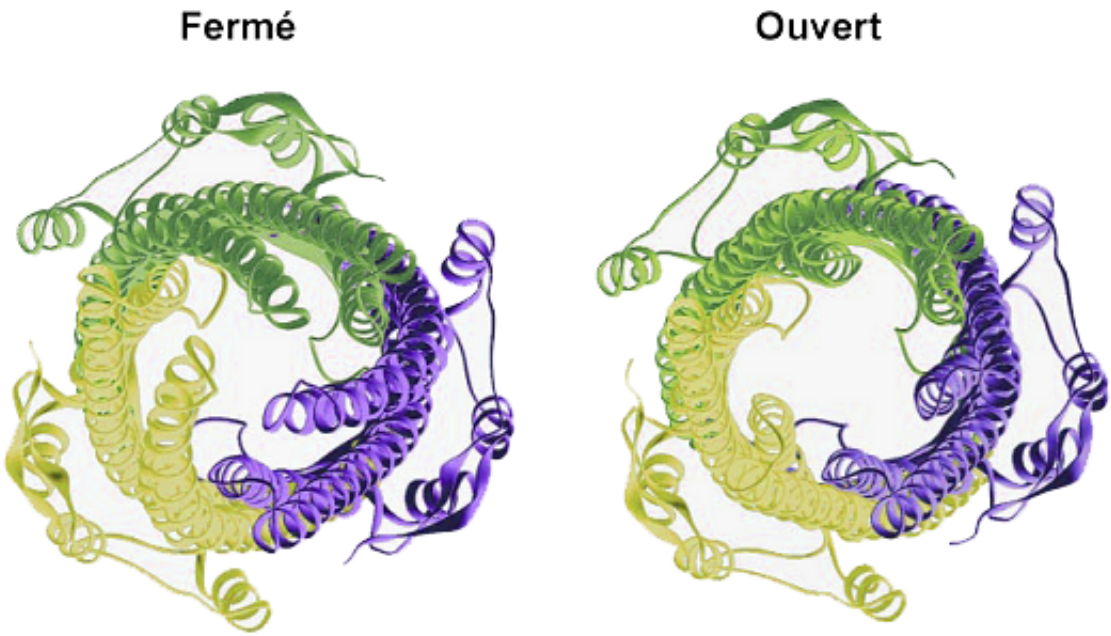


Figure 8 : Etat fermé cristallisé et état ouvert modélisé de TolC vue du périplasme.

(Koronakis, V., Nature. 2000)

3.4.2. Le transporteur de membrane interne : structure et bases moléculaires de la large spécificité de substrats

Les transporteurs RND sont constitués de 12 TMS en hélices α et de 2 larges boucles périplasmiques hydrophiles entre les TMS 1-2 et 7-8, contenant plus de 300 acides aminés chacune (Saier *et al.*, 1998). Cette topologie a été vérifiée expérimentalement pour les transporteurs MexB et MexD de *P. aeruginosa* et AcrB d'*E. coli* (Gotoh *et al.*, 1999 ; Guan *et al.*, 1999 ; Fujihira *et al.*, 2002). L'utilisation d'agents découplant ou ionophores sur cellules entières, ainsi que les études de reconstitution en protéoliposomes des transporteurs AcrB et AcrD d'*E. coli*, ont confirmé qu'ils effectuaient un antiport proton-substrat (Thanassi *et al.*, 1997 ; Zgurskaya & Nikaido, 1999b ; Aires & Nikaido, 2005). Les transporteurs RND témoignent d'une étonnante poly-spécificité de substrat et sont capables d'assurer la protection des cellules en capturant leurs substrats à la fois des côtés cytoplasmique et périplasmique de la membrane interne. En particulier, AcrB chez *E. coli* et MexB chez *P. aeruginosa* reconnaissent et expulsent des β-lactamines dont la cible est périplasmique. Ces observations suggèrent que ces transporteurs doivent présenter des sites de fixation multiples et flexibles pour recueillir leurs substrats à partir de leurs différentes localisations dans la cellule. Alternativement, la topologie de ces transporteurs est telle que les molécules lipophiles et hydrophiles peuvent avoir accès à leur site de fixation.

En 2002, la structure tridimensionnelle du transporteur AcrB a été obtenue à 3,5 Å de résolution par cristallographie aux rayons X (Murakami *et al.*, 2002). Trois monomères d'AcrB, de 1049 acides aminés chacun, s'organisent en un homotrimère dont l'aspect général est celui d'une méduse (figure 9). Chaque monomère comprend un domaine transmembranaire de 50 Å surmonté d'un domaine de 70 Å faisant saillie dans le périplasme. Cette structure nous livre plusieurs indices sur le fonctionnement du transporteur. Premièrement, le domaine périplasmique est proéminent, comme l'indiquaient les prédictions de topologie. Deuxièmement, la partie supérieure du domaine périplasmique forme un entonnoir dont les dimensions semblent s'adapter à celles du tonneau périplasmique de TolC, suggérant que AcrB puisse directement entrer en contact avec TolC sans l'intermédiaire d'AcrA. Troisièmement, l'entonnoir est relié à une large cavité centrale, d'un diamètre de 35 Å, délimitée par les 36 hélices α transmembranaires (12 par monomère). Au contraire, le pore qui connecte l'entonnoir supérieur à la cavité centrale inférieure est très étroit. Quatrièmement, trois ouvertures latérales, appelées vestibules, sont présentes au niveau des jonctions entre chaque monomère juste au-dessus de la surface membranaire et mènent à la cavité centrale.

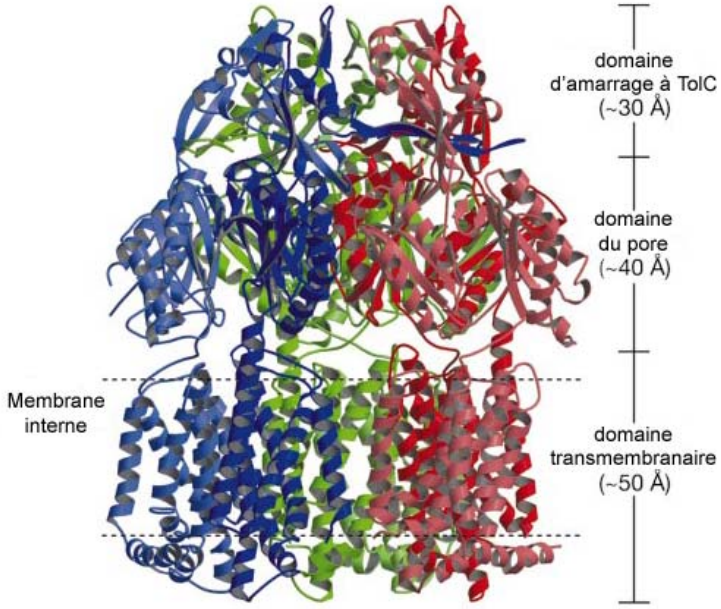


Figure 9 : Structure tridimensionnelle du trimère AcrB.

Les trois monomères sont représentés par des couleurs différentes. Cette structure peut être divisée en un domaine transmembranaire inférieur et un domaine périplasmique supérieur (domaine 'd'amarrage' à TolC et domaine du pore). (Murakami S. *et al.*, Nature, 2002)

Les bases moléculaires qui régissent la reconnaissance et la fixation des substrats par les transporteurs RND commencent à être élucidées. Les co-cristaux d'AcrB complexés à quatre ligands différents (la rhodamine 6G, l'éthidium, le déqualinium et la ciprofloxacine) montrent qu'ils se fixent tous à la périphérie de la cavité centrale, près des vestibules (Yu *et al.*, 2003a et b). Pour ces quatre ligands testés, le trimère AcrB fixe simultanément trois molécules (une par monomère), qui, en interagissant entre elles, stabilisent leur fixation au transporteur. D'une façon intéressante, chaque ligand utilise une combinaison différente d'acides aminés et, même s'il est chargé, fait intervenir des interactions hydrophobes plutôt que des interactions électrostatiques. Il doit donc exister une autre source de charges négatives pour interagir avec les ligands chargés positivement. Murakami et coll. avaient suggéré que la bicouche lipidique membranaire puisse occuper la cavité centrale d'AcrB. Ainsi, les ligands cationiques pourraient interagir avec les têtes polyanioniques des phospholipides membranaires. Cette hypothèse concorde avec plusieurs observations. Tout d'abord, cela expliquerait la large gamme de substrats reconnus par les transporteurs RND. De plus, par leur fluidité latérale, les lipides n'empêcheraient pas la fixation de molécules anioniques (telles que les pénicillines). La

présence de lipides dans la cavité centrale d'un transporteur RND reste tout de même à démontrer.

La structure 3D du transporteur AcrB soulève aussi la question du mode de capture des substrats. L'hypothèse actuelle suggère que les substrats sont capturés par les vestibules à partir du feuillet externe de la membrane interne. Bien que très divers, les substrats seraient d'abord amenés au contact du feuillet externe de la membrane interne soit par leur hydrophobicité soit par leur moment dipolaire, puis ils diffuseraient latéralement jusqu'aux vestibules avant de gagner la cavité centrale (Yu *et al.*, 2003b). De plus en plus d'observations et de résultats confirment le rôle du domaine périplasmique dans la spécificité de substrats. Lorsqu'on examine les transporteurs homologues à AcrB, on remarque une grande conservation des résidus aux sites de fixation avec les ligands (Yu *et al.*, 2003b). L'entrée des vestibules dans AcrD (qui transportent les aminoglycosides, polycationiques) contient beaucoup plus de résidus acides qu'AcrB (qui ne les transportent pas) (Yu *et al.*, 2003b). La comparaison entre AcrB d'*E. coli* et MexB de *P. aeruginosa*, montre qu'un acide aminé acide, Asp301, dans AcrB est remplacé par un couple d'acides aminés basiques, Lys304 et Lys170, dans MexB. Exprimé chez *E. coli*, le système MexAB-OprM est moins efficace que le système AcrAB-TolC pour expulser des colorants ou des antibiotiques cationiques (éthidium ou érythromycine) ; mais il est plus efficace pour éliminer les acides faibles (acide nalidixique) (Tikhonova *et al.*, 2002). Ces résultats sont compatibles avec l'intérieur basique du vestibule de MexB.

Par la construction de transporteurs hybrides, plusieurs études récentes mettent aussi en évidence le rôle du domaine périplasmique dans la reconnaissance et la spécificité des substrats. En échangeant des domaines entre AcrB et AcrD, Elkins et Nikaido ont montré que la large spécificité de substrats d'AcrB comparée à la spécificité limitée aux aminoglycosides d'AcrD était déterminée par les boucles périplasmiques (Elkins & Nikaido, 2002). Thikhonova et coll. ont construit des protéines chimères d'AcrB d'*E. coli* et de MexB de *P. aeruginosa*. L'hybride contenant les 849 résidus N-terminaux d'AcrB conférait un niveau de résistance plus élevé aux agents cationiques que celui contenant les 612 résidus N-terminaux (Tikhonova *et al.*, 2002). L'importance de la région périplasmique située entre les résidus 612 et 849 d'AcrB dans la sélection des substrats est en accord avec le fait que les résidus 830 à 849 tapissent l'entrée du vestibule, et que cette région est significativement différente entre AcrB et MexB. Eda et coll. ont montré que le remplacement du domaine transmembranaire de MexB par le domaine correspondant de MexY n'avait aucune influence sur la nature des substrats reconnus. Au contraire, lorsque les deux boucles périplasmiques de MexY étaient remplacées par celles de MexB, MexY devenait sélectif vis-à-vis des β-lactamines (substrats spécifiques de MexB) mais

ne l'était plus vis-à-vis des aminoglycosides (substrats spécifiques de MexY) (Eda *et al.*, 2003). Un travail très précis a été mené par Mao et coll. : en considérant que le système MexCD-OprJ est incapable d'expulser les β-lactamines, ils ont construit puis sélectionné des mutants de MexD permettant l'efflux de carbénicilline. Parmi les mutants obtenus, la substitution Gln34Lys est située dans l'entrée du vestibule ; dans cette région la présence d'une charge positive semble suffisante pour permettre l'entrée des β-lactamines chargées négativement (Mao *et al.*, 2002).

Tout indique que les transporteurs RND fonctionnent comme des « aspirateurs » périplasmiques. Cependant, il restait à en apporter la preuve biochimique. Pour cela, deux études ont été menées en utilisant des transporteurs purifiés puis reconstitués en protéoliposomes sous gradient artificiel de protons (l'espace intra-vésiculaire correspondant à l'espace périplasmique est acide) (Zgurskaya & Nikaido, 1999b ; Aires & Nikaido, 2005). Un tel système permet de mesurer l'activité du transporteur selon que le substrat est ajouté dans l'espace intra- (périplasme) ou extra-vésiculaire (cytoplasme). Cependant, ce système n'est utilisable que si le substrat utilisé est suffisamment hydrophile pour ne pas diffuser spontanément à travers la membrane vésiculaire. L'expérience s'est avérée délicate dans le cas de protéoliposomes contenant AcrB, car la plupart des substrats d'AcrB sont hydrophobes (Zgurskaya & Nikaido, 1999b). La même équipe a contourné ce problème en étudiant l'activité du transporteur AcrD d'*E. coli*, proche homologue d'AcrB mais spécifique de l'efflux des aminoglycosides, une classe d'antibiotiques polycationiques, donc très hydrophiles (Aires & Nikaido, 2005). L'addition de l'antibiotique dans le milieu extra-vésiculaire entraînait la dissipation du gradient de protons (efflux d'H^+) et l'accumulation intra-vésiculaire de l'antibiotique radiomarqué. Ceci indique que les aminoglycosides peuvent être capturés et transportés depuis le cytoplasme *in vivo*. De même, un efflux de protons a été observé lorsque l'antibiotique est ajouté seulement dans le milieu extra-vésiculaire. Ceci démontre que, dans les cellules intactes, AcrD est capable de capturer les aminoglycosides dans le périplasme pour les expulser vers le milieu extérieur. Dans les deux cas, il est important de noter que la présence de la protéine périplasmique AcrA était nécessaire à l'activité du transporteur.

3.4.3. La protéine périplasmique adaptatrice : données structurales

Les protéines périplasmiques adaptatrices ont été regroupées sous le terme de protéines de fusion membranaire (Dinh *et al.*, 1994 ; Johnson & Church, 1999). Dans les premiers modèles des systèmes de sécrétion de type I et des systèmes d'efflux, le rôle alloué à la protéine périplasmique était de réduire la distance entre les membranes interne et externe par un

processus d'hémifusion membranaire. Toutes les protéines de cette famille sont ancrées dans la membrane interne par leur extrémité N-terminale, avec le reste de la protéine baignant dans le périplasme. Les protéines complexées aux transporteurs de type ABC et MF possèdent une hélice transmembranaire unique (HlyD du système de sécrétion HlyBD-TolC, EmrA du système d'efflux EmrAB-TolC), alors que les protéines interagissant avec les transporteurs de type RND ont une ancre lipidique (AcrA, MexA des systèmes d'efflux AcrAB-TolC et MexAB-OrpM). Aucune étude n'a montré leur insertion dans la membrane externe. L'appellation « protéine de fusion membranaire » est basée sur de faibles homologies avec une protéine de paramyxovirus impliquée dans la pénétration intracellulaire du virus par fusion. L'utilisation de ce terme n'est absolument pas adaptée à la fonction des protéines adaptatrices bactériennes.

La présence de la protéine périplasmique est indispensable aux processus de sécrétion et d'efflux. Bien que son rôle soit encore mal défini, elle interviendrait dans l'assemblage et dans la stabilisation des complexes. De plus, elle pourrait induire des modifications de conformation et entraîner l'ouverture du canal de membrane externe pour permettre la translocation des substrats. Ainsi, les protéines périplasmiques peuvent être assimilées à de véritables relais dynamiques en transmettant l'énergie du transporteur de membrane interne au canal de membrane externe.

Deux équipes indépendantes ont décrit la structure 3D de la protéine MexA de *P. aeruginosa* par cristallographie aux rayons X (Akama *et al.*, 2004a ; Higgins *et al.*, 2004a).

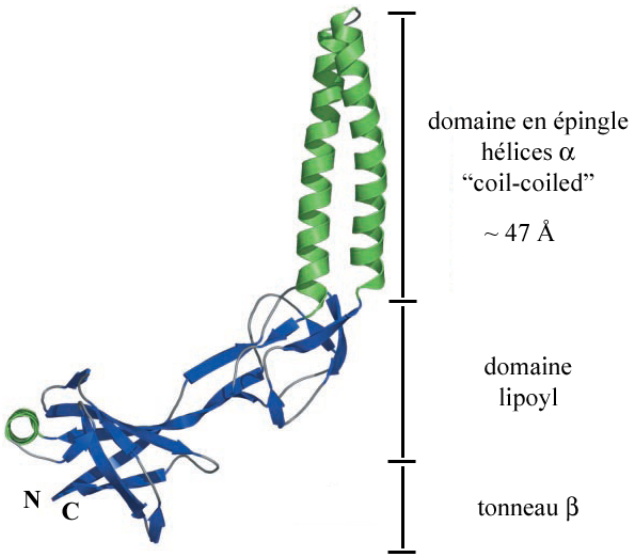


Figure 10 : Structure tridimensionnelle du monomère MexA.

La molécule est colorée selon les éléments de structure secondaire, avec les hélices α en vert et les feuillets β en bleu. (Higgins M. K. *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci., 2004)

Le monomère a une forme allongée et contient trois domaines successifs : un tonneau β, un domaine lipoyl et une épingle en hélices α (figure 10). Les 28 résidus N-terminaux ainsi que les 101 résidus C-terminaux de la protéine mature n'étaient pas ordonnés dans les cristaux. Or, la région C-terminale d'AcrA, qui comprend justement les résidus manquant, semble déterminer les interactions avec AcrB (Elkins & Nikaido, 2003 ; Touzé *et al.*, 2004).

Le premier domaine en tonneau β contient six feuillets β antiparallèles, avec une hélice α unique située à une entrée du tonneau. Ce type de repliement se retrouve dans le domaine de fixation de ligands de diverses protéines. Les ligands se fixent alors à l'entrée au tonneau β, opposée à l'hélice α. Puisqu'il a été montré que la protéine adaptatrice EmrA, du système EmrAB-TolC chez *E. coli*, était capable d'interagir directement avec des antibiotiques, il est donc possible que ce domaine intervienne dans la fixation des substrats (Borges-Walmsley *et al.*, 2003). Le second domaine est un sandwich β dont l'organisation est similaire aux motifs « biotinyl-lipoyl » retrouvés dans de nombreuses protéines modifiées par l'ajout d'un groupement lipoyl ou d'une biotine. Le troisième domaine forme une épingle en hélices α de 47 Å de long, qui présente toutes les caractéristiques d'un domaine *coiled-coil*. Les motifs structuraux en hélices α *coiled-coil* sont répandus et assurent l'oligomérisation d'un grand nombre de protéines. Les domaines en *coiled-coil* contiennent deux à cinq hélices α qui s'enroulent les unes sur les autres pour former une super-hélice. La séquence des domaines en *coiled-coil* est caractérisée par des répétitions périodiques de 7 résidus. Dans ces heptades (abcdefg), les positions a et d sont occupées par des résidus hydrophobes à grosse chaîne latérale et forment les interfaces entre les monomères, alors que les autres résidus sont hydrophiles et sont situés dans les régions accessibles aux solvants (Burkhard *et al.*, 2001). Dans MexA, le domaine *coiled-coil* contient 64 acides aminés, mais cette longueur est variable dans la famille des protéines adaptatrices. Les surfaces exposées des deux hélices contiennent des résidus conservés, tels que l'alanine en position f et la sérine ou l'acide glutamique en position c. Aux extrémités des hélices, on retrouve des résidus hydrophiles capables d'engager des liaisons hydrogène.

3.4.4. Assemblage des pompes d'efflux tripartites

Les interactions à trois partenaires ont d'abord été étudiées en détails pour les systèmes de sécrétion de type I. Les expériences de pontage chimique *in vivo* ont montré que le complexe formé par l'ATPase et l'adaptateur recrutait TolC dans la membrane externe seulement lorsque le substrat était engagé. L'assemblage du système complet est transitoire (Thanabulu *et al.*, 1997 ; Hwang *et al.*, 1997). Au contraire, les systèmes d'efflux AcrA-AcrB-TolC chez *E. coli* et

MexA-MexB-OprM chez *P. aeruginosa* sont assemblés de façon permanente, même en l'absence de substrat (Mokhonov *et al.*, 2004 ; Nehme *et al.*, 2004 ; Touzé *et al.*, 2004 ; Tikhonova & Zgurskaya, 2004). Cette différence pourrait être due aux contraintes imposées par les substrats transportés. Alors que la sécrétion des toxines de 1000 acides aminés ou plus suit le rythme des synthèses, on estime qu'environ 500 petites molécules d'éthidium sont expulsées par seconde et par pompe chez *P. aeruginosa* (Narita *et al.*, 2003). Les assemblages et les désassemblages trop fréquents des systèmes d'efflux pourraient être coûteux pour la bactérie sur le plan énergétique. En l'absence de composés toxiques rajoutés dans l'environnement, il a été proposé que les pompes d'efflux jouent le rôle de « poubelle » en permettant aux cellules de se débarrasser de leurs produits métaboliques finaux (tel que l'éthanol lors des fermentations) ou de métabolites intermédiaires toxiques accumulés de façon anormale (Helling *et al.*, 2002 ; Shyu *et al.*, 2002). Dans ce cas, une quantité minimale de pompes d'efflux assemblées et fonctionnelles serait requise.

La longueur et la topologie des domaines périplasmiques de TolC et d'AcrB suggèrent qu'ils puissent entrer directement en contact. Bien que le complexe AcrB-TolC peut être isolé indépendamment de la présence d'AcrA *in vivo*, aucune interaction n'est visible entre les deux protéines purifiées par ITC *in vitro* (Tikhonova & Zgurskaya, 2004 ; Touzé *et al.*, 2004). En revanche, ces expériences ont montré que l'adaptateur AcrA était capable d'établir des interactions favorables avec AcrB et TolC (Touzé *et al.*, 2004). Ces résultats illustrent bien le rôle central de la protéine adaptatrice dans l'assemblage et la stabilisation du complexe d'efflux. Grâce à sa forme allongée et modulaire, l'adaptateur périplasmique pourrait entrer en contact avec la protéine de membrane externe par l'intermédiaire de leurs longs domaines *coiled-coil* respectifs, et interagir avec le transporteur de membrane interne en utilisant une région C-terminale distincte (Zgurskaya & Nikaido, 1999a ; Elkins & Nikaido, 2003 ; Husain *et al.*, 2004 ;Touzé *et al.*, 2004).

Il reste à savoir comment ces trois protéines s'assemblent pour former une pompe d'efflux fonctionnelle et comment s'effectue l'ouverture du canal. Quatre modèles structuraux d'assemblage ont été proposés (Akama *et al.*, 2004a ; Higgins *et al.*, 2004a ; Fernandez-Recio *et al.*, 2004). TolC et AcrB sont clairement des protéines trimériques, mais le degré d'oligomérisation de la protéine adaptatrice reste un mystère. Les modèles d'assemblage proposent chacun une stœchiométrie différente : 1/1/1 ; 1/2/1 ; 1/3/1 ou 1/4/1 monomères de TolC (OprM)/AcrA (MexA)/AcrB (MexB). La protéine AcrA est monomérique en solution et des formes trimériques complexées à AcrB ont été identifiées *in vivo* (Zgurskaya & Nikaido,

1999a ; Zgurskaya & Nikaido, 2000a), alors que des hexamères de MexA ont été suggérés sur la base de l'abondance cellulaire relative des protéines d'efflux (Narita *et al.*, 2003).

En plus de son rôle structural, les expériences de reconstitution *in vitro* suggèrent que le transporteur aurait besoin d'être « activé » par la protéine adaptatrice avant de pouvoir capturer ses substrats (Zgurskaya & Nikaido, 1999b ; Aires & Nikaido, 2005). La co-cristallisation d'un transporteur RND et de sa protéine adaptatrice associée pourrait fournir des indices.

3.5. Régulation du locus *acrAB* chez les entérobactéries

Lorsque le taux d'expression d'une pompe d'efflux constitutive augmente, ou lorsqu'une pompe d'efflux silencieuse est exprimée, la résistance aux antibiotiques peut atteindre des niveaux élevés. En effet, la surproduction de la protéine AcrA dans des isolats cliniques d'*E. coli* et *K. pneumoniae* a été plusieurs fois associée à un phénotype de multirésistance de niveau élevé. Cela résulte soit de mutations responsables de la surproduction du régulateur global MarA, qui module l'expression de plusieurs gènes, dont *acrAB* et *tolC* ; soit de mutations qui inactivent AcrR, un répresseur local spécifique dont le gène est divergent à l'opéron *acrAB* (figure 11). Bien que AcrR soit capable de réprimer sa propre transcription et celle de *acrAB*, il n'est pas impliqué dans l'induction de l'expression de *acrAB* par des conditions générales de stress, telles que la présence d'éthanol, la forte osmolarité du milieu ou l'entrée en phase stationnaire de croissance (Ma *et al.*, 1993 ; Ma *et al.*, 1996). Il semble que la fonction première de AcrR serait d'empêcher la production excessive de la pompe AcrAB, alors que MarA et les autres régulateurs globaux homologues seraient responsables de l'induction de *acrAB* et *tolC*.

Le contrôle de l'expression de la pompe AcrAB-TolC d'*E. coli* est l'exemple le plus étudié en ce qui concerne les mécanismes de régulation globaux de la multirésistance.

Le locus *mar* (*multiple antibiotic resistance*) consiste en deux unités de transcription *marC* et *marRAB* transcrites de façon divergente à partir de l'opérateur *marO*. *marR* et *marA* codent respectivement l'auto-répresseur de l'opéron MarR et l'activateur transcriptionnel global MarA.

Chez les entérobactéries, le phénotype Mar est induit par la présence d'antibiotiques, tels que la tétracycline, le chloramphénicol et l'imipénème, et d'acides aromatiques faibles tels que le salicylate (Cohen *et al.*, 1989 ; Alekshun & Levy, 1999 ; Bornet *et al.*, 2003). Dans des conditions standard, MarR se lie à deux sites de fixation dans l'opérateur *marO* et empêche la transcription de l'opéron. Cette action inhibitrice est levée lorsque MarR est rendu inactif par la fixation de molécules inductrices ou par des mutations dans *marR* ou *marO* (figure 11). La multirésistance des mutants Mar résulte de l'action coordonnée de MarA sur la diminution de l'influx et l'augmentation de l'efflux des antibiotiques. MarA réduit la synthèse de la porine

OmpF par activation de l'ARN anti-sens *micF*, limitant ainsi le passage des petits antibiotiques hydrophiles, notamment les β-lactamines ; et augmente l'expression des gènes d'efflux *acrAB* et *tolC*, qui expulsent les tétracyclines, le chloramphénicol et les quinolones hors des cellules. La fonction d'activateur transcriptionnel de MarA est globale. L'expression constitutive ou induite de *marA* régule l'expression d'une soixantaine de gènes chez *E. coli* impliqués dans l'adaptation à l'environnement (Barbosa & Levy, 2000 ; Pomposiello *et al.*, 2001).

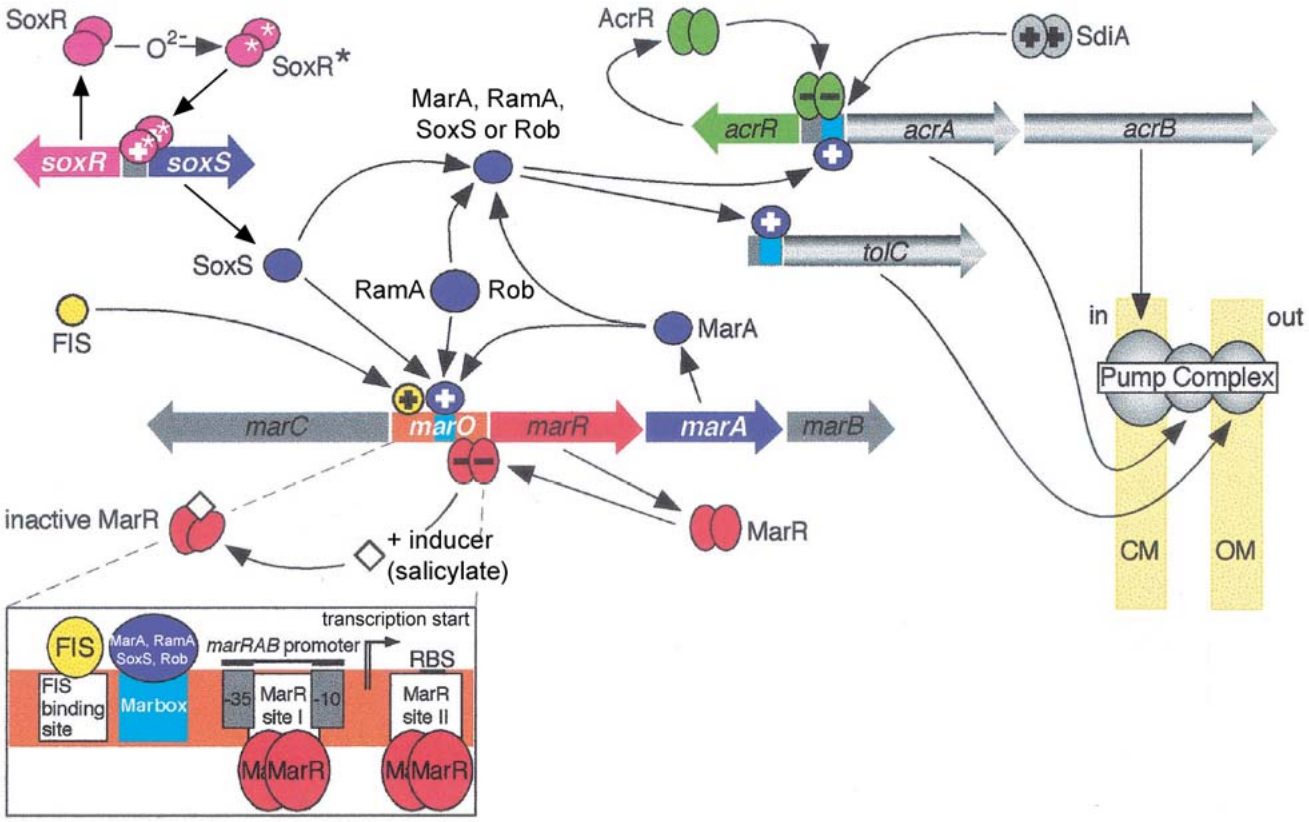


Figure 11 : Représentation schématique des régulateurs connus gouvernant l'expression des loci *acrAB* et *tolC* chez les entérobactéries.

La production excessive d'AcrA et AcrB est inhibée par le répresseur local AcrR (en vert). La transcription des loci *acrAB* et *tolC* est activée par les régulateurs globaux MarA, RamA, SoxS, Rob (en bleu) et SdiA (en gris). (adapté de Grkovic *et al.*, 2002)

SoxS, effecteur du régulon de réponse au stress oxydatif *soxRS*, et Rob sont des homologues de MarA capables d'activer la transcription de l'opéron *marRAB* et des gènes cibles de MarA (figure 11). SoxS est surproduite en réponse à l'oxydation de la protéine régulatrice SoxR par des radicaux libres superoxides. La surproduction de Rob à partir d'un plasmide multicopie

confère un phénotype de multirésistance aux antibiotiques et une tolérance aux solvants organiques (Nakajima *et al.*, 1995). Le rôle de Rob est encore mal connu car à l'inverse de MarA et SoxS, Rob est produite de façon constitutive en grande quantité (environ 5000 molécules par cellule), ce qui suppose une saturation permanente des promoteurs cibles et une multirésistance stable. Peut-être cette protéine a-t-elle besoin d'être activée pour pouvoir exercer son action. Dans cette idée, une étude a montré que Rob était capable de fixer des sels biliaires directement par son domaine C-terminal et que cette interaction induisait l'expression de *acrAB* (Rosenberg *et al.*, 2003).

Les systèmes de régulation de type Mar et leur mode d'action sont conservés parmi les entérobactéries. Chez *E. aerogenes*, MarA et RamA sont impliqués dans le contrôle de la multirésistance aux antibiotiques (Chollet *et al.*, 2002 ; Chollet *et al.*, 2004). Ces deux régulateurs agissent sur des cibles communes entraînant la mise en place d'un efflux actif et d'une imperméabilité membranaire. Chollet et coll. suggèrent que les conditions d'expression de ces deux régulateurs sont différentes. La multiplication des voies d'activation de la multirésistance chez *E. aerogenes* favoriserait son adaptation rapide et efficace à l'environnement hospitalier.

Une étude récente a montré que la pompe AcrAB d'*E. coli* était également régulée de façon positive par SdiA, une protéine qui contrôle les gènes de division cellulaire en réponse aux molécules signaux du quorum-sensing (Rahmati *et al.*, 2002). Cependant, le lien possible entre les systèmes d'efflux et le quorum-sensing fait encore l'objet de controverses.

Tous ces exemples indiquent que la multirésistance aux antibiotiques fait intervenir de véritables « senseurs de drogues » intracellulaires capables de fixer une large gamme de molécules et d'induire la surproduction des pompes d'efflux. Les bases moléculaires de cette reconnaissance deviennent claires depuis la détermination de la structure tridimensionnelle de plusieurs régulateurs (Martin & Rosner, 1995 ; Zheleznova *et al.*, 1999).

4. Les futures stratégies thérapeutiques : vers des inhibiteurs d'efflux ?

Les pompes d'efflux d'antibiotiques représentent de nouvelles cibles antibactériennes. En effet, l'ensemble des études sur les gènes d'efflux montre bien que leur inactivation restaure la sensibilité des souches vis-à-vis de nombreux antibiotiques. Des programmes de recherche et de développement d'inhibiteurs de pompes d'efflux (IPEs) ont été initiés par plusieurs compagnies biotechnologiques et laboratoires de recherche. Utilisées comme adjuvants thérapeutiques, de telles molécules pourraient augmenter l'accumulation intracellulaire des antibiotiques et

améliorer leurs performances cliniques, de la même façon que les inhibiteurs des β–lactamases ont donné une nouvelle vie aux β–lactamines.

Quatre mécanismes d'action des IPEs sont envisageables pour bloquer l'efflux d'antibiotiques de façon spécifique. Ceux-ci pourraient agir (i) en bouchant la protéine canal de membrane externe, (ii) en altérant l'assemblage fonctionnel du complexe tripartite, (iii) en dissipant la source d'énergie ou (iv) en créant une compétition pour la fixation des substrats au niveau du transporteur de membrane interne.

Les premiers résultats des analyses fonctionnelles des protéines d'efflux de la famille TolC indiquent que les cations di- et trivalents sont capables de bloquer leur activité canal *in vitro* (Andersen *et al*, 2002b ; Higgins *et al*, 2004b ; Masi *et al*, en préparation). Une seule molécule hexa-amino-cobalt se fixe au centre de l'extrémité périplasmique de TolC en établissant des liaisons hydrogène avec un résidu aspartate (Asp374 dans chaque monomère) localisé au niveau de la zone de constriction (figure 13). A forte concentration (≥ 50 nM), la fixation du ligand est irréversible (Higgins *et al*, 2004b). Ces observations sont prometteuses puisque le caractère électronégatif de l'entrée périplasmique est conservé parmi les protéines d'efflux de la famille TolC.

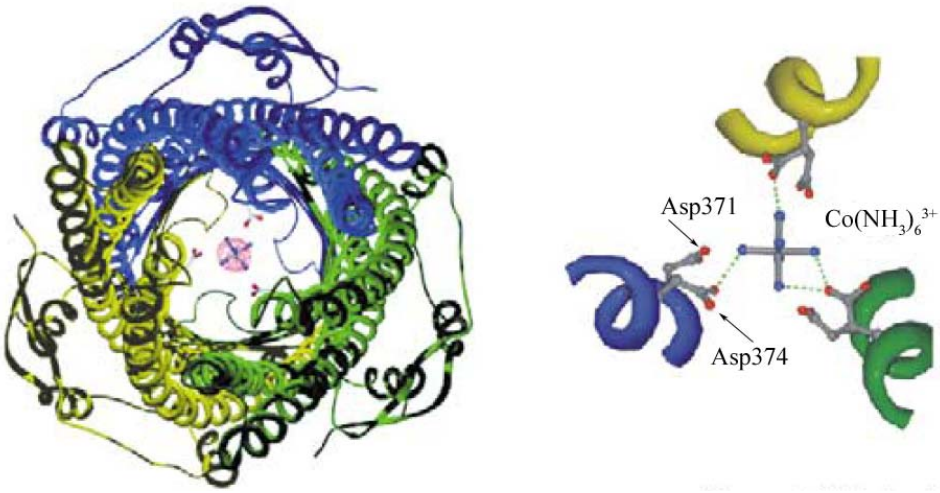


Figure 13 : Vue périplasmique du trimère TolC d'*E. coli* complexé à un ion $Co(NH_3)_6^{3+}$ et détail des interactions.

(Higgins M. K. *et al.*, J. Mol. Biol., 2004)

La globomycine est un antibiotique peptidique qui inhibe la signal peptidase II, qui agit en bloquant la maturation et l'export des lipoprotéines. En ciblant à la fois les protéines de liaison périplasmiques et la plupart des protéines d'efflux de membrane externe, elle est la seule

molécule capable d'empêcher l'assemblage des systèmes d'efflux décrite à ce jour (Malléa *et al.*, 2002).

Le carbonyl cyanure *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) est un découplant énergétique qui dissipe le gradient transmembranaire de protons nécessaire à l'activité des pompes d'efflux (Malléa *et al.*, 2002). Le CCCP est couramment utilisé en laboratoire dans les expériences d'accumulation intracellulaire d'antibiotiques afin de mettre en évidence la présence d'un efflux actif. Cependant, si le CCCP est toxique pour les bactéries, il l'est aussi pour les cellules de l'hôte. A ce jour, aucune molécule n'est capable de cibler la source énergétique des transporteurs bactériens de façon spécifique et ne peut avoir d'avenir thérapeutique.

Les recherches sur la classe des inhibiteurs compétitifs offrent les résultats les plus intéressants. L'action combinée d'un antibiotique substrat d'efflux et d'un inhibiteur d'efflux est une solution déjà exploitée par les plantes pour combattre les infections bactériennes. Par exemple, les feuilles de *Berberis fremontii* synthétisent simultanément un flavonoïde, la 5'-méthoxyhydnocarpine, et un alcaloïde antibactérien, la berbérine (Stermitz *et al.*, 2000).

La méthode de criblage pour l'identification des IPEs la plus simple et la plus utilisée associe la détermination de la concentration minimale inhibitrice et le niveau d'accumulation intracellulaire d'un antibiotique substrat en absence et en présence d'un inhibiteur potentiel. Dans ces essais, les IPEs doivent répondre à certains critères :

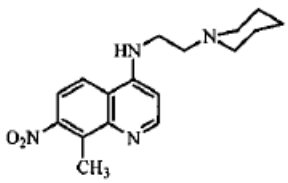
1) ils doivent augmenter l'accumulation intracellulaire des antibiotiques substrats d'efflux,
2) ils doivent augmenter l'activité des antibiotiques substrats d'efflux,
3) ils ne doivent pas affecter l'activité des antibiotiques qui ne sont pas efflués,
4) ils ne doivent pas avoir d'effet intrinsèque sur des souches qui n'expriment pas de système d'efflux.

Cette approche a été utilisée avec succès pour identifier des IPEs des pompes d'efflux de type RND chez *P. aeruginosa* et les *Enterobacteriaceae*. Dans la littérature, les IPEs sont surtout recherchés pour leur capacité à restaurer l'activité des fluoroquinolones. En effet, cette classe d'antibiotiques, à l'origine très efficace contre les bactéries gram-négatives, est aujourd'hui la plus affectée par les mécanismes d'efflux. Le premier inhibiteur compétitif décrit est le phénylalanyl-arginyl-β-naphthylamide (PAβN) (figure 14). Utilisé à des concentrations de l'ordre de 10 µg/ml, le PAβN potentialise l'activité de la lévofloxacine d'un facteur 8 sur des souches sauvages de *P. aeruginosa* jusqu'à un facteur 64 sur des mutants surexprimant un ou plusieurs systèmes d'efflux (Lomoskaya *et al.*, 2001). Le PAβN est également actif sur d'autres bactéries gram-négatives telles que *E. aerogenes*, *K. pneumoniae* et *Campylobacter jejuni* (Malléa *et al.*, 2002 ; Mamelli *et al.*, 2003 ; Hasdemir *et al.*, 2004).

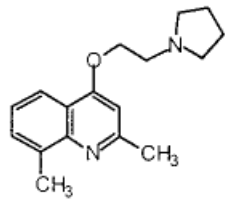
Depuis plusieurs années, le groupe de chimistes du GERCTOP travaille en collaboration avec l'équipe EA2197 pour synthétiser et tester des molécules inhibitrices d'efflux. Une banque de molécules a été criblée sur une collection d'isolats cliniques d'*E. aerogenes* et *K. pneumoniae* multirésistants aux antibiotiques. Ainsi, plusieurs dérivés pyrido-, alkoxy-, alkylamino- et thioalkylamino-quinolines sont capables d'augmenter la sensibilité des isolats vis-à-vis de plusieurs antibiotiques, dont les fluoroquinolones, le chloramphénicol et la tétracycline (figure 14) (Chevalier *et al.*, 2001 ; Gallo *et al.*, 2003 ; Malléa *et al.*, 2003 ; Chevalier *et al.*, 2004). Les composés retenus agissent en augmentant la concentration intracellulaire en antibiotique à un niveau comparable à l'action du CCCP. Cependant, l'efficacité de ces inhibiteurs est variable selon la souche et l'antibiotique testés. Dans un même isolat, l'efflux est souvent associé à d'autres mécanismes de résistance tels que des mutations de cibles, la production d'enzymes d'inactivation et/ou l'imperméabilité membranaire, contre lesquels les IPEs n'ont aucune activité. De plus, la résolution de la structure du transporteur AcrB d'*E. coli* en présence de différents substrats (rhodamine 6G ; bromure d'éthidium ; déqualinium ; ciprofloxacine) a montré que ceux-ci se fixaient tous à l'intérieur de la cavité centrale, mais que chacun interagissait avec une combinaison de résidus différente (Yu *et al.*, 2003b). Il en est peut-être de même pour les IPEs.

L'efficacité des IPEs a été confirmée sur des modèles animaux d'infections à *P. aeruginosa* surexprimant la pompe MexAB-OprM (Renau *et al.*, 1999 ; Nakayama *et al.*, 2003). L'ensemble des études *in vitro* et *in vivo* témoigne donc de la faisabilité de cette approche thérapeutique combinatoire pour combattre les bactéries multirésistantes. Deux IPEs nés d'une collaboration entre les compagnies Mpex Pharm, Trine et Daiichi sont actuellement en essais pré-cliniques (Overbye & Barrett, 2005).

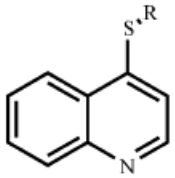
Les mécanismes de reconnaissance et de translocation des substrats par les transporteurs d'efflux sont encore mal compris. Néanmoins, une notion essentielle se dégage : ces transporteurs sont capables de reconnaître une gamme de substrats étonnamment large, ce qui semble aller à l'encontre des dogmes biochimiques établis. Nous sommes ici très loin du modèle enzymatique « clé-serrure » et le caractère poly-spécifique des transporteurs d'efflux complique le design rationnel d'inhibiteurs compétitifs. Malgré ce, les résultats récents décrits ci-dessus sont encourageants. L'efficacité d'action des IPEs repose sur deux facteurs : leur degré d'affinité pour un site de fixation et l'encombrement stérique généré par leur fixation. L'exploitation de la structure tridimensionnelle du transporteur AcrB d'*E. coli* par modélisation moléculaire offre de formidables opportunités pour étudier les relations structure-activité, en particulier l'influence des substitutions radicalaires.



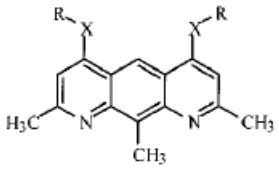
alkylaminoquinoline: composé 814



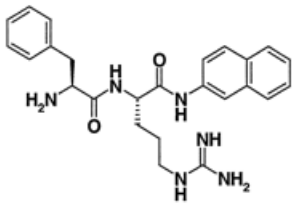
alkoxyquinoline: composé 905



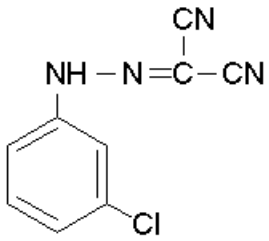
thioalkylaminoquinoline: composé 7d
(R=radical pipéridinoéthyl)



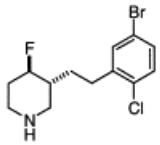
pyridoquinolines: composé 2a
(X=S; R=diméthylaminoéthyl)



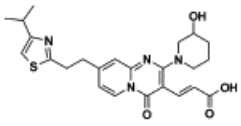
phénylalanyl-arginyl-β-naphtylamide



CCCP



arylpipérazines



pyridopyrimidines

Figure 14 : Structure chimique de quelques composés inhibiteurs d'efflux.

CHAPITRE II : RESULTATS

Les objectifs du travail

Les bactéries gram-négatives ont développé différents systèmes capables de reconnaître et d'expulser des molécules toxiques. Un transporteur RND se caractérise par une très large spécificité de substrats. Il forme un complexe tripartite avec une protéine adaptatrice ancrée dans la membrane interne et s'étendant largement dans le périplasme, et une protéine canal, localisée dans la membrane externe. Grâce à cette organisation, les antibiotiques peuvent être expulsés directement du cytoplasme vers le milieu extracellulaire. Les exemples les plus étudiés sont les pompes d'efflux AcrAB-TolC chez *E. coli* et MexAB-OprM chez *P. aeruginosa*.

Le laboratoire d'accueil a choisi d'étudier *Enterobacter aerogenes* comme modèle de bactérie nosocomiale. En effet, au cours de ces dix dernières années, *E. aerogenes* est devenu un pathogène nosocomial important en France. De nombreux isolats cliniques présentent un phénotype de résistance multiple aux antibiotiques.

L'efflux actif d'antibiotiques a été détecté dans plusieurs isolats cliniques d'*E. aerogenes* multirésistants (Malléa *et al.*, 1998). Les loci *acrAB* et *tolC* d'*E. aerogenes* ont été clonés et participent à la multirésistance dans un isolat clinique (Pradel & Pagès, 2002). Dans ce contexte, notre premier objectif était de poursuivre l'identification des différents systèmes d'efflux et l'étude de leur régulation dans cet organisme. Nous avons cloné l'opéron *eefABC*, codant une seconde pompe d'efflux d'antibiotiques tripartite, par complémentation d'un mutant *tolC* d'*E. coli*. Nous avons montré que l'expression du locus *eef* était réprimée par H-NS dans des conditions standard de laboratoire (article 1).

Afin de mieux comprendre les événements qui mènent à l'apparition d'un phénotype multirésistant et le rôle de l'efflux dans la multirésistance, nous avons choisi de caractériser des mutants d'*E. aerogenes* sélectionnés sur chloramphénicol. Ces études, réalisées *in vitro*, ont montré l'induction respective des pompes d'efflux EefABC et AcrAB-TolC dans les contextes ATCC 15038 et ATCC 13048. La résistance au chloramphénicol était la conséquence d'un efflux actif de cet antibiotique et le profil de multirésistance des deux types de variants était différent. De façon surprenante, les voies de régulation impliquées étaient différentes et indépendantes de celles déjà décrites (résultats présentés dans la discussion de l'article 1 ; article 2).

La détermination des structures 3D des composants MexA, AcrB et TolC ainsi que les travaux de reconstitution de plusieurs transporteurs et protéines « canal » ont considérablement enrichi notre compréhension du mécanisme d'efflux. Dans cette voie, notre second objectif était de mener des études structurales et fonctionnelles des protéines d'efflux d'*E. aerogenes*. Nous

avons d'abord mis au point des protocoles de surproduction et de purification des protéines AcrA, AcrB et TolC, en conditions natives (article 3). Grâce à une collaboration entamée avec le Département de Biochimie de l'Université de Cambridge, nous espérons obtenir des informations sur l'assemblage de ces trois partenaires. Nous avons ensuite comparé le comportement électrophysiologique des protéines TolC et EefC (article 4, en cours de préparation).

L'efflux d'antibiotiques représente un véritable défi pour le développement de nouveaux agents antibactériens. En considérant les pompes d'efflux comme de nouvelles cibles moléculaires, nous discutons des différentes alternatives envisagées pour lutter contre les infections à bactéries multirésistantes, et décrivons l'activité de molécules inhibitrices de l'efflux (revue acceptée pour publication dans Trends in Molecular Medicine).

ARTICLE 1 :

The *eefABC* multidrug efflux pump operon is repressed by H-NS in *Enterobacter aerogenes*. Muriel Masi, Jean-Marie Pagès, Claude Villard, and Elizabeth Pradel. J. Bacteriol. **187:** 3894-3897 (2005).

En l'absence de projet de séquençage du génome d'*E. aerogenes*, nous avons utilisé une banque génomique d'*E. aerogenes* pour complémenter des mutants *acrAB* ou *tolC* d'*Escherichia coli*. Premièrement, nous avons identifié les loci *acrAB* et *tolC* d'*E. aerogenes* et nous avons montré que la pompe AcrAB-TolC contribuait à la multirésistance dans un isolat clinique (Pradel & Pagès, 2002).

En utilisant la même approche, nous avons ensuite cloné le locus *eefABC* (*Enterobacter efflux*) par complémentation d'un mutant *tolC* d'*E. coli*. Ce locus est également capable de complémenter un triple mutant *acrAB tolC* d'*E. coli*. L'analyse de la séquence de cet opéron suggère qu'il code un nouveau système d'efflux tripartite, constitué d'une protéine périplasmique (EefA), d'un transporteur localisé dans la membrane interne (EefB) et d'une protéine canal localisée dans la membrane externe (EefC). Nous avons étudié le rôle de la pompe EefABC dans la multirésistance d'*E. aerogenes* et la régulation de son expression.

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, June 2005, p. 3894–3897 Vol. 187, No. 11
0021-9193/05/$08.00+0 doi:10.1128/JB.187.11.3894–3897.2005
Copyright © 2005, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

The *eefABC* Multidrug Efflux Pump Operon Is Repressed by H-NS in *Enterobacter aerogenes*

Muriel Masi,[1] Jean-Marie Pagès,[1]* Claude Villard,[2] and Elizabeth Pradel[1]†

Enveloppe bactérienne, Perméabilité et Antibiotiques, EA2197, IFR 48, Faculté de Médecine, Marseille, France,[1] and Plate-forme Protéomique, Faculté de Pharmacie, Marseille, France[2]

Received 15 December 2004/Accepted 18 February 2005

The *Enterobacter aerogenes eefABC* locus, which encodes a tripartite efflux pump, was cloned by complementation of an *Escherichia coli tolC* mutant. *E. aerogenes* Δ*acrA* expressing EefABC became less susceptible to a wide range of antibiotics. Data from *eef*::*lacZ* fusions showed that *eefABC* was not transcribed in the various laboratory conditions tested. However, increased transcription from P*eef* was observed in an *E. coli hns* mutant. In addition, EefA was detected in *E. aerogenes* expressing a dominant negative *E. coli hns* allele.

During the last decade *Enterobacter aerogenes* has emerged as an important nosocomial pathogen, usually affecting immunocompromised patients. This gram-negative bacterium is now the third most common pathogen recovered from the respiratory tract and is often isolated in the urine and gastrointestinal tracts (31). *E. aerogenes* strains isolated from hospitalized patients generally exhibit high resistance levels to a wide variety of antibiotics, including β-lactams, quinolones, chloramphenicol, and tetracyclines (5, 9, 20). In *E. aerogenes* and other gram-negative bacteria, the decrease of outer membrane permeability and the induction of active drug efflux contribute to multidrug resistance (MDR) (6, 20, 24). The well-studied AcrAB-TolC and MexAB-OprM multidrug efflux pumps are responsible for MDR in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, respectively (18, 26). These pumps belong to the resistance-nodulation-division (RND) family (27). RND-type drug efflux pumps share a common three-component organization across the two membranes: a periplasmic linker protein (AcrA, MexA), an inner membrane transporter (AcrB, MexB), and an outer membrane channel (TolC, OprM). The recent elucidations of the crystal structures of TolC and AcrB from *E. coli* and MexA from *P. aeruginosa* gave rise to major progress in the understanding of the efflux mechanism in gram-negative bacteria (13, 16, 22).

The entire *E. aerogenes* genome has yet to be sequenced; therefore, complementation was used to clone the drug efflux systems of *E. aerogenes*. An *E. aerogenes* genomic library has previously been screened for complementation of *E. coli acrAB* or *tolC* mutants. The *E. aerogenes acrAB* and *tolC* loci had been identified, and the AcrAB-TolC pump was shown to contribute to MDR in an *E. aerogenes* clinical isolate (29). In the present study, we used the same complementation approach to clone a novel multidrug efflux system of *E. aerogenes*, which we named EefABC (for *Enterobacter* efflux).

* Corresponding author. Mailing address: EA2197, Faculté de Médecine, 27 Bd. Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05, France. Phone: 33 (0) 4 91 32 45 87. Fax: 33 (0) 4 91 32 46 06. E-mail: jean-marie.pages@medecine.univ-mrs.fr.

† Present address: CIML, Inserm U631, case 906, 13288 Marseille cedex 09, France.

We found that *eefABC* expression is silent in laboratory growth conditions but induced in both an *E. coli hns* mutant and an *E. aerogenes* strain expressing a dominant negative H-NS protein from *E. coli*.

Cloning of the *E. aerogenes eefABC* operon and sequence analysis. We used a genomic library of *E. aerogenes* BW16627 in the form of a mini-Mu dI5166 lysate to complement *E. coli* EP663 *tolC* for growth on plates supplemented with 0.05% deoxycholate (DOC) (11, 29, 34). Among eight recombinant plasmids containing overlapping DNA fragments, we selected pEP770, which carries the shortest insert of about 13.5 kb. *E. coli* EP665 *acrAB tolC* was constructed by P1 transduction of EP663 (*tolC*::Tn*10*) with a phage lysate prepared on EP661 (Δ*acrAB*::Km^r). In contrast to *acrAB tolC* mutants, which are hypersusceptible to hydrophobic compounds (11, 26,34), EP665(pEP770) was able to grow on plates containing sodium dodecyl sulfate (SDS; 0.1%), DOC (0.05%), novobiocin (3 μg/ml), erythromycin (5 μg/ml), acriflavin (200 μg/ml), or ethidium bromide (10 μg/ml). This suggests that the *E. aerogenes* DNA insert in pEP770 encodes a complete tripartite efflux pump and not only a TolC homologue. Strains and plasmids used are shown in Table 1.

The nucleotide sequence of an 8-kb DNA region from pEP770 was determined and analyzed. Among the six open reading frames identified, the three adjacent, *orf3*, *orf4*, and *orf5*, were found to be homologous to efflux pump genes and were named *eefABC*. The *eef* genes are tightly linked and are probably transcribed as an operon. EefA shares 52% and 49% sequence identity with the MexA (*P. aeruginosa*) and AcrA (*E. aerogenes* and *E. coli*) periplasmic linker proteins, respectively. The N-terminal region of EefA exhibits characteristics of a signal sequence including a consensus lipoprotein-processing site (LSGC) (36). EefB shares 56% and 57% sequence identity with the MexB (*P. aeruginosa*) and AcrB (*E. aerogenes* and *E. coli*) inner membrane transporters, respectively. EefC presents 43%, 24%, and 22% sequence identity with the OprM (*P. aeruginosa*), TolC (*E. aerogenes*), and TolC (*E. coli*) outer membrane proteins, respectively. OprM has been shown to be acylated (23), and several *P. aeruginosa* OprM homologues are predicted to be lipoproteins as they all possess a characteristic lipoprotein box with a conserved cysteine residue immediately

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid	Description[a]	Source or reference
E. coli		
BW5104	Mu-1 Δ*lac-169 creB510 hsdR514*	17
EP661	BW5104 Δ*acrAB*::Km^r	29
EP663	BW5104 *tolC*::Tn*10* Tc^r	29
EP665	BW5104 Δ*acrAB*::Km^r *tolC*::Tn*10* Tc^r	This work
S17.1 λ*pir*	*recA thi pro hsdRM*$^+$ RP4::2-Tc::Mu::Km Tn7 lysogenized with λ *pir* phage	10
PS2209	Wild type	4
PS2652	PS2209 *hns-1001* Sm^r	4
E. aerogenes		
BW16627	ATCC 15038 *rpsL* Sm^r Amp^r	17
BW16662	ATCC 15038(pREG2-1, pEG5166S) Cm^r	17
BW16665	ATCC 15038(pREG2-1, pEG5166S) Cm^r	17
EAEP295	Nal^r derivative of BW16627	29
EAEP289	Km^s derivative of the EA27 MDR clinical isolate, Ap^r Cm^r Nal^r Sm^r Tc^r	29
EAEP308	EAEP289 Δ*acrA*	29
EAEP60	EAEP295 *eefA*::*lacZ* Km^r	This work
EAEP62	EAEP289 *eefA*::*lacZ* Km^r	This work
EAEP64	EAEP308 *eefA*::*lacZ* Km^r	This work
Plasmids		
Mu dI5166	Mini-Mu for in vivo cloning, Cm^r	12
pEP770	Mu dI5166 containing *eefABC* on a 13.5-kb insert, Cm^r	This work
pBCSK$^+$	High-copy-number cloning vector, Cm^r	Stratagene
pDrive	High-copy-number cloning vector, Ap^r Km^r	Qiagen
pEP867	pDrive containing *eefABC* on a 6-kb SspI insert, Ap^r Km^r	This work
pVIK112	*pir*-dependent *oriR6K,* suicide vector for *lacZ* transcriptional fusion, Km^r	15
pEP872	pVIK112 containing the *eefABC* promoter region on a 1.2-kb PstI-SacII fragment, Km^r	This work
pGEM-T	High-copy-number PCR cloning vector, Ap^r	Promega
pEP137	pGEM-T containing the *eefABC* promoter region on a 0.6-kb insert, Ap^r	This work
pFus2	Promoterless *lacZ* cloning vector, Gm^r	1
pUC4K	Source of Km^r cassette	Amersham Biosciences
pFus2-K	Km^r Gm^s derivative of pFus2, obtained by insertion of a BamHI Km^r cassette into the BglII site of the Gm^r gene of pFus2	This work
pMM38	pFus2-K containing the *eefABC* promoter region on a 0.6-kb BamHI fragment, Km^r	This work
pSU19	pACYC184 derivative, Cm^r	2
pDIA547	pSU19 containing the *E. coli hns* gene, Cm^r	4
pLG339	Low-copy-number cloning vector, *ori-pSC101* Tc^r Km^r	33
pLGH-NSL26P	pLG339 containing an *E. coli* dominant negative *hns* allele, Km^r Tc^r	35

[a] Ap^r, Cm^r, Gm^r, Km^r, Sm^r, and Tc^r, resistance to ampicillin, chloramphenicol, gentamicin, kanamycin, streptomycin, and tetracycline, respectively.

downstream of an N-terminal signal sequence (28). EefC contains such a lipoprotein box (*C*VSL); thus, it may be acylated.

EefABC is an MDR efflux pump in *E. aerogenes*. When *eefABC* was cloned into the pDrive vector downstream from the *lac* promoter, the resulting plasmid conferred substantial restoration of antibiotic resistance to EAEP308, although not to the levels of the AcrA$^+$ parent strain EAEP289 (Table 2).

TABLE 2. Resistance of *E. aerogenes* strains

Strain	Diam of growth inhibition (mm)[a] for drug:					
	CM	NFX	CIP	EM	TC[b]	DOX[b]
EAEP289, MDR	6	6	7	6	16	12
EAEP308(pDrive)	11	11	18	19	27	25
EAEP308(pEP867)	**6**	7	**10**	**10**	**20**	**16**
EAEP308(pLG339)	11	11	18	19	ND[c]	ND
EAEP308(pLGH-NSL26P)	**8**	11	18	**14**	ND	ND

[a] The diameter of the disks is 6 mm. CM, chloramphenicol (30 μg); NFX, norfloxacin (5 μg); CIP, ciprofloxacin (5 μg); EM, erythromycin (15 μg); TC, tetracycline (30 μg); DOX, doxycycline (30 μg). Boldface indicates values significantly different from control values.

[b] The influence of H-NSL26P on tetracycline antibiotic resistance could not be assessed as pLG339 carries a *tet* gene.

[c] ND, not determined.

Inner membrane extracts of EAEP308(pEP867) and EAEP308(pDrive) were analyzed by Western blotting with antibodies raised against *E. aerogenes* AcrA. A protein of about 37 kDa was detected in the EAEP308(pEP867) inner membrane, but not in that of EAEP308(pDrive) (Fig. 1, lanes 2 and 3). This observation suggests that the cross-reactive protein is EefA and that EefA production from the chromosomal *eefABC* locus is nondetectable in EAEP308.

The *eefABC* operon is cryptic in laboratory growth conditions. A suicide plasmid bearing an *eefA*::*lacZ* transcriptional fusion was introduced into EAEP295 (BW16627 background), EAEP289 (MDR strain), and EAEP308 (Δ*acrA*) (15). Integration of the *eefA*::*lacZ* suicide plasmid at the *eef* locus was confirmed by Southern blot analysis. A very weak activity of the reporter fusion was detected in the three resulting strains grown in Luria broth (LB) at 37°C (data not shown). EAEP289 lacks AcrR, the repressor of the *acrAB* operon; thus, *acrAB* is overexpressed in this strain (29). The absence of AcrR did not induce *eefA*::*lacZ* expression, suggesting that AcrR is not a repressor of *eefABC*.

Since transcription of multidrug efflux pumps can be induced by the presence of a relevant substrate in the growth medium (19, 30), we tested the effect of various antibiotics, detergents,

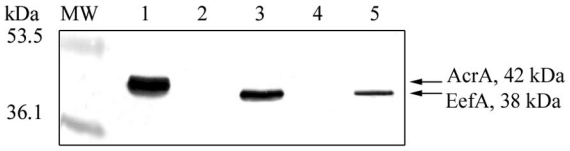


FIG. 1. Detection of EefA in *E. aerogenes* strains. Inner membrane proteins were prepared, and 10 μg was separated by SDS-PAGE on a 10% acrylamide gel, transferred to a nitrocellulose membrane, and immunodetected with antibodies raised against *E. aerogenes* AcrA. Lane 1, EAEP289; lane 2, EAEP308(pDrive); lane 3, EAEP308(pEP867); lane 4, EAEP308(pLG339); lane 5, EAEP308(pLGH-NSL26P).

bile salts, heavy metal salts, solvents, and dyes on the expression level of the *eefA*::*lacZ* fusion in EAEP60 (BW16627 background). We also varied temperature, osmolarity, pH, and O_2 growth conditions. We found no agent or condition that led to a detectable induction of the reporter fusion (data not shown).

In *E. aerogenes*, the overexpression of the global regulator MarA or RamA induces an MDR phenotype associated with an increase in AcrA production (7, 8). To decipher whether these efflux activators control *eef* expression, EAEP60 was transformed with multicopy plasmids bearing *marA* or *ramA*. We detected no induction of the reporter fusion when either MarA or RamA was overexpressed (data not shown), suggesting that the *eef* operon is not part of the MarA and RamA regulatory pathways or is strongly silenced by an upstream repressor.

H-NS is a repressor of *eefABC*. In *E. coli*, H-NS represses the expression of some multidrug efflux genes and deletion of *hns* confers MDR to an *acrAB*-deficient strain (25). We monitored the *eef* expression in an *E. coli hns* mutant by using a P*eef*::*lacZ* reporter plasmid. The 0.6-kb intergenic DNA region upstream of *eefABC* (P*eef*) was PCR amplified by using the primers *Bam*HI-P*eef*1 (5′ GGA-TCC-TTG-CGT-TTG-GCG-ATA-AGC 3′) and *Bam*HI-P*eef*2 (5′ GGA-TCC-TGA-GCG-AGG-CGG-TAG-TGC 3′) and *E. aerogenes* BW16627 genomic DNA as the template. The PCR product was cloned into pGEM-T to obtain pEP137. Digestion of pEP137 with BamHI released the 0.6-kb fragment, which was cloned into the BamHI site of pFus2-K to obtain pMM38, in which P*eef* controls *lacZ* expression. The P*eef*::*lacZ* expression level increased threefold in the *hns* mutant compared to the parental strain (Fig. 2). In addition, the P*eef*::*lacZ* expression level decreased upon transformation of the *hns* mutant with a plasmid bearing a wild-type *E. coli hns* copy. These results suggest that H-NS silences P*eef* activity in the heterologous host *E. coli*.

To evaluate the role of H-NS in *eef* regulation in *E. aerogenes*, we transformed EAEP308 Δ*acrA* with pLGH-NSL26P, which carries a dominant negative *E. coli hns* allele (35). Resistance to chloramphenicol and erythromycin was increased in EAEP308(pLGH-NSL26P) compared to EAEP308(pLG339) (Table 2). However, resistance to fluoroquinolones was not affected. Fluoroquinolones diffuse very efficiently across the bacterial membranes, so it is possible that the fluoroquinolone efflux is too slow to counterbalance entry. To assess EefA production, we analyzed inner membrane extracts of EAEP308(pLGH-NSL26P) and EAEP308(pLG339) by immunoblotting with antibodies raised against *E. aerogenes* AcrA. A single 37-kDa cross-reactive protein was detected in the inner membrane of the EAEP308

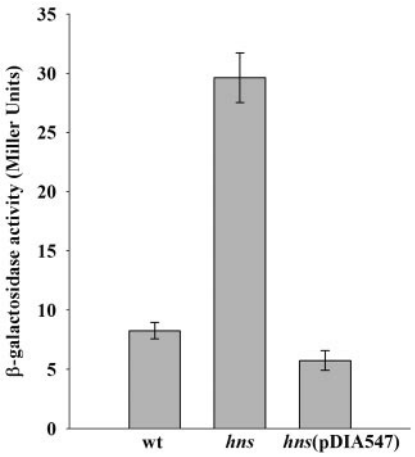


FIG. 2. Effect of H-NS on the expression of P*eef*::*lacZ* in *E. coli*. Histograms show β-galactosidase activity in *E. coli* PS2209 (wt), PS2652 (*hns*), and PS2652(pDIA547) carrying pMM38. β-Galactosidase was assayed on cells cultured overnight (21). The data are expressed as the means of a minimum of three independent experiments. Standard deviations were calculated.

expressing the dominant negative H-NSL26P but not in that of EAEP308(pLG339) (Fig. 1, lanes 4 and 5). Its expression level was 75% lower than that in EAEP308(pEP867) (Fig. 1, lanes 3 and 5). To identify this protein, whole-cell membranes of EAEP308 harboring pLG339 or pLGH-NSL26P were prepared and analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE). The first dimension was carried out on 7-cm isoelectrofocusing strips, pH 3 to 10 NL (Amersham Biosciences), in buffer containing 8 M urea, 2% Triton X-100, 10 mM dithiothreitol (DTT), and 0.5% IPG buffer, pH 3 to 10 (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). The second dimension was carried out on 12.5% SDS-polyacrylamide slab gels. Proteins were either visualized with colloidal Coomassie brilliant blue staining (Fig. 3A) or transferred to a nitrocellulose membrane and immunodetected with antibodies raised against *E. aerogenes* AcrA (Fig. 3B). Two immunoreactive

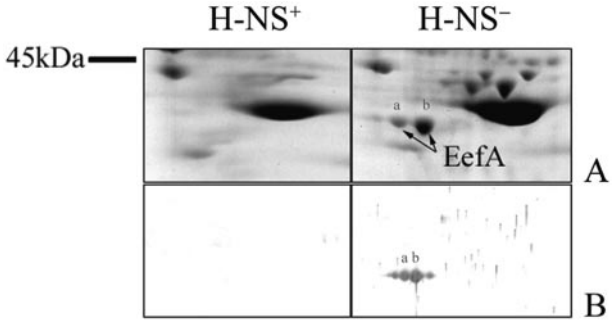


FIG. 3. 2D-PAGE analysis of the membrane protein profiles from EAEP308(pLG339) H-NS$^+$ and its H-NS$^-$ derivative expressing *E. coli* dominant negative H-NSL26P. Equal amounts of proteins (up to 100 μg) from strains to be compared were separated by 2D-PAGE. Proteins were either visualized with colloidal Coomassie brilliant blue staining (A) or transferred to a nitrocellulose membrane and immunodetected with antibodies raised against *E. aerogenes* AcrA (B). Only the region in the vicinity of the EefA spots is shown. EefA isoforms a and b are indicated by arrowheads.

spots (a and b in Fig. 3) were excised from the gel, in gel tryptic digested, and analyzed by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (32). In EAEP308(pLGH-NSL26P), an immunoreactive protein was resolved as a major spot of pI 5.3 and an apparent mass of 37 kDa, in agreement with the theoretical values computed from the EefA amino acid sequence. This protein was undetectable in extracts of EAEP308(pLG339) (Fig. 3). The peptide masses were used to search in sequence databases. The MALDI-TOF analysis of tryptic peptides from spots a and b accounted for 28 and 65% coverage of the *E. aerogenes* EefA precursor sequence tr Q8GC84, respectively, and the matching peptides were distributed throughout the entire sequence (data not shown).

Conclusions. Numerous H-NS target genes are involved in bacterial adaptation to stressful environmental conditions and virulence (3, 14). The biological relevance of the *eef* operon silencing is not known. However, like other commensal or pathogenic bacteria, *E. aerogenes* has to orchestrate drastic changes in its gene expression profile in order to adapt to the host-associated conditions. Further studies might decipher the regulation and physiological role of the *eef* operon.

Nucleotide sequence accession number. The nucleotide sequences of the *E. aerogenes eefABC* operon and flanking genes *regR* (*orf 1*), *act* (*orf 2*), and *yfeU* (*orf 6*) have been deposited in the GenBank database under accession number AJ508047.

We thank Philippe Bertin for generously providing strains and plasmids. We also thank Daniel Lafitte for mass spectrometry analysis, Jean-Michel Bolla for critical reading of the manuscript, and Ruth Winter for checking the English.

This work was supported by the Université de la Méditerranée.

REFERENCES

1. **Antoine, R., S. Alonso, D. Raze, L. Coutte, S. Lesjean, E. Willery, C. Locht, and F. Jacob-Dubuisson.** 2000. New virulence-activated and virulence-repressed genes identified by systematic gene inactivation and generation of transcriptional fusions in *Bordetella pertussis*. J. Bacteriol. **182:**5902–5905.
2. **Bartolome, B., Y. Jubete, E. Martinez, and F. de la Cruz.** 1991. Construction and properties of a family of pACYC184-derived cloning vectors compatible with pBR322 and its derivatives. Gene **102:**75–78.
3. **Beloin, C., and C. J. Dorman.** 2003. An extended role for the nucleoid structuring protein H-NS in the virulence gene regulatory cascade of *Shigella flexneri*. Mol. Microbiol. **47:**825–838.
4. **Bertin, P., E. Terao, E. H. Lee, P. Lejeune, C. Colson, A. Danchin, and E. Collatz.** 1994. The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **176:**5537–5540.
5. **Bosi, C., A. Davin-Regli, C. Bornet, M. Mallea, J. M. Pages, and C. Bollet.** 1999. Most *Enterobacter aerogenes* strains in France belong to a prevalent clone. J. Clin. Microbiol. **37:**2165–2169.
6. **Charrel, R. N., J. M. Pagès, P. De Micco, and M. Mallea.** 1996. Prevalence of outer membrane porin alteration in beta-lactam-antibiotic-resistant *Enterobacter aerogenes*. Antimicrob. Agents Chemother. **40:**2854–2858.
7. **Chollet, R., C. Bollet, J. Chevalier, M. Malléa, J. M. Pagès, and A. Davin-Regli.** 2002. *mar* operon involved in multidrug resistance of *Enterobacter aerogenes*. Antimicrob. Agents Chemother. **46:**1093–1097.
8. **Chollet, R., J. Chevalier, C. Bollet, J. M. Pages, and A. Davin-Regli.** 2004. RamA is an alternate activator of the multidrug resistance cascade in *Enterobacter aerogenes*. Antimicrob. Agents Chemother. **48:**2518–2523.
9. **De Gheldre, Y., M. J. Struelens, Y. Glupczynski, P. De Mol, N. Maes, C. Nonhoff, H. Chetoui, C. Sion, O. Ronveaux, and M. Vaneechoutte.** 2001. National epidemiologic surveys of *Enterobacter aerogenes* in Belgian hospitals from 1996 to 1998. J. Clin. Microbiol. **39:**889–896.
10. **de Lorenzo, V., and K. N. Timmis.** 1994. Analysis and construction of stable phenotypes in gram-negative bacteria with Tn5- and Tn10-derived minitransposons. Methods Enzymol. **235:**386–405.
11. **Fralick, J. A., and L. L. Burns-Keliher.** 1994. Additive effect of *tolC* and *rfa* mutations on the hydrophobic barrier of the outer membrane of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **176:**6404–6406.
12. **Groisman, E. A., and M. J. Casadaban.** 1986. Mini-mu bacteriophage with plasmid replicons for in vivo cloning and *lac* gene fusing. J. Bacteriol. **168:**357–364.
13. **Higgins, M. K., E. Bokma, E. Koronakis, C. Hughes, and V. Koronakis.** 2004. Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101:**9994–9999.
14. **Hommais, F., E. Krin, C. Laurent-Winter, O. Soutourina, A. Malpertuy, J. P. Le Caer, A. Danchin, and P. Bertin.** 2001. Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. Mol. Microbiol. **40:**20–36.
15. **Kalogeraki, V. S., and S. C. Winans.** 1997. Suicide plasmids containing promoterless reporter genes can simultaneously disrupt and create fusions to target genes of diverse bacteria. Gene **188:**69–75.
16. **Koronakis, V., A. Sharff, E. Koronakis, B. Luisi, and C. Hughes.** 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. Nature **405:**914–919.
17. **Lee, K. S., W. W. Metcalf, and B. L. Wanner.** 1992. Evidence for two phosphonate degradative pathways in *Enterobacter aerogenes*. J. Bacteriol. **174:**2501–2510.
18. **Li, X. Z., H. Nikaido, and K. Poole.** 1995. Role of *mexA-mexB-oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **39:**1948–1953.
19. **Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, and J. E. Hearst.** 1995. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **16:**45–55.
20. **Mallea, M., J. Chevalier, C. Bornet, A. Eyraud, A. Davin-Regli, C. Bollet, and J. M. Pagès.** 1998. Porin alteration and active efflux: two *in vivo* drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes*. Microbiology **144:**3003–3009.
21. **Miller, J.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
22. **Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita, and A. Yamaguchi.** 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. Nature **419:**587–593.
23. **Nakajima, A., Y. Sugimoto, H. Yoneyama, and T. Nakae.** 2000. Localization of the outer membrane subunit OprM of resistance-nodulation-cell division family multicomponent efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. **275:**30064–30068.
24. **Nikaido, H.** 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. Science **264:**382–388.
25. **Nishino, K., and A. Yamaguchi.** 2004. Role of histone-like protein H-NS in multidrug resistance of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **186:**1423–1429.
26. **Okusu, H., D. Ma, and H. Nikaido.** 1996. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. J. Bacteriol. **178:**306–308.
27. **Paulsen, I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiol. Rev. **60:**575–608.
28. **Paulsen, I. T., J. H. Park, P. S. Choi, and M. H. Saier, Jr.** 1997. A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Lett. **156:**1–8.
29. **Pradel, E., and J. M. Pagès.** 2002. The AcrAB-TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. Antimicrob. Agents Chemother. **46:**2640–2643.
30. **Rosenberg, E. Y., D. Bertenthal, M. L. Nilles, K. P. Bertrand, and H. Nikaido.** 2003. Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. Mol. Microbiol. **48:**1609–1619.
31. **Sanders, W. E., Jr., and C. C. Sanders.** 1997. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. Clin. Microbiol. Rev. **10:**220–241.
32. **Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann.** 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. Anal. Chem. **68:**850–858.
33. **Stoker, N. G., N. F. Fairweather, and B. G. Spratt.** 1982. Versatile low-copy-number plasmid vectors for cloning in *Escherichia coli*. Gene **18:**335–341.
34. **Whitney, E. N.** 1970. The *tolC* locus in *Escherichia coli* K-12. Genetics **67:**39–59.
35. **Williams, R. M., S. Rimsky, and H. Buc.** 1996. Probing the structure, function, and interactions of the *Escherichia coli* H-NS and StpA proteins by using dominant negative derivatives. J. Bacteriol. **178:**4335–4343.
36. **Yoneyama, H., H. Maseda, H. Kamiguchi, and T. Nakae.** 2000. Function of the membrane fusion protein, MexA, of the MexA, B-OprM efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa* without an anchoring membrane. J. Biol. Chem. **275:**4628–4634.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Par complémentation d'un mutant *tolC* d'*E. coli*, nous avons identifié un nouvel opéron d'efflux chez *E. aerogenes*. Un plasmide portant *eefABC* restaure la résistance vis-à-vis d'agent toxiques hydrophobes (tels que le DOC) et de nombreux antibiotiques (tels que le chloramphénicol et l'érythromycine) dans des mutants *acrAB* d'*E. coli* et d'*E. aerogenes*.

Nos résultats indiquent que *eefABC* est cryptique dans deux souches d'*E. aerogenes* cultivées dans des conditions standard de laboratoire. L'expression de nombreux systèmes d'efflux est inductible. La présence dans le milieu de molécules naturelles de signalisation (telles que le salicylate) ou d'antimicrobiens (tels que les antibiotiques, les sels biliaires, les solvants ou les métaux lourds) entraîne la surexpression de ces systèmes (Ma *et al.*, 1995 ; McClain *et al.*, 1996 ; Rouquette-Loughlin *et al.*, 2002 ; Rosenberg *et al.*, 2003). Malgré plusieurs essais, nous n'avons pas identifié les conditions de culture permettant l'expression de *eefABC*.

L'expression des gènes de résistance est souvent sous le contrôle de répresseurs spécifiques dont les gènes sont adjacents à ceux codant les pompes d'efflux. Or, aucun gène codant un régulateur potentiel n'est présent dans l'environnement immédiat de *eefABC*. Nous avons remarqué que la région promotrice de *eefABC*, soit les 287 pb entre les codons initiateurs *act* et *eefA*, est riche en AT (62 %). Le régulateur global H-NS se fixe préférentiellement aux séquences d'ADN courbées riches en AT et agit en compactant l'ADN (Dorman, 2004). La région promotrice possède des régions de forte courbure d'après l'analyse *in silico* du programme BEND-IT (http://hydra.icgeb.trieste.it/~kristian/dna/bend_it.htlm). Nous avons testé l'influence de H-NS sur l'expression de *eefABC*. Premièrement, nous avons montré la dé-répression d'une fusion P*eef ::lacZ* dans un mutant *hns* d'*E. coli*. Deuxièmement, nous avons détecté la protéine EefA dans une souche d'*E. aerogenes* exprimant une forme dominante négative de la protéine H-NS d'*E. coli*. Néanmoins, il nous faudra déterminer si la répression exercée par H-NS est directe ou indirecte. Chez *E. coli*, H-NS est une des protéines de liaison à l'ADN les plus abondantes (Dorman, 2004). Les homologues de H-NS sont très répandus parmi les entérobactéries et régulent l'expression de nombreux gènes, en inhibant la transcription dans la plupart des cas (Deighan *et al.*, 2000 ; Hommais *et al.*, 2001). Les gènes cibles de la régulation par H-NS sont impliqués dans l'adaptation des bactéries au stress et dans la virulence (Atlung & Ingmer, 1997 ; Beloin & Dorman, 2003). Le rôle de H-NS dans la multirésistance aux antibiotiques a été mis en évidence récemment. La protéine H-NS d'*E. coli* contrôle la multirésistance en réprimant l'expression de gènes d'efflux (Nishino & Yamaguchi, 2004). En conséquence, la

délétion du gène *hns* dans un mutant *acrAB* augmente son niveau de résistance. Dans notre travail, la dé-repression chromosomique de *eefABC* par H-NSL26P dans *E. aerogenes ΔacrA* augmente la résistance au chloramphénicol et à l'érythromycine. Malheureusement, le fait que H-NS régule l'expression de *eefABC* nous aide peu pour identifier les conditions physiologiques d'induction car les conditions abolissant les effets de H-NS sont inconnues. *In vitro*, les conditions qui réduisent la production de H-NS telles qu'une forte osmolarité, une basse température, un pH acide ou l'anaérobiose, n'ont pas permis d'induire l'expression de *eefABC* chez *E. aerogenes*, suggérant que la production de H-NS est toujours suffisante pour maintenir la répression de *eef*. L'hypothèse actuelle suggère que H-NS réprimerait ses gènes cibles en dehors de l'environnement intestinal, mais permettrait l'expression de gènes spécifiques en réponse à certains stimuli dans l'intestin ou dans un autre environnement *in vivo*. En effet, l'opéron *bgl* réprimé par H-NS est transcrit dans le foie de souris lors d'infections septicémiques dues à *E. coli* (Khan & Isaacson, 1998).

Les conditions d'expression et le rôle physiologique de *eefABC* chez *E. aerogenes* sont pour l'instant inconnus. Cependant, comme pour les autres bactéries commensales ou pathogènes, *E. aerogenes* doit orchestrer des changements drastiques de son profil d'expression pour s'adapter aux conditions de vie dans l'hôte.

Nous avons cloné le gène *hns* chez *E. aerogenes* BW16627 grâce à des amorces construites à partir des séquences flanquant *hns* d'*E. coli* et la région d'ADN correspondante de *K. pneumoniae*. La séquence des protéines H-NS d'*E. aerogenes* et d'*E. coli* partagent 60% d'identité sur un recouvrement de 135 acides aminés, dont le résidu leucine en position 26. Nous pourrons ainsi étudier en détails le rôle de H-NS sur l'expression de *eefABC* chez *E. aerogenes*.

Parallèlement à ce travail, nous avons isolé quatre mutants spontanés résistants au chloramphénicol après étalement de la souche de référence sensible BW16627 (ATCC 15038) sur des boîtes Luria-Bertani contenant une concentration en chloramphénicol de 90 µg/ml. Nous avons testé la sensibilité aux antibiotiques de ces quatre mutants. Bien que ces mutants aient été sélectionnés sur chloramphénicol, ils présentent tous un niveau de résistance élevé vis-à-vis de multiples antibiotiques comparé à la souche parentale (Tableau 1). L'addition de PAβN, un inhibiteur spécifique des pompes d'efflux, entraîne une diminution significative des concentrations minimales inhibitrices au chloramphénicol, à l'érythromycine et à la ticarcilline chez les quatre mutants. Ceci indique que la mutation à l'origine du phénotype multirésistant dans ces quatre mutants est associée à la surexpression d'une pompe d'efflux.

La multirésistance aux antibiotiques résulte parfois de la dé-répression d'un système d'efflux cryptique suite à un événement génétique induit par une pression sélective. Nous avons examiné l'expression de la pompe *eefABC* dans la souche parentale et dans les quatre mutants dérivés résistants au chloramphénicol en utilisant le plasmide rapporteur P*eef ::lacZ* décrit précédemment. Le niveau d'expression de la fusion P*eef ::lacZ* était de 180 à 330 fois supérieur dans les quatre mutants comparé à la souche sauvage (figure 1A). Nous avons analysé les profils protéiques totaux de la souche parentale et des quatre mutants dérivés résistants au chloramphénicol par immuno-détection en utilisant des anticorps dirigés contre les protéines AcrA et AcrB d'*E. coli*. Une protéine d'environ 37 kDa et une protéine d'environ 100 kDa régissant respectivement avec des anticorps dirigés contre AcrA et AcrB ont été détectées dans les quatre mutants. Ces deux protéines ne sont pas produites dans la souche sauvage parentale et correspondraient respectivement à EefA et EefB (figure 1B). Ensemble, ces résultats indiquent que la mutation sélectionnée par le chloramphénicol a conduit à la dé-répression du promoteur P*eef* et à la production des protéines d'efflux.

La surexpression de la pompe EefABC dans les quatre mutants résistants au chloramphénicol dérivés de la souche BW16627 suggère l'expression d'un activateur ou l'inhibition d'un répresseur. Nous avons commencé la comparaison des profils protéiques entre la souche BW16627 d'*E. aerogenes* et ses quatre mutants dérivés par électrophorèse bi-dimensionnelle afin d'identifier des variations d'expression de protéines régulatrices putatives.

Tableau 1

	CMIs (µg/ml) des souches					
	EAEP289	BW16627	CMR-1	CMR-2	CMR-3	CMR-4
	(MDR) [a]	(sauvage)	(surproducteurs EefABC)			
Chloramphénicol	512	**32**	**128**	**128**	**128**	**128**
Tétracycline	8	**2**	**4**	**4**	**4**	**4**
Norfloxacine	128	1	1	1	1	1
Ciprofloxacine	32	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Erythromycine	256	**64**	**512**	**512**	**512**	**512**
Télithromycine	64	8	16	16	16	16
Ticarcilline	ND	**2**	**16**	**16**	**16**	**16**
Amikacine	2 (0.08)*	1 (0.04)	1 (0.04)	ND [b]	ND	ND
DOC	>80,000	80	80	ND	ND	ND
SDS	>40,000	40	40	ND	ND	ND
Acriflavine	128	64	128	128	128	128

* : Les concentrations minimales inhibitrices (CMIs) ont été déterminées par dilutions en cascade dans du milieu Mueller-Hinton pour chaque antibiotique et dans du milieu Nutrient, pauvre en sels, pour la classe des aminoglycosides.

[a] MDR : *multidrug resistant*

[b] ND : non déterminé

Tableau 2

	CMIs (µg/ml) pour					
	Chloramphénicol		Erythromycine		Ticarcilline	
PAβN (26.3 µg/ml)	-	+	-	+	-	+
souches d'*E. aerogenes*						
BW16627	32	2	64	1	2	1
CMR-1	128	2	512	2	16	4
CMR-2	128	2	512	2	16	4
CMR-3	128	2	512	2	16	4
CMR-4	128	2	512	2	16	4

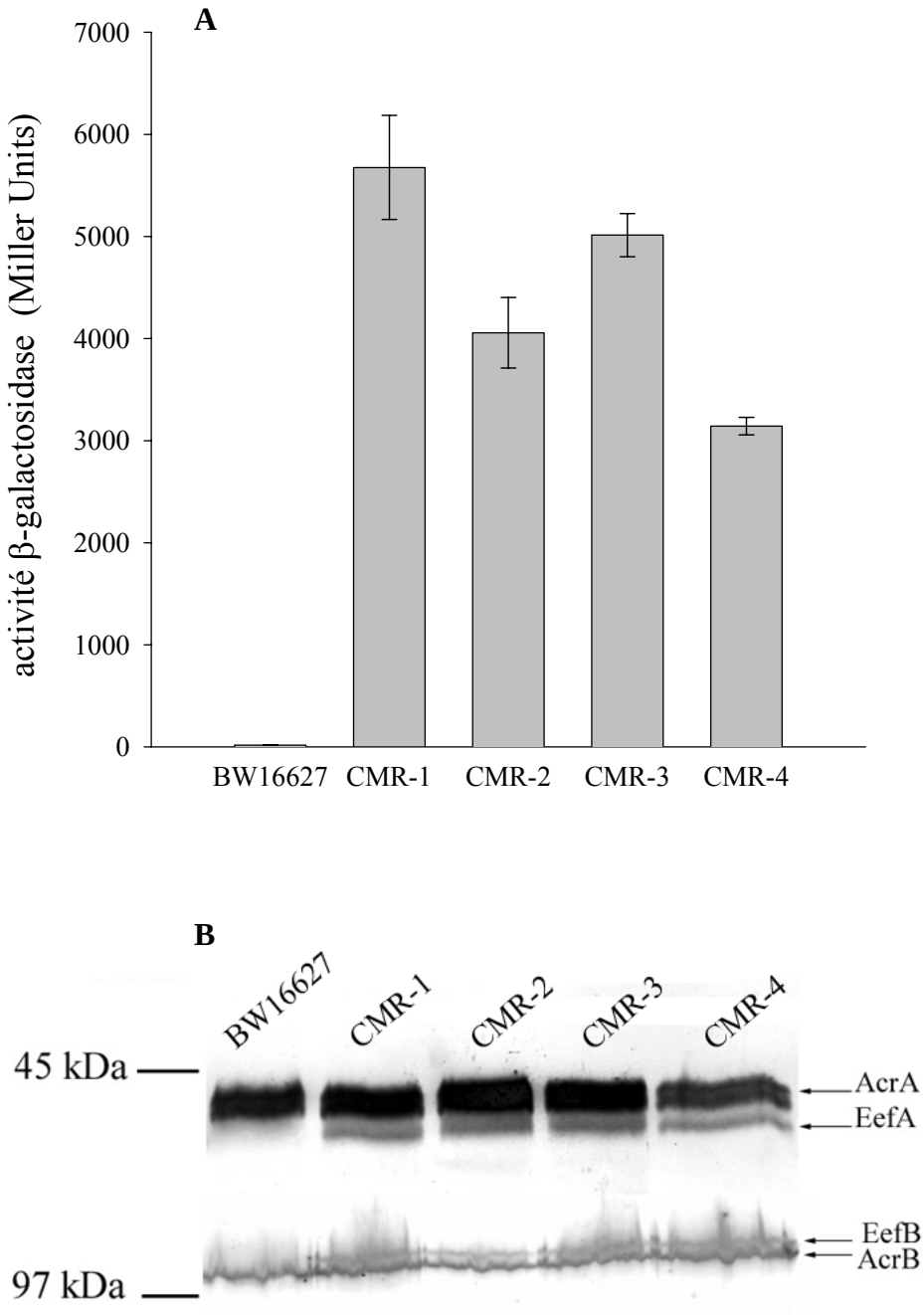


Figure 1. Expression de *eefABC* dans *E. aerogenes* BW16627 sauvage et ses quatre mutants dérivés résistants au chloramphénicol (CMR-1 à 4). (A) Expression de la fusion P*eef ::lacZ*. L'activité β-galactosidase a été mesurée sur des cellules cultivées sur la nuit. Les résultats sont l'expression d'au moins trois expériences indépendantes et les barres d'erreur sont indiquées. (B) Immuno-détection de EefA et EefB. Les extraits protéiques totaux ont été séparés par SDS-PAGE, transférés sur nitrocellulose et révélés avec des anticorps dirigés contre les protéines AcrA (panneau supérieur) ou AcrB (panneau inférieur) d'*E. coli* (don de V. Koronakis).

ARTICLE 2 :

Chloramphenicol and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogene*s. Didier Ghisalberti[*], Muriel Masi[*], Jean-Marie Pagès and Jacqueline Chevalier. Biochem. Biophys. Res. Comm. **328:**1113-1118 (2005).

E. aerogenes est une bactérie capable de s'adapter rapidement à l'antibiothérapie au cours du traitement d'infections nosocomiales. Il est donc important d'analyser les effets de molécules antibiotiques sur une souche sensible d'*E. aerogenes*.

Le chloramphénicol est un antibiotique bactériostatique qui inhibe la synthèse des protéines. C'est aussi un sélecteur puissant de mutants Mar (*Multiple Antibiotic Resistance*) d'*E. coli* (Cohen *et al.*, 1989 ; Mc Murry *et al.*, 1994).

Dans ce travail, nous avons étudié l'évolution du profil de résistance de variants d'*E. aerogenes* entraînés sur des concentrations croissantes de chloramphénicol *in vitro*, afin de rechercher des éléments de réponse quant à l'émergence de la multirésistance en clinique. Nous avons entraîné la souche *E. aerogenes* ATCC 13048 sur chloramphénicol selon la méthode des gradients de Szybalski (8-16 ; 16-64 et 64-128 µg/ml). Nous avons étudié le variant CM-64, capable de pousser en présence de 64 µg/ml de chloramphénicol, la variation de la sensibilité à plusieurs antibiotiques et les modifications du profil protéique membranaire en ciblant à la fois les protéines intervenant dans les mécanismes de perméabilité et d'efflux. Les relations entre l'apparition de la multirésistance et l'expression de régulateurs connus ont été recherchées.

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Biochemical and Biophysical Research Communications 328 (2005) 1113–1118
BBRC
www.elsevier.com/locate/ybbrc

Chloramphenicol and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*

Didier Ghisalberti[1], Muriel Masi[1], Jean-Marie Pagès*, Jacqueline Chevalier

Enveloppe Bactérienne, Perméabilité et Antibiotiques, EA2197, IFR48, Faculté de Médecine, Université de la Méditerranée, 27 Boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France

Received 5 January 2005
Available online 26 January 2005

Abstract

Chloramphenicol has been reported to act as an inducer of the multidrug resistance in *Escherichia coli*. A resistant variant able to grow on plates containing 64 μg/ml chloramphenicol was obtained from the *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048-type strain. Chloramphenicol resistance was due to an active efflux of this antibiotic and it was associated with resistance to fluoroquinolones and tetracycline, but not to aminoglycoside or β-lactam antibiotics. MDR in the chloramphenicol-resistant variant is linked to the overexpression of the major AcrAB–TolC efflux system. This overexpression seems unrelated to the global Mar and the local AcrR regulatory pathways.
© 2005 Published by Elsevier Inc.

Keywords: Efflux pump; *Enterobacter aerogenes*; Chloramphenicol; Efflux pump inhibitor; Multidrug resistance

Enterobacter aerogenes has emerged as an important hospital pathogen since the 1990s [1–4]. *E. aerogenes* strains isolated from hospitalized patients generally exhibit high resistance to a broad spectrum of antibiotics, including third generation cephalosporins [5]. In addition, several studies indicated that a reduction in porin synthesis is involved in the decreased sensitivity to the most recently developed cephalosporins, including cefepime and cefpirome, and carbapenems [2,6]. Imipenem is often used in intensive care units to treat patients infected by *E. aerogenes*, but it is leading to an increasing number of antibiotic resistant strains. Several studies have reported that both clinical isolates and imipenem resistant variants present a high level of resistance to β-lactam antibiotics and to chemically unrelated drugs. In *E. aerogenes* isolates, this phenotype was related to a lack of porin in the outer membrane and/or an alteration of the lipopolysaccharide [2,7,8]. Moreover, we have recently shown that imipenem in vitro selects *E. aerogenes* resistant variants that exhibit an activation of the multidrug resistant (MDR) mechanisms including outer impermeability and active efflux [9].

The aim of this study was to characterize the chloramphenicol-directed selection and compare the selected strain to resistant clinical isolates. To investigate chloramphenicol as a potent selector for multidrug resistance phenotype in *E. aerogenes* as previously mentioned in *Escherichia coli* [10,11], we selected resistant variant by cultivating *E. aerogenes* susceptible strain under increasing chloramphenicol concentrations. The resulting variant exhibited resistance not only to chloramphenicol but also to other chemically unrelated antibiotics. The genetic and biochemical characteristics of this strain were defined to determine the involvement of AcrAB–TolC pump in the multidrug resistance.

* Corresponding author. Fax: +33 4 91 32 46 06.
E-mail address: Jean-Marie.Pages@medecine.univ-mrs.fr (J.-M. Pagès).
[1] These authors contributed equally to the work.

0006-291X/$ - see front matter © 2005 Published by Elsevier Inc.
doi:10.1016/j.bbrc.2005.01.069

Materials and methods

Bacterial strains, growth media, and selection of chloramphenicol resistant strain. Bacteria were grown at 37 °C in Luria–Bertani (LB) broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). *E. aerogenes* ATCC 13048-type strain was used as the control strain. The strain CM-64 was obtained from ATCC 13048 by growing on Szybalski gradient with concentration steps of 8–16, 16–64, and 32–128 μg/ml chloramphenicol. The resulting strain, CM-64, was routinely cultivated with 64 μg/ml chloramphenicol.

DNA manipulations. Plasmid DNA was prepared by using a Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System kit (Promega, Madison, WI, USA). *E. aerogenes* genomic DNA was prepared by using a Wizard genomic DNA purification kit (Promega). *marR* and *acrR* were amplified by PCR with corresponding primers previously described [12,13]. DNA sequencing was carried out using custom-synthesized primers at Eurogentec Sequencing Department, Seraing, Belgium.

Antibiotic susceptibility tests. Susceptibility to imipenem, cefepime, ceftazidime, nalidixic acid, norfloxacin, chloramphenicol, florfenicol, gentamicin, and tetracycline (Merck Sharp Dohme and Chibret, Paris, France; Bristol-Myers Squibb, Paris, France; and Sigma Chemical, MO, USA) was measured by the broth dilution method, as previously described [14]. Approximately 10^6 cells were inoculated into 1 ml Mueller Hinton broth containing twofold serial dilutions of each antibiotic. Results were read after 18 h at 37 °C and are expressed as minimal inhibitory concentrations (MICs) in μg/ml. The efflux pump inhibitor phenylalanine-arginine β-naphthylamide, PAβN [15], was used as previously described [16].

Preparation of membrane fractions, SDS–PAGE, and immunodetection. Whole-membrane fractions were prepared from 20 ml mid-exponential phase cultures. Bacteria were harvested, washed, and resuspended in 2 ml cold TE (10 mM Tris–HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0). Cells were lysed by sonication and cellular debris were removed by centrifugation (5000*g*; 15 min; 4 °C). Whole membranes were recovered from the supernatant by ultracentrifugation (100,000*g*; 60 min; 4 °C) and incubated in 0.3% *N*-laurylsarcosinate for 30 min at room temperature. The insoluble outer membrane fractions were pelleted by centrifugation (100,000*g*; 60 min; 4 °C). Proteins were resuspended in 1× 3% SDS sample buffer and heated for 5 min at 96 °C. Protein concentration was determined by using the RC-DC protein assay kit (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Equal amounts of proteins (up to 10 μg) from strains to be compared were separated by 10% SDS–PAGE and electrotransferred onto a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Keene NH, USA). Membranes were probed with antibodies raised against *E. coli* OmpF (1:1000 dilution), *E. coli* AcrA (1:50,000 dilution), *E. coli* TolC (1:4000 dilution) or antipeptide antibodies anti-FloR (1:1000 dilution). Immunoreactive proteins were visualized with alkaline phosphatase-conjugated anti-rabbit secondary antibodies.

β-Galactosidase assays. β-Galactosidase was assayed on cells cultured to the mid-exponential phase of growth according to the method of Miller [17]. Salicylate was added to final 5 mM and growth was carried out for 1 h at 37 °C. The experiments were reproduced at least three times.

Detection of chloramphenicol acetyl transferase. A chemical chloramphenicol acetyl transferase assay was performed using the method reported by Walker and Brown [18]. Acetyl coenzyme A and 5,5′-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DNTB) were used as reagents. A positive reaction was indicated by the development of a deep yellow colour.

Chloramphenicol uptake. The uptake of [^{14}C]chloramphenicol by intact cells has been described previously [16,19]. Briefly, exponential-phase bacteria grown in LB broth were pelleted, washed once, and suspended to a density of 10^{10} CFU/ml in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7, containing 5 mM magnesium chloride. The [^{14}C]chloramphenicol was a generous gift from Aventis Pharma (Romainville, France). [^{14}C]Chloramphenicol (specific radioactivity, 59.46 mCi/mmol) was added to 500 μl cell suspension at 37 °C in a shaking water bath, yielding a final chloramphenicol concentration of 5 μM. At various intervals, 100 μl of the suspension was removed and immediately filtered through GF/C filters (Whatman, Maidstone, Kent, UK). After three washes with 5 ml cold buffer (50 mM sodium phosphate buffer containing 0.1 M lithium chloride), filters were dried and radioactivity was measured in a Packard scintillation counter. To de-energize the bacteria, 50 μM carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) was added 10 min before the radiolabelled antibacterial agent.

Results

Antibiotic resistance and membrane protein expression of selected variants

A chloramphenicol resistant derivative was obtained from *E. aerogenes* ATCC 13048-type strain sequentially cultured in the presence of chloramphenicol (4–128 μg/ml). The resulting CM-64 variant exhibited significant resistance to chloramphenicol and florfenicol with a 64- and 32-fold increase, respectively, compared to parental strain (Table 1). In addition, with regard to quinolones and tetracycline, MICs for CM-64 variant were noticeably higher than those observed for the parental strain (Table 1): about 32- and 16-fold increases were observed with nalidixic acid and norfloxacin, respectively. In contrast, the susceptibilities to gentami-

Table 1
Antibiotic susceptibility of the *E. aerogenes* strains

E. aerogenes strains	MIC (μg/ml)								
	CM	FM	IMI	CAZ	FEP	TC	NAL	NFX	GM
ATCC13048 (+PAβN)	4 (2)	8 (2)	0.25	0.5 (0.5)	0.125 (0.25)	2 (2)	4 (1)	0.125 (0.25)	1 (1)
CM-64 (+PAβN)	256 (8)	256 (8)	0.25	1 (0.5)	0.5 (0.25)	16 (4)	128 (1)	2 (0.5)	1 (1)
EA5 (+PAβN)	512 (64)	nd	4	512	64	8 (4)	256 (128)	256 (128)	2 (2)
EA27 (+PAβN)	512 (64)	nd	8	512	64	16 (2)	512	256 (64)	2 (2)

Antimicrobial agent abbreviations: CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; IMI, imipenem; NAL, nalidixic acid; NFX, norfloxacin; CM, chloramphenicol; FM, florfenicol; TC, tetracycline; GM, gentamicin; and nd, not done. Values are means of three independent determinations. PAβN was used at 26.3 μg/ml.

cin and β-lactam antibiotics were not affected. These results are quite divergent to those obtained with EA5 and EA27, two MDR clinical strains previously described [12,14], which are fully resistant to all drugs tested including β-lactams (Table 1).

No significant chloramphenicol acetyl transferase activity was detected in the CM-64 resistant variant, indicating the absence of an enzymatic barrier for chloramphenicol activity (data not shown).

SDS–PAGE analysis of outer membrane proteins and expression of the AcrAB–TolC efflux pump components

SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and Western-blot analysis of the outer membrane proteins showed no variation in the expression of the major non-specific porin Omp36 in the CM-64 variant compared to that in parental strain (Fig. 1). This result is consistent with the unaffected susceptibility to β-lactams of the CM-64 variant compared to that of the parental strain. We had previously identified the *E. aerogenes acrAB* and *tolC* genes, and showed that the AcrAB–TolC pump contributes to MDR in various *E. aerogenes* clinical isolates [12,19]. A significant overexpression of the AcrA and TolC efflux proteins was observed by immunoblotting analyses (Fig. 2). FloR had been shown to act as a phenicol-selective pump in *Salmonella* [20]. However, no FloR expression was detected in our strains with a specific anti-FloR antibody (data not shown).

Evidence for an active drug efflux PAβN and CCCP sensitive in the resistant variant

We investigate the uptake of radiolabelled chloramphenicol and compared the intracellular accumulation

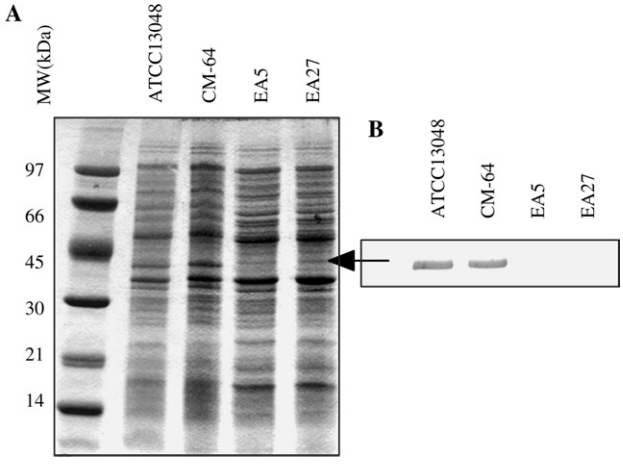


Fig. 1. Outer membrane analyses of *E. aerogenes* strains. Outer membrane proteins (10 μg) were separated by 10% SDS–PAGE. Proteins were either visualized with Coomassie blue staining (A) or transferred onto a nitrocellulose membrane and immunodetected with antibodies raised against *E. coli* OmpF (B). Arrow indicates the position of Omp36. Molecular weight standards are indicated.

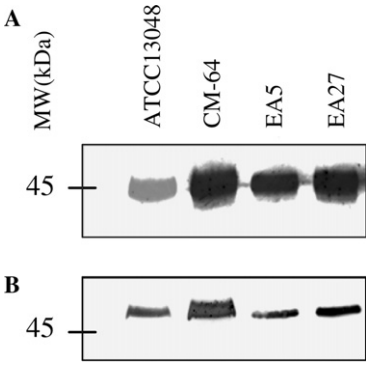


Fig. 2. Immunodetection of AcrA and TolC in *E. aerogenes* strains. Whole-membrane proteins (5 and 10 μg, respectively) were separated by 10% SDS–PAGE transferred onto a nitrocellulose membrane, and immunoblotted with antibodies raised against *E. coli* AcrA (A) or *E. coli* TolC (B).

of this drug in the resistant variant and the sensitive ATCC 13048 strain. Since chloramphenicol efflux is energy dependent, incubation with an uncoupler will clearly illustrate the presence of an active efflux pump expelling intracellular drug [9,16,19]. No significant drug efflux was observed in ATCC 13048 strain as previously reported [9] while a CCCP-sensitive efflux was evidenced in the CM-64 variant (Fig. 3). The energy uncoupler, which collapses the proton gradient across the cytoplasmic membrane and alters the energy of drug efflux pump, restored significant chloramphenicol accumulation in the variant (Fig. 3). To analyze the effect of PAβN on chloramphenicol accumulation, the intracellular level of radiolabelled drug was evaluated after 5 min incubation in the absence or presence of the efflux pump inhibitor. The results presented in Table 2 showed an increase of chloramphenicol in strains that exhibit an

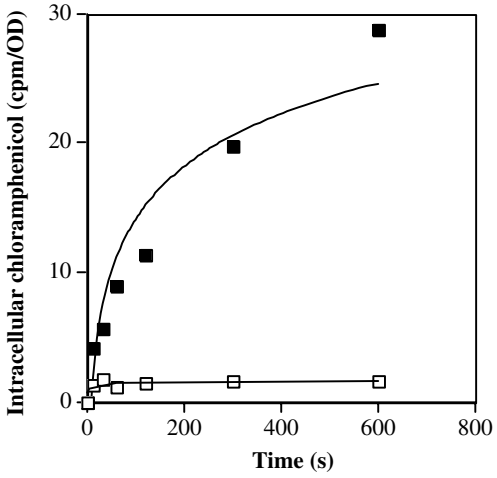


Fig. 3. Uptake of [^{14}C]chloramphenicol by *E. aerogenes* strains. Accumulation of [^{14}C]chloramphenicol was measured in *E. aerogenes* CM-64 in the absence (□) and in the presence (■) of CCCP. Each point is the mean of four independent experiments.

Table 2
Effect of efflux pump inhibitor on chloramphenicol accumulation

Inhibitor	% of accumulated chloramphenicol (5 min)			
	ATCC13048	CM-64	EA5	EA27
0	100	100	100	100
PAβN	120	390	210	200

Values are means of duplicate determinations.

efflux pump. These results indicate that the MDR phenotype in CM-64 is associated with the expression of an energy-dependent efflux pump.

To assess the presence of an active efflux concerning other antibiotics, we compared the corresponding MICs of the resistant variant in the absence or in the presence of the efflux pump inhibitor PAβN [14,19]. The inhibitor increased the susceptibilities not only to chloramphenicol but to structurally unrelated antibiotics, nalidixic acid, norfloxacin, and tetracycline, while the MICs for cephalosporins were unchanged (Table 1). The significant recovery of drug susceptibilities clearly indicates that an active efflux determined the resistance to these antibiotics.

Genetic analyses of the chloramphenicol variant

MDR phenotypes can be the consequence of mutations located in a regulatory gene [12,13,21–23]. To test this hypothesis, we looked for possible mutations in the *marR* and *acrR* genes, which have been described to play a key role in the multidrug resistance of *E. aerogenes*. The sequence comparison of the genes in the variant CM-64 with the ATCC 13048 strain indicated no mutation in these regulators. Similarly, no mutations were detected in the two corresponding genes in the EA5 strain when a deletion has been previously reported in EA27 *acrR* [12].

To confirm that *mar* activation is not involved in the emergence of the MDR phenotype in CM-64, we investigated the MarA expression level using a *marA::lacZ* transcriptional fusion (R. Chollet, Thesis and personal communication). First, we observed a similar basal expression of the *marA::lacZ* fusion in the CM-64 variant compared to the parental strain; second, a reproducible 2-fold increase of the *marA::lacZ* expression level was conserved in both strains upon addition of 5 mM salicylate (data not shown). These results indicate that a *mar*-independent pathway has been selected in CM-64.

Discussion

Enterobacter aerogenes is a commensal Gram-negative bacterium which rapidly responds to antibiotic therapy during the treatment of nosocomial infections [2], thus it is important to analyze the effect of antibiotic molecules on sensitive *E. aerogenes*. We previously reported the expression of MDR phenotype in sensitive cells after salicylate or imipenem addition [9,13]. Resistance to chloramphenicol may be mediated either enzymatically via acetylation of the drug or mechanically via drug efflux. In this work, we showed that chloramphenicol can select *E. aerogenes* variant which overexpresses a drug efflux pump.

In addition to phenicol group, the chloramphenicol variant is resistant to structurally unrelated drugs such as quinolones and tetracycline. Interestingly, in this strain, we observe the preservation of β-lactam and gentamicin susceptibilities. The level of resistance concerning phenicols and quinolones is reversed by the addition of PAβN, an efflux pump inhibitor. The genetic analysis indicated that no mutations in *acrR* and in *marR* are involved in the efflux pump expression. In addition, we observed no derepression of the *mar* regulon. The protein analysis of the membrane using specific antisera clearly indicated an overexpression of AcrA, involved in the AcrAB–TolC pump complex, while no modification of major porin Omp36 was observed in the chloramphenicol variant. This suggests that the chloramphenicol selection increased the expression level of the AcrAB–TolC efflux system which could participate in the drug resistant phenotype in CM-64. It is important to mention that in several clinical isolates, the expression of the efflux pump is generally associated with a marked alteration of porin synthesis [10,19]. Some studies have reported that certain molecules, such as salicylate and chloramphenicol, can modulate antibiotic resistance levels via the *mar* operon in *E. coli* [10,11,21,24,25]. We recently described a similar effect of imipenem in *E. aerogenes* [9]. The genetic cascade activated by these effectors simultaneously induces the expression of efflux pump and the repression of porin synthesis with the corresponding β-lactam resistance. It is worthy of note that in the present study, we have observed no decrease of the porin synthesis in the chloramphenicol variant. Interestingly, recent studies concerning the drug efflux in *Klebsiella pneumoniae* report that the overexpression of AcrAB–TolC pump is not systematically associated with the porin failure in resistant isolates [26,27]. Here, the selection of chloramphenicol resistant *E. aerogenes* strain may occur via a pathway other than the general *mar* regulon which is reported in the chloramphenicol resistant *E. coli* strains. Interestingly, similar data concerning the regulation of the efflux pump in *Salmonella* indicate that bile salt increases the resistance to chloramphenicol independently of *mar* regulon [28].

Alternatively, other regulatory pathways like SoxS, Rob or RamA may be involved [16,29–31], but these regulators also modulate the porin expression and we did not observe any modification of porin expression

in CM-64 strain. This study demonstrates the capacity of chloramphenicol to select the expression of an active efflux mechanism via a mar-independent pathway that does not modify porin synthesis; in *E. aerogenes*, this multidrug pump mechanism directly contributes to the resistance towards phenicol derivatives in addition to other structurally non-related antibiotics.

Acknowledgments

We thank Aventis Pharma (Romainville, France) for its generous gift of radiolabelled chloramphenicol, V. Koronakis for generously providing *E. coli* anti-AcrA and anti-TolC antisera, and A. Cloeckaert for providing anti-FloR antibodies. We are indebted to C. Bollet and A. Davin-Regli for helpful advice and discussions. This work was supported by the Université de la Méditerranée.

References

[1] C. Arpin, C. Coze, A.M. Rogues, J.P. Gachie, C. Bebear, C. Quentin, Epidemiological study of an outbreak due to multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* in a medical intensive care unit, J. Clin. Microbiol. 34 (1996) 2163–2169.

[2] C. Bornet, A. Davin-Regli, C. Bosi, J.-M. Pagès, C. Bollet, Imipenem resistance of *Enterobacter aerogenes* mediated by outer membrane permeability, J. Clin. Microbiol. 38 (2000) 1048–1052.

[3] R. Canton, A. Oliver, T.M. Coque, M. del Carmen Varela, J.C. Perez-Diaz, F. Baquero, Epidemiology of extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a spanish hospital during a 12-year period, J. Clin. Microbiol. 40 (2002) 1237–1243.

[4] Y. De Gheldre, M.J. Struelens, Y. Glupczynski, P. De Mol, N. Maes, C. Nonhoff, H. Chetoui, C. Sion, O. Ronveaux, M. Vaneechoutte, National epidemiologic surveys of *Enterobacter aerogenes* in belgian hospitals, J. Clin. Microbiol. 39 (2001) 889–896.

[5] C. Bosi, A. Davin-Regli, C. Bornet, M. Malléa, J.-M. Pagès, C. Bollet, Most *Enterobacter aerogenes* strains in France belong to a prevalent clone, J. Clin. Microbiol. 37 (1999) 2165–2169.

[6] R.N. Charrel, J.-M. Pagès, P. DeMicco, M. Malléa, Prevalence of outer membrane porin alteration in β-lactam-antibiotic-resistant *Enterobacter aerogenes*, Antimicrob. Agents Chemother. 40 (1996) 2854–2858.

[7] J.M. Hopkins, K.J. Towner, Enhanced resistance to cefotaxime and imipenem associated with outer membrane protein alterations in *Enterobacter aerogenes*, J. Antimicrob. Chemother. 25 (1990) 49–55.

[8] H. Leying, W. Cullmann, W. Dick, Carbapenem resistance in *Enterobacter aerogenes* is due to lipopolysaccharide alterations, Chemotherapy 37 (1991) 106–113.

[9] C. Bornet, R. Chollet, M. Malléa, J. Chevalier, A. Davin-Regli, J.-M. Pagès, C. Bollet, Imipenem and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 301 (2003) 985–990.

[10] S.P. Cohen, L.M. McMurry, D.C. Hooper, J.S. Wolfson, S.B. Levy, Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: Decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction, Antimicrob. Agents Chemother. 33 (1989) 1318–1325.

[11] L.M. McMurry, A.M. George, S.B. Levy, Active efflux of chloramphenicol in susceptible *Escherichia coli* strains and in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants, Antimicrob. Agents Chemother. 38 (1994) 542–546.

[12] E. Pradel, J.-M. Pagès, The AcrAB–TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *E. aerogenes*, Antimicrob. Agents Chemother. 46 (2002) 2640–2643.

[13] R. Chollet, C. Bollet, J. Chevalier, M. Malléa, J.-M. Pagès, A. Davin-Regli, *mar* operon involved in multidrug resistance of *Enterobacter aerogenes*, Antimicrob. Agents Chemother. 46 (2002) 1093–1097.

[14] M. Malléa, J. Chevalier, C. Bornet, A. Eyraud, A. Davin-Regli, C. Bollet, J.-M. Pagès, Porin alteration and active efflux: Two in vivo drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes*, Microbiology 144 (1998) 3003–3009.

[15] O. Lomovskaya, M.S. Warren, A. Lee, J. Galazzo, R. Fronko, M. Lee, J. Blais, D. Cho, S. Chamberland, T. Renau, R. Leger, S. Hecker, W. Watkins, K. Hoshino, H. Ishida, V.J. Lee, Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel agents for combination therapy, Antimicrob. Agents Chemother. 45 (2001) 105–116.

[16] M. Malléa, J. Chevalier, A. Eyraud, J.-M. Pagès, Inhibitors of antibiotic efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains, Biochem. Biophys. Res. Commun. 293 (2002) 1370–1373.

[17] J. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1972.

[18] C.W. Walker, D.J.F. Brown, The reliability of methods for detecting chloramphenicol resistance in *Haemophilus influenzae*, J. Antimicrob. Chemother. 22 (1988) 905–910.

[19] S. Gayet, R. Chollet, G. Molle, J.-M. Pagès, J. Chevalier, Modification of outer membrane protein profile and evidence suggesting an active drug pump in *Enterobacter aerogenes* clinical strains, Antimicrob. Agents Chemother. 47 (2003) 1555–1559.

[20] S. Schwarz, C. Kehrenberg, B. Doublet, A. Cloeckaert, Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol, FEMS Microbiol. Rev. 28 (2004) 519–542.

[21] M.N. Alekshun, S.B. Levy, Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the *mar* regulon, Antimicrob. Agents Chemother. 41 (1997) 2067–2075.

[22] K. Maneewannakul, S.B. Levy, Identification for *mar* mutants among quinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*, Antimicrob. Agents Chemother. 40 (1996) 1695–1698.

[23] M.A. Webber, L.J. Piddock, Absence of mutations in *marRAB* or *soxRS* in acrB-overexpressing fluoroquinolone-resistant clinical and veterinary isolates of *Escherichia coli*, Antimicrob. Agents Chemother. 45 (2001) 1550–1552.

[24] S. Grkovic, M.H. Brown, R.A. Skurray, Regulation of bacterial drug export systems, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 66 (2002) 671–701.

[25] X.Z. Li, H. Nikaido, Efflux-mediated drug resistance in bacteria, Drugs 64 (2004) 159–204.

[26] U.O. Hasdemir, J. Chevalier, P. Nordmann, J.-M. Pagès, Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey, J. Clin. Microbiol. 42 (2004) 2701–2706.

[27] L. Martinéz-Martinéz, A. Pascual, M.C. Conejo, I. García, P. Joyanes, A. Doménech-Sánchez, V.J. Benedí, Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum-lactamase production, Antimicrob. Agents Chemother. 46 (2002) 3926–3932.

[28] A.M. Prouty, I.E. Brodsky, S. Falkow, J.S. Gunn, Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella typhimurium*, Microbiology 150 (2004) 775–783.

[29] A.M. George, Multidrug resistance in enteric and other Gram-negative bacteria, FEMS Microbiol. Lett. 139 (1996) 1–10.

[30] M.L. Oethinger, I. Podglajen, W. Kern, S.B. Levy, Overexpression of the *marA* or *soxS* regulatory gene in clinical topoisomerase mutants of *Escherichia coli*, Antimicrob. Agents Chemother. 42 (1998) 2089–2094.

[31] R. Chollet, J. Chevalier, C. Bollet, J.-M. Pagès, A. Davin-Regli, RamA is an alternate activator of the multidrug resistance cascade in *Enterobacter aerogenes*, Antimicrob. Agents Chemother. 48 (2004) 2518–2523.

DISCUSSION

Bien que le seul antibiotique utilisé au cours de la procédure de sélection était le chloramphénicol, les CMIs mesurées pour plusieurs antibiotiques de structures chimiques différentes étaient plus élevées pour le variant CM-64 que pour la souche parentale. En particulier, l'augmentation des CMIs aux fluoroquinolones suggérait la présence d'un efflux actif. La détermination des CMIs en présence de PAβN (un inhibiteur spécifique des pompes d'efflux) d'une part, et les mesures d'accumulation de chloramphénicol radiomarqué en présence de CCCP (un agent découplant) d'autre part, indiquent clairement l'activité d'une pompe d'efflux dans le variant CM-64. L'analyse du profil membranaire du variant CM-64 montre la surexpression coordonnée des protéines d'efflux AcrA et TolC. Aucune variation de l'expression ou défaut de l'immuno-réactivité de la porine Omp36 n'a été détecté. Ceci est en accord avec la stabilité des CMIs mesurées pour les β–lactamines dans le variant CM-64 et dans la souche parentale.

Chez les entérobactéries, les régulateurs connus de la multirésistance (MarA, RamA, Rob et SoxS) agissent à la fois en diminuant l'expression des porines, responsables de l'entrée des β–lactamines, et en augmentant l'expression des pompes d'efflux, responsables de la résistance à différentes classes d'antibiotiques (Lee *et al.*, 1996 ; Pomposiello *et al.*, 2001 ; Chollet *et al.*, 2002 ; Chollet *et al.*, 2004 ;). Seul *acrR* code un répresseur qui régule l'expression de l'opéron *acrAB* de façon spécifique (Ma *et al.*, 1996 ; Pradel & Pagès, 2002). Des études précédentes ont montré que l'imipénème chez *E. aerogenes*, le chloramphénicol et la tétracycline chez *E. coli* induisaient l'apparition d'un phénotype multirésistant par activation de la voie de régulation globale Mar. Dans ces variants, la sensibilité aux β–lactamines n'a pas toujours été testée, mais la disparition de la porine majoritaire a toujours été observée (Cohen *et al.*, 1989 ; McMurry *et al.*, 1994 ; Bornet *et al.*, 2003). Ici, le niveau d'expression d'une fusion *marA::lacZ* dans le variant CM-64 est inchangé comparé à la souche parentale ; et aucune mutation n'a été identifiée ni dans l'opérateur *marO*, ni dans le répresseur *marR*, indiquant que le niveau d'expression de *marA* n'est pas affecté. De même, aucune mutation n'a été détectée sur *acrR*. Cependant, nous ne pouvons pas exclure la présence de mutations dans la séquence promotrice de l'opéron *acrAB* qui pourraient empêcher l'accès d'AcrR à ses sites de fixation.

Cette étude montre que, *in vitro*, le chloramphénicol exerce une pression sélective sur une souche sensible d'*E. aerogenes*, conduisant à la mise en place d'un phénotype de résistance multiple par efflux. De plus, ce résultat suggère l'existence d'une nouvelle voie de régulation spécifique de la pompe d'efflux AcrAB-TolC chez *E. aerogenes*.

Il semble logique de rapprocher les résultats obtenus en sélectionnant des souches sensibles d'*E. aerogenes* sur chloramphénicol. Le niveau d'expression de la fusion P*eef::lacZ* n'est pas augmenté dans le variant CM-64 comparé à la souche parentale ATCC 13048. Les mécanismes de régulation de l'efflux dans les souches CM-1 à -4 (variants de *E. aerogenes* 15038) et la souche CM-64 (variant de *E. aerogenes* 13048) sont donc différents et indépendants. Le contexte génétique des souches utilisées, d'une part, et le protocole de sélection des variants, d'autre part, pourraient expliquer ces résultats.

Il est maintenant nécessaire d'identifier les régulateurs (répresseurs ou activateurs) impliqués dans ces deux voies d'activation de l'efflux chez *E. aerogenes*.

Rapport-gratuit.com
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES

ARTICLE 3 :

Overexpression and purification of the three components of the *Enterobacter aerogenes* AcrA–AcrB–TolC multidrug efflux pump. Muriel Masi, Jean-Marie Pagès, Elizabeth Pradel. J . Chromatogr . B. **786 :** 197–205 (2003).

Au cours de ces dix dernières années, *E. aerogenes* est devenu un pathogène nosocomial important en France, de nombreux isolats cliniques présentant un phénotype MDR (Bosi *et al.*, 1999). Deux mécanismes de résistance ont été mis en évidence chez ces isolats : disparition de porines, réduisant l'entrée des antibiotiques, et mise en place d'un efflux actif de ces mêmes produits (Malléa *et al.*, 1998). Les loci *acrAB* et *tolC* d'*E. aerogenes* ont été récemment clonés et séquencés au laboratoire. Les protéines AcrA, AcrB et TolC d'*E. aerogenes* présentent plus de 80 % d'identité de séquences avec leurs homologues respectifs chez *E. coli* (Pradel & Pagès, 2002).

Chez *Escherichia coli*, l'opéron *acrAB* est impliqué dans la résistance aux colorants basiques (comme l'acriflavine, d'où le nom *acr*), aux détergents et aux antibiotiques (Ma *et al.*, 1993). Brièvement, AcrB est un transporteur de type RND, localisé dans la membrane interne. Cette protéine de 110 kDa est constituée de 12 hélices α transmembranaires (Zgurskaya & Nikaido, 2000). AcrA est une lipoprotéine périplasmique de 41 kDa (sans la portion lipidique), ancrée dans la membrane interne. Elle forme des trimères capables d'interagir avec AcrB (Zgurskaya & Nikaido, 2000). Par sa forme allongée, AcrA serait capable de traverser le périplasme et d'interagir avec TolC, le troisième composant du système d'efflux localisé dans la membrane externe (Fralick, 1996, Zgurskaya & Nikaido, 1999). TolC est une protéine d'environ 51 kDa s'organisant en homotrimères. L'analyse récente de sa structure tridimensionnelle montre qu'elle se présente comme un tunnel perçant la membrane externe et s'enfonçant dans le périplasme (Koronakis *et al.*, 2000). Le système AcrAB-TolC joue un rôle majeur dans la résistance intrinsèque d'*E. coli* aux antibiotiques liposolubles tels que la novobiocine, l'érythromycine et l'acide fusidique (Ma *et al.*, 1995). Lorsqu'il est surexprimé, ce système entraîne des niveaux de résistance élevés vis-à-vis de plusieurs antibiotiques couramment utilisés tels que la tétracycline et le chloramphénicol (Okusu *et al.*, 1996).

Pour étudier les mécanismes moléculaires qui régissent le fonctionnement de la pompe AcrAB-TolC, le laboratoire envisage de reconstituer le système en bicouche lipidique. Dans cette perspective, ce travail a consisté à mettre au point les conditions de surproduction d'AcrA, AcrB et TolC d'*E. aerogenes* chez *E. coli* et à purifier ces trois protéines. Les gènes *acrA*, *acrB* et *tolC* d'*E. aerogenes* ont été amplifiés et clonés individuellement dans le vecteur d'expression

pET24a^{+} sous le contrôle d'un promoteur du phage T7 et en phase avec une séquence codant une extension hexahistidine C-terminale (6His). AcrA-6His a été surproduite sous forme non-lipidée dans le cytoplasme. AcrB-6His et TolC-6His ont été produites respectivement dans la membrane interne et externe. Plusieurs souches d'*E. coli* ont été testées pour parvenir à une production suffisante des deux protéines membranaires. Les trois protéines recombinantes ont ensuite été purifiées à homogénéité par IMAC (*immobilized metal affinity chromatography*), soit à partir de la fraction protéique soluble (AcrA-6His), soit à partir des membranes (AcrB-6His et TolC-6His).

Ce travail a reçu le 3ème prix lors du Congrès Européen "From Gene to Functional Protein" organisé par Amersham Biosciences qui a eu lieu à Paris les 10-11 Juin 2002, et, à cette occasion, il a été sélectionné pour publication dans une édition spéciale du Journal of Chromatography B.

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Journal of Chromatography B, 786 (2003) 197–205
JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B
www.elsevier.com/locate/chromb

Overexpression and purification of the three components of the *Enterobacter aerogenes* AcrA–AcrB–TolC multidrug efflux pump

Muriel Masi*, Jean-Marie Pagès, Elizabeth Pradel

EA2197, INSERM CJF9606, Enveloppe bactérienne, perméabilité et antibiotiques, Faculté de Médecine-Timone, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 05, France

Abstract

The tripartite AcrA–AcrB–TolC system is the major efflux pump of the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. AcrA is a trimeric periplasmic lipoprotein anchored in the inner membrane, AcrB is an inner membrane transporter and TolC is a trimeric outer membrane channel. In order to reconstitute the AcrA–AcrB–TolC system of *E. aerogenes* in artificial membranes, we overexpressed and purified the three proteins. The *E. aerogenes acrA*, *acrB* and *tolC* open reading frames were individually inserted in the expression vector pET24a$^+$, in frame with a sequence coding a C-terminal hexahistidine tag to allow purification by INAC (Immobilized Nickel Affinity Chromatography). The mature AcrA–6His was overproduced in a soluble form in the cytoplasm of *Escherichia coli* BL21(DE3). AcrA–6His was purified under native conditions in two steps using INAC and gel permeation chromatography. We obtained about 25 mg of 97% pure AcrA–6His per liter of culture. AcrB–6His was solubilized from the membrane fraction of *E. coli* C43(DE3) in 300 m*M* NaCl, 5% Triton X-100 and purified in one step by INAC. The AcrB–6His enriched fraction was eluted with 100 m*M* imidazole. The final yield was 1–2 mg of 95% pure AcrB–6His per liter of culture. The membrane fraction of *E. coli* BL21(DE3)pLysS containing TolC–6His was first treated with 2% Triton X-100, 30 m*M* $MgCl_2$ to solubilize the inner membrane proteins. After ultracentrifugation, the pellet was treated with 5% Triton X-100, 5 m*M* EDTA to solubilize the outer membrane proteins. Approximately 5 mg of 95% pure TolC–6His trimers per liter of culture was purified by INAC.
© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Expression; Purification; *Enterobacter aerogenes*; AcrA–AcrB–TolC multidrug efflux pump

1. Introduction

During the last decade, *Enterobacter aerogenes* has emerged as an important opportunist nosocomial pathogen. Since 1992, this Gram-negative bacterium is the third most prevalent pathogen involved in hospital infections, after *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Today, most of the *E. aerogenes* clinical isolates are multidrug resistant (MDR) [1].

In Gram-negative bacteria, the MDR phenotype results from two main mechanisms. First, the outer membrane (OM) acts as a permeability barrier: the narrow porin channels slow down the penetration of hydrophilic compounds to the periplasmic space, and the low fluidity of the lipopolysaccharidic leaflet

*Corresponding author. Tel.: +33-4-9132-4607; fax: +33-4-9132-4606.
E-mail address: mmasi@caramail.com (M. Masi).

1570-0232/02/$ – see front matter © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/S1570-0232(02)00746-8

decreases the diffusion of lipophilic compounds [2,3]. Moreover, porin production can decrease in response to an antibiotic stress [4]. Second, the overexpression of efflux systems can increase resistance levels [4]. Drug efflux is mediated by transport proteins located in the inner membrane (IM) that can recognize and extrude a wide variety of toxic molecules: solvents, detergents, basic stains and lipophilic antibiotics [5]. To date, efflux pumps have been subdivided in five different classes [5,6]. Among these, the resistance-nodulation-cell division (RND) family systems utilize three components: a transporter located in the IM, a periplasmic membrane fusion protein and an OM channel [7,8]. The tripartite complex traverses both membranes and allows the extrusion of drugs directly into the extracellular medium. The well-studied AcrAB–TolC pump of *Escherichia coli* belongs to the RND class [8,9]. The 110 000 AcrB transporter contains 12 transmembrane α-helices and two large periplasmic loops between helices I–II and VII–VIII [10]. AcrA is a 41 000 periplasmic lipoprotein anchored in the IM, which appears to interact with AcrB as a trimer [11,12]. Because of its elongated form, AcrA is thought to span the periplasm and contact TolC [13]. The recent elucidation of the crystal structure of the 51 500 TolC protein revealed that TolC trimers form a channel in the OM, prolonged by a transperiplasmic tunnel, which may function as a bridge to the AcrAB complex [14].

When overexpressed, the AcrAB–TolC system increases *E. coli* resistance to tetracycline and chloramphenicol [15,16].

Some *E. aerogenes* MDR clinical isolates exhibit an active antibiotic efflux [17]. Recently, the *E. aerogenes acrAB* and *tolC* loci have been cloned, and shown to play a major role in *E. aerogenes* MDR [18]. *E. aerogenes* AcrA, AcrB and TolC share more than 80% sequence identity with their *E. coli* homologs, suggesting an identical molecular organization in the envelope. In order to purify and reconstitute the *E. aerogenes* AcrA–AcrB–TolC efflux pump in artificial membranes, we produced the three proteins individually in *E. coli*. The *acrA*, *acrB* and *tolC* coding sequences were inserted in the expression vector pET24a$^+$, in frame with a sequence encoding a C-terminal hexahistidine (6His) tag to allow purification by INAC (Immobilized Nickel Affinity Chromatography). We overproduced a soluble non-lipid form of AcrA–6His in the cytoplasm as AcrA acylation is not required for its function [19]. Recombinant AcrB–6His and TolC–6His were produced in their native form and were located in the IM and OM, respectively.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, plasmids and growth conditions

The strains and plasmids used in this work are listed in Table 1. *E. coli* strains were grown at 37 °C in Luria–Bertani medium (LB) or on solid agar obtained by addition of 1.5% (w/v) Bacto-Agar. Antibiotics were added in the growth media at the following final concentrations: chloramphenicol (Cm), 30 μg/ml; kanamycin (Km), 30 μg/ml.

2.2. DNA techniques

Plasmid DNA was routinely isolated by the alkaline lysis method [19] or purified by using a Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System kit (Promega, Madison, WI, USA) for sequencing. PCRs were carried out with Vent® polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). DNA fragments were sequenced using a dRho Terminator cycle Sequencing Ready reaction kit and an ABI PRISM sequencer (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA) and a combination of universal and custom-synthesized primers. DNA fragments were gel-extracted by using a Concert Rapid Extraction kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

2.3. Plasmids construction

acrA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) without its signal sequence and the N-terminal cysteine residue of the mature sequence, from pEP709 (*acrAB*) with primers *Nde*I–*acrA* (5′-ATATCATATGGACGATAAACCGGCAA-3′) and *acrA–Xho*I (5′-ATATCTCGAGAGACTTGGTTTGTTCAGA-3′). The *acrB* and *tolC* open reading frames were PCR-amplified using pEP709 or pEP710 (*tolC*) as template, and primers *Nde*I–*acrB* (5′ - CATATGCCTAATTTCTTTATCGATCG - 3′)

Table 1
Bacterial strains and plasmids

Strains or plasmids	Relevant features[a]	Source or reference
XL1-Blue	*E. coli* K-12 *recA* β*lac* F′lacZ M15, Tc^r high efficiency transformation	Stratagen, La Jolla, CA, USA
BL21(DE3)	*E. coli* B *lonompT* expression strain	Novagen, Madison, WI, USA
BL21(DE3)pLysS	pLysS encodes T7-lysozyme, Cm^r	Novagen
C41(DE3)		
C43(DE3	BL21(DE3) derivatives	[20]
Plasmids		
$pBCSK^+$	High copy number cloning vector, Cm^r	Stratagen
$pET24a^+$	T7 promoter expression vector, Km^r	Novagen
pEP709	$pBCSK^+$ containing *E. aerogenes acrAB*	[18]
pEP710	$pBCSK^+$ containing *E. aerogenes tolC*	[18]
pMM759	$pBCSK^+$ containing *E. aerogenes acrA*	This work
pMM760	$pBCSK^+$ containing *E. aerogenes tolC*	This work
pMM761	$pET24a^+$ containing *E. aerogenes acrA*	This work
pMM762	$pET24a^+$ containing *E. aerogenes tolC*	This work
pMM763	$pBCSK^+$ containing *E. aerogenes acrB*	This work
pMM797	$pET24a^+$ containing *E. aerogenes acrB*	This work

[a] Cm^r, Km^r and Tc^r, resistance to chloramphenicol, kanamycin and tetracycline, respectively.

and *acrB*–*Xho*I (5′-CTCGAGATGATGCTCAACCGGATG-3′), or *Nde*I–*tolC* (5′-ATATCATATGCAAATGAAGAAACTTTTTC-3′) and *tolC*–*Xho*I (5′-ATATCTCGAGGTGGATAAACGGATTAGAACC-3′), respectively. The forward primers contain an *Nde*I restriction site (underlined) to generate the ATG initiation codon, and the reverse primers contain a *Xho*I restriction site (underlined) to clone the amplification products in frame with the 6His sequence in $pET24a^+$. PCR reactions were 30 cycles of 30 s at 96 °C, 1 min at 58 °C, and 1 min (for *acrA* and *tolC*) or 3 min (for *acrB*) at 72 °C. Each PCR product was gel-purified and cloned into $pBCSK^+$. The inserts were sequenced to ensure that no mutation had been introduced. The *Nde*I–*Xho*I fragments were then individually inserted into *Nde*I–*Xho*I restricted $pET24a^+$ to obtain pMM761 (*acrA*), pMM797 (*acrB*) and pMM762 (*tolC*). The encoded proteins will be named AcrA–6His, AcrB–6His and TolC–6His hereafter.

2.4. Protein expression in E. coli

Overnight cultures of BL21(DE3) or its derivatives bearing pMM761, pMM797 or pMM762 were diluted 1:100 in LB and incubated at 37 °C until OD_{600} reached 0.6. At this point, cells were induced with 1 m*M* isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG), incubated for 4 h at 37 °C, then harvested by centrifugation. The cellular pellets were washed in HEPES 10 m*M* (pH 7.4) and stored at −80 °C.

2.5. Purification of AcrA–6His

BL21(DE3)(pMM761) cells from a 100 ml culture were thawed on ice and resuspended in 2 ml of 50 m*M* NaH_2PO_4, 300 m*M* NaCl, 10 m*M* imidazole, pH 8.0 (column buffer) containing 1 mg/ml lysosyme. The mixture was sonicated on ice and centrifuged at 8000 *g* for 30 min at 4 °C to pellet unbroken cells and cellular debris. The supernatant containing soluble proteins was clarified by centrifugation (40 000 *g*, 20 min, 4 °C) and filtered through a 0.22 μm filter. The resulting lysate was loaded onto a 5 ml HiTrap Chelating column (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) charged with Ni^{2+} and equilibrated with 10 column volumes (CV) of column buffer, at a flow-rate of 1 ml/min. The column was washed with 50 m*M* imidazole in column buffer and eluted with 250 m*M* imidazole in the same buffer. Fractions of 1 ml were collected and analyzed by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE). Column fractions containing purified AcrA–6His were pooled. To

remove imidazole, the protein pool was dialyzed against two changes of 50 m*M* NaPi (pH 7.4), 150 m*M* NaCl. The protein was stable for several weeks at 4 °C. Fractions enriched in AcrA–6His were concentrated to 10–20 mg/ml using a Centriprep® YM30 (Millipore, Bedford, MA, USA). Samples of purified AcrA–6His in a 0.5 ml maximum volume were injected onto a Superose 12 HR 10/30 column (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). Isocratic elution was performed with 4 CV of 50 m*M* NaPi (pH 7.4), 150 m*M* NaCl, at 0.5 ml/min. Fractions of 1 ml were collected and analyzed by SDS–PAGE. Fractions containing highly purified AcrA–6His were pooled.

2.6. Membrane preparation

AcrB–6His and TolC–6His were extracted and purified from the membrane fraction of C43-(DE3)(pMM767) and BL21(DE3)pLyS(pMM762), respectively. Cell pellets from 250 ml cultures were thawed on ice and resuspended in 10 ml of 20 m*M* Tris–HCl (pH 8.0), 100 m*M* NaCl (buffer A) containing 1 mg/ml lysosyme. From this step, all solutions were supplemented with 1:100 (v/v) of protease inhibitor cocktail for His-tagged proteins (Sigma, St Louis, MO, USA). After sonication, cell fragments were removed by centrifugation (8000 *g* for 30 min at 4 °C) and the whole membrane fraction was recovered by ultracentrifugation at 110 000 *g* for 60 min at 4 °C. Pellets were stored at −80 °C until use.

2.7. Membrane solubilization and purification of AcrB–6His and TolC–6His

AcrB–6His purification was performed at 4 °C. The C43(DE3)(pMM797) membranes were resuspended in 5 ml of 20 m*M* Tris–HCl (pH 8.0), 300 m*M* NaCl, 10 m*M* imidazole (binding buffer) containing 5% (v/v) Triton X-100. After overnight storage at 4 °C, the mixture was ultracentrifuged (110 000 *g* for 60 min at 4 °C). The supernatant was loaded onto the 5 ml HiTrap Chelating column recharged with Ni^{2+} and equilibrated with 10 CV of binding buffer containing 0.2% (v/v) Triton X-100 (buffer B), at a flow-rate of 1 ml/min. The column was washed with 5 CV of buffer B and the bound protein was eluted with a linear gradient from 10 m*M* to 250 m*M* imidazole. The fractions containing AcrB–6His were identified by SDS–PAGE.

Extraction of TolC–6His from the OM of BL21(DE3)pLysS(pMM762) was carried out in three steps. Membranes were resuspended in 10 ml of buffer A containing 2% (v/v) Triton X-100 and 30 m*M* $MgCl_2$. After 20 min at 4 °C, the mixture was ultracentrifuged as above. The supernatant containing the solubilized IM proteins was removed, and the OM pellet was resuspended in 5 ml of binding buffer containing 5% (v/v) Triton X-100 and 5 m*M* EDTA (pH 8.0). The solution was stirred on ice for 60 min, and the solubilized material was separated by ultracentrifugation as above. This extraction step was repeated, the supernatants were pooled and dialyzed against two changes of binding buffer to remove EDTA. This fraction was loaded onto the 5 ml HiTrap Chelating column recharged with Ni^{2+} and equilibrated with 10 CV of buffer B, at a flow-rate of 1 ml/min. The column was washed with 5 CV 100 m*M* imidazole in buffer B and eluted with 5 CV with 250 m*M* imidazole in the same buffer. Column fractions were collected and analyzed by SDS–PAGE. Fractions containing TolC–6His were pooled and stored at −20 °C.

2.8. SDS–PAGE and Western blotting

SDS–PAGE was performed on a discontinuous SDS gel system [19], with a 3% stacking gel and a 10% resolving gel. Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250, or silver nitrate. Samples were mixed with an equal volume of 2× concentrated sample buffer, heated for 5 min at 96 °C for those containing AcrA–6His or TolC–6His, or incubated for 20 min at 37 °C for those containing AcrB–6His. For Western blots, proteins were electrotransfered onto a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schull, Keene, NH, USA) in buffer 20 m*M* Tris, 150 m*M* glycine, 20% isopropanol, 0.05% SDS. Membranes were probed with a 1:1000 dilution of Ni–NTA AP conjugate (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions and developed by colorimetric detection.

2.9. Protein microsequencing

For N-terminal microsequencing, proteins were electrotransfered onto a Immobilon polyvinydilene

difluoride membrane (Millipore, Bedford, MA, USA) in 20% methanol buffer. Microsequencing of proteins was performed by automated Edman degradation (492A protein sequencer, PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.10. Mass spectrometry

Samples were precipitated with 15% trichloroacetic acid, washed with acetone, dried and resuspended in formic acid. Molecular weights were determined by ''Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation, Time of Flight'' (Reflex III MALDI–TOF, Bruker–Franzen Analytic, Bremen, Germany) using 2,5-DHB as template.

2.11. Protein determination

Protein concentrations were determined by using the Micro-BCA protein assay (Pierce Chemical Co., Rockford, Illinois, USA) using bovine serum albumin as a standard.

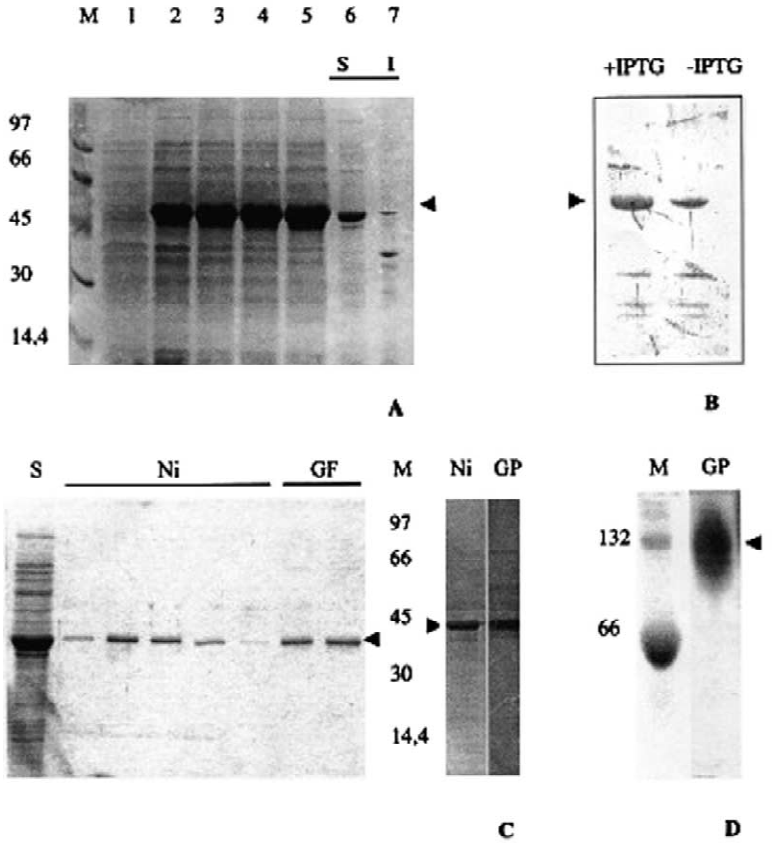


Fig. 1. Overproduction and purification of AcrA–6His. (A) Lanes 1–5: at $t=0$ and at 1 h intervals after IPTG induction, 500 μl samples were withdrawn from the culture, cells were harvested by centrifugation and whole cell lysates were analyzed by SDS–PAGE. Lanes 6 and 7: BL21(DE3)(pMM761) cells were sonicated. Following a low speed (8000 *g*) centrifugation, the soluble (S) and insoluble (I) fractions were analysed by SDS–PAGE. (B) Western blot analysis using Ni–NTA conjugates. The soluble protein fractions were prepared from induced (+IPTG) and non-induced (−IPTG) cells grown for 4 h at 37 °C. (C) Samples of different steps of the purification procedure were analyzed by SDS–PAGE, Coomassie Blue (left panel) and silver staining (right panel). Lane S: soluble fraction after cell lysis. Lanes Ni: proteins eluted with 250 m*M* imidazole from the nickel-affinity column. Lanes GP: gel permeation chromatography. Samples were mixed with 1.5% SDS sample buffer and heated at 96 °C for 5 min prior to electrophoresis. Molecular mass of standards (*M*) is indicated. The position of AcrA–6His corresponds to 45 000 (arrowhead). (D) Native-PAGE analysis of the purified AcrA–6His. An aliquot was mixed with 0.1% Triton X-100 sample buffer without β-mercapto-ethanol nor dithiothreitol, and was loaded on a 5% polyacrylamide gel containing 0.1% Triton X-100.

3. Results and discussion

3.1. Overproduction of E. aerogenes AcrA, AcrB and TolC in E. coli

Previous studies had shown that a C-terminal 6His tag has no effect on the drug efflux properties of *E. coli* AcrA and AcrB [20,13]. Thus, we PCR-amplified and cloned the *E. aerogenes acrA*, *acrB* and *tolC* open reading frames into pET242a^{+} in frame with such a tag, to allow purification by INAC.

When *E. coli* BL21(DE3) carrying pMM761 (*acrA*) was induced with IPTG, AcrA was overexpressed in a soluble form in the cytoplasm (Fig. 1A, lanes 1–6). Very few inclusion bodies were produced (Fig. 1A, lane 7). Detection with Ni–NTA conjugates confirmed that the overexpressed protein is AcrA–6His (Fig. 1B). A densitometric analysis of

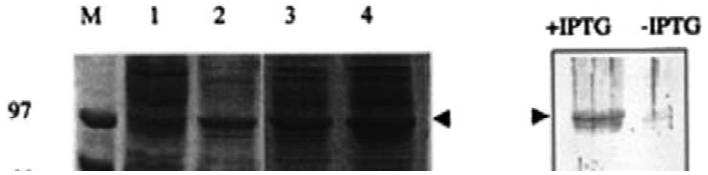


Fig. 2. Overproduction and purification of AcrB–6His. (A) SDS–PAGE analysis of insoluble fractions enriched in membrane proteins prepared from BL21(DE3)(pMM797) (lane 1); BL21(DE3)pLysS(pMM797) (lane 2); C41(DE3)(pMM797) (lane 3) and C43(DE3)(pMM797) (lane 4). (B) Western blot analysis using Ni–NTA conjugates. The insoluble fractions were prepared from induced (+IPTG) and non-induced (−IPTG) C43(DE3)(pMM797) cells grown for 4 h at 37 °C. (C) Representative samples from different steps of the purification procedure were analyzed by SDS–PAGE. Gels were stained with Coomassie Blue (left panel) or silver (right panel). Lane Mb: total membrane proteins of C43(DE3)(pMM797). Lane Ex: Triton X-100 solubilized membrane proteins. Lanes Ni: INAC purified AcrB–6His. Samples were solubilized in 3% SDS sample buffer and incubated for 20 min at 37 °C. The position of AcrB–6His corresponds to 97 000 (arrowhead).

this gel revealed that AcrA–6His represents up to 80% of the protein content.

Attempts to overexpress AcrB–6His in BL21(DE3) or BL21(DE3)pLysS resulted in a very weak production of the recombinant protein (Fig. 2A, lanes 1 and 2). We then evaluated the production of AcrB–6His in C41(DE3) and C43(DE3). When we plated C41(DE3)(pMM797) and C43(DE3) (pMM797) on LB agar containing 1 mM IPTG, we observed small and large colonies. Mirroux and Walker had shown that only cells from the small colonies continue to grow and produce the target protein in liquid cultures in the presence of inducer [21]. We examined C41(DE3)(pMM797) and C43(DE3)(pMM797) presenting a small colony phenotype for their ability to express AcrB–6His. The production of AcrB–6His in these strains was enhanced five-fold relative to BL21(DE3)pLysS-(pMM797) and was higher in C43(DE3) than in C41(DE3) (Fig. 2A, lanes 3 and 4). AcrB–6His represents 20% of the total membrane proteins in C43(DE3)(pMM797) (Table 2). Decreasing the temperature to 25°C or extending the course of expression to 18 h did not significantly increase the yield of AcrB–6His in C43(DE3) (data not shown). We confirmed the identity of AcrB–6His by Western blot analysis using Ni–NTA conjugates (Fig. 2B).

Table 2
Purification of the AcrA–6His, AcrB–6His and TolC–6His recombinant proteins

	Protein[a] (mg/l of culture)	Protein[b] (%)	Yield (%)
AcrA–*6*His			
Soluble fraction	320	70	100
Ni^{2} column	40	90	18
Gel permeation chromatography eluates	25	97	12
AcrB–*6*His			
Total membrane fraction	27	20	100
Solubilized membrane	12	32	61
Ni^{2} column	1.65	95	30
TolC–*6*His			
Total membrane fraction	32	25	100
OM fraction	17	43	95
Solubilized OM	10	53	65
Ni^{2} column	4.8	95	54

[a] Determined by BCA assay.
[b] Determined by densitometry on SDS–PAGE.

To produce TolC–6His, BL21(DE3) and BL21(DE3)pLysS were transformed with pMM762. The presence of pLysS, which encodes the T7 lysosyme, increases the tolerance of BL21(DE3) for toxic genes by reducing the basal activity of the T7 RNA polymerase [22]. SDS–PAGE analysis of the whole cell extracts showed that TolC–6His is produced only in the presence of pLysS (Fig. 3A, lanes 1–4). SDS–PAGE analysis of the insoluble fraction prepared from BL21(DE3)pLysS(pMM762) revealed the presence of two species of TolC–6His with close molecular masses (Fig. 3A, lane 6). They could correspond to the precursor and mature TolC–6His. Both proteins react with Ni–NTA conjugates (Fig. 3B). We estimated the amount the TolC–6His at 25% of the total membrane proteins (Table 2).

3.2. Purification of AcrA–*6*His

AcrA–6His was purified under native conditions in two steps: IMAC and gel permeation chromatography. The clarified soluble fraction from BL21(DE3)(pMM761) was loaded on a HiTrap Chelating nickel-affinity column. SDS–PAGE analysis of the first fractions eluted with 250 mM imidazole showed that AcrA–6His purification was imperfect as several contaminants were detected on silver-stained gels (Fig. 1C, lanes Ni). These AcrA–6His enriched fractions were then loaded onto a Superose gel permeation column. The elution profile contained a major protein peak (data not shown). SDS–PAGE analysis indicated that the corresponding fractions yielded a single broad band when stained with silver (Fig. 1C, lanes GP). In native-PAGE analysis (Fig. 1D), purified AcrA–6His solubilized in 0.1% Triton X-100 presented an apparent molecular mass (M_{app}) of 130 000 consistent with the trimeric structure of the native protein.

3.3. Solubilization and purification of AcrB–*6*His

Zgurskaya et al. demonstrated that the *E. coli* AcrB–6His can be solubilized in a functional form with Triton X-100 and reconstituted into liposomes [20]. This procedure produced a membrane fraction highly enriched in AcrB–6His (Fig. 2C, lane Ex),

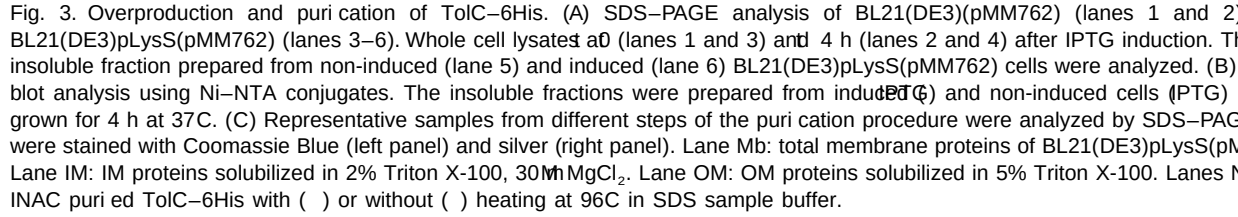


Fig. 3. Overproduction and purification of TolC–6His. (A) SDS–PAGE analysis of BL21(DE3)(pMM762) (lanes 1 and 2) and BL21(DE3)pLysS(pMM762) (lanes 3–6). Whole cell lysates at 0 (lanes 1 and 3) and 4 h (lanes 2 and 4) after IPTG induction. The insoluble fraction prepared from non-induced (lane 5) and induced (lane 6) BL21(DE3)pLysS(pMM762) cells were analyzed. (B) Western blot analysis using Ni–NTA conjugates. The insoluble fractions were prepared from induced (IPTG) and non-induced cells grown for 4 h at 37°C. (C) Representative samples from different steps of the purification procedure were analyzed by SDS–PAGE. Gels were stained with Coomassie Blue (left panel) and silver (right panel). Lane Mb: total membrane proteins of BL21(DE3)pLysS(pMM762). Lane IM: IM proteins solubilized in 2% Triton X-100, 30 mM $MgCl_2$. Lane OM: OM proteins solubilized in 5% Triton X-100. Lanes Ni: INAC purified TolC–6His with (+) or without (−) heating at 96°C in SDS sample buffer.

and resulted in the solubilization of 60% of AcrB–6His (Table 2). The Triton X-100 extract was then loaded on the HiTrap Chelating nickel-affinity column. The elution was done in presence of 0.2% (v/v) Triton X-100 by applying a 10–250 mM imidazole gradient. AcrB–6His was eluted with 100 mM imidazole and was more than 90% pure in a single-step chromatography (Fig. 2C, lanes Ni). The eluted protein represented 30% of the protein, or approximately 1.5 mg per liter of culture. However, we observed that AcrB–6His was stable only a few days in this state due to its tendency to aggregate

(data not shown). AcrB–6His of *E.coli* is also unstable and must be used for reconstitution right after elution [20].

3.4. Solubilization and purification of TolC–6His

Triton X-100 concentration ranging from 0.5% to 2% (v/v), solubilizes both IM and OM. In presence of $MgCl_2$, this detergent solubilizes only the IM [23]. The two-step Triton X-100 extraction (see Materials and methods) yielded TolC–6His samples with very few contaminants and solubilized 65% of TolC–6His (Table 2). However, SDS–PAGE analysis indicated the presence of two bands at 50 000 (Fig. 3C, lane OM). Western blot analysis showed that both bands react with antibodies raised against *E. coli* TolC (data not shown). N-terminal microsequencing confirmed that both bands correspond to *E. aerogenes* TolC and MALDI–TOF mass spectrometry analysis showed the presence of a single protein of 51 600. The observed difference in purified TolC–6His migration in SDS–PAGE may be attributed to a charge difference between two isoforms of the protein. The Triton X-100 extracts containing TolC–6His were pooled and loaded on the HiTrap Chelating nickel-affinity column. SDS–PAGE analysis of the fractions eluted with 250 mM imidazole revealed the presence of the two isoforms of TolC–6His (Fig. 3C, lanes Ni). One passage over the Ni^{2+} column purified approximately 50% of TolC–6His. This process yielded 5 mg from 1 l culture (Table 2). TolC–6His from the INAC was mixed with sample buffer containing 3% SDS and was analyzed by SDS–PAGE. When the samples were heated for 5 min at 96 °C TolC–6His migrated at an M_{app} of 51 600 (Fig. 3C, lane Ni). In contrast, in the absence of heating TolC–6His migrated at an M_{app} greater than 100 000 (Fig. 3C, lane Ni), indicating that TolC–6His was purified as a trimer.

In this work, we have overproduced and purified each component of the *E. aerogenes* AcrA–AcrB–TolC multidrug efflux pump. In collaboration with biophysicists, we are going to analyze the structure of AcrA by circular dichroism, 2D and 3D crystallography. The purification of the *E. aerogenes* AcrA, AcrB and TolC efflux proteins will allow us to examine the structural and the functional parameters of the system via in vitro reconstitution. First, we plan to study the channel properties of TolC in patch-clamp experiments. Second, the AcrB pump will be reconstituted in proteoliposomes to investigate the drug efflux mechanisms and the putative role of AcrA in the membrane fusion. Third, we will attempt to reconstitute AcrA–AcrB–TolC complexes in vitro to study the mechanistic details of TolC tunnel opening and the interactions between the three components during efflux.

References

[1] C. Bosi, A. Davin-Regli, C. Bornet, M. Mallea, J.M. Pagès, C. Bollet, J. Clin. Microbiol. 37 (1999) 2165.
[2] R.E.W. Hancock, Trends Microbiol. 5 (1997) 37.
[3] H. Nikaido, M. Vaara, Microbiol. Rev. 49 (1985) 1.
[4] H. Nikaido, Science 264 (1996) 382.
[5] H. Nikaido, Mol. Microbiol. 37 (2000) 219.
[6] K. Poole, Antimicrob. Agents Chemother. 44 (2000) 2233.
[7] I.T. Paulsen, M.H. Brown, R.H. Skurray, Microbiol. Rev. 60 (1996) 575.
[8] D. Ma, D.N. Cook, M. Alberti, N.G. Pon, H. Nikaido, J.E. Hearst, J. Bacteriol. 175 (1993) 6299.
[9] J.A. Fralick, J. Bacteriol. 178 (1996) 5803.
[10] E. Fujihira, N. Tamura, A. Tamaguchi, J. Biochem. 131 (2002) 145.
[11] H.I. Zgurskaya, H. Nikaido, J. Bacteriol. 182 (2000) 4264.
[12] T. Kawabe, E. Fujihira, A. Yamaguchi, J. Biochem. 128 (2000) 195.
[13] H.I. Zgurskaya, H. Nikaido, J. Mol. Biol. 285 (1999) 409.
[14] V. Koronakis, A. Sharff, E. Koronakis, B. Luis, C. Hugues, Nature 405 (2000) 914.
[15] D. Ma, D.N. Cook, M. Alberti, N.G. Pon, H. Nikaido, J.E. Hearst, Mol. Microbiol. 16 (1995) 45.
[16] H. Okusu, D. Ma, H. Nikaido, J. Bacteriol. 178 (1996) 306.
[17] M. Mallea, J. Chevalier, C. Bornet, A. Eyraud, A. Davin-Regli, C. Bollet, J.M. Pagès, Microbiology 144 (1998) 3003.
[18] E. Pradel, J.M. Pages, Antimicrob. Agents Chemother. 46 (2002) 2640.
[19] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
[20] H.I. Zgurskaya, H. Nikaido, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (1999) 7190.
[21] B. Miroux, J.E. Walker, J. Mol. Biol. 260 (1996) 289.
[22] F.W. Studier, A.H. Rosenberg, J.J. Dunn, J.W. Dubendorff, Methods Enzymol. 185 (1990) 60.
[23] C. Filip, G. Fletcher, J.L. Wulff, C.F. Earhart, J. Bacteriol. 115 (1973) 717.

PERSPECTIVES

La mise au point des protocoles de purification des protéines d'efflux AcrA, AcrB et TolC d'E. aerogenes offre la perspective d'analyser les caractéristiques structurales et fonctionnelles de ce complexe en collaboration avec des biophysiciens. En particulier, ces trois protéines font aujourd'hui l'objet de collaborations menées à l'Université de Cambridge avec le groupe du Dr Ben Luisi du Département de Biochimie dans le but d'obtenir une structure tridimensionnelle du complexe d'efflux assemblé par cristallographie aux rayons X et avec le groupe du Dr Carol Robinson du Département de Chimie afin d'étudier la dynamique de l'assemblage des trois partenaires par spectrométrie de masse. Le pontage chimique de proximité combiné à la spectrométrie de masse est une méthode très sensible pour l'analyse des interactions protéine-protéine (Rappsilber et al., 2000; Sinz, 2003). Les composés chimiques de pontage introduisent des liaisons covalentes entre protéines partenaires. Le complexe protéique est digéré et soumis à l'analyse par spectrométrie de masse. La comparaison de la carte des masses des peptides issus de la digestion des protéines pontées à celles de peptides issus de la digestion de chaque protéine individuelle non-modifiée permet de sélectionner des peptides pontés. La fragmentation par spectrométrie de masse en tandem confirme les séquences peptidiques et localise les acides aminés impliqués dans les interactions. Utilisée seule, la spectrométrie de masse a l'avantage de décrire en temps réel la dynamique de l'assemblage et du désassemblage de complexes protéiques transitoires par le jeu de liaisons non-covalentes (Hernàndez & Robinson, 2001). Cette méthode d'analyse se faisant en solution, elle permet de suivre des changements de conformation dynamiques dus aux interactions protéine-ligand ou protéine-protéine dans des conditions proches de l'environnement biologique. La spectrométrie de masse permet donc de complémenter les informations structurales statiques fournies par la cristallographie aux rayons X.

ARTICLE 4 :

Etude des propriétés électrophysiologiques de KCTet EefC, deux protéines d'efflux de la membrane externe du pathogène nosocomial Enterobacter aerogenes. Muriel Masi, Nathalie Saint, Gérard Molle, Elizabeth Pradel et Jean-Marie Pagès.

En attendant d'obtenir un résultat complémentaire et de préparer le manuscrit à soumettre, les résultats de cette étude sont ici présentés et discutés en français.

Etude des propriétés électrophysiologiques de TolC et EefC, deux protéines d'efflux de la membrane externe du pathogène nosocomial *Enterobacter aerogenes*

Muriel Masi[1], Nathalie Saint[2], Gérard Molle[2], Elizabeth Pradel[1¶] et Jean-Marie Pagès[1]

[1] EA2197- Enveloppe membranaire, perméabilité et antibiotiques- 27 Bd Jean Moulin, Faculté de Médecine La Timone, 13385 Marseille cedex 05, France.

[¶] Adresse actuelle : Groupe INSERM Avenir Pathogénicité des isolats cliniques- Institut de Biologie de Lille- Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille cedex, France.

[2] Centre de Biochimie Structurale- CNRS UMR 5048 - INSERM UMR 554 - Université de Montpellier I, 29 rue de Navacelles, 34090 Montpellier cedex, France.

Introduction

La membrane externe des bactéries gram-négatives est le lieu privilégié des échanges entre la cellule et son environnement : non seulement elle protège les bactéries des substances toxiques extracellulaires telles que les antibiotiques, les détergents et les enzymes digestives, mais elle représente aussi une barrière imperméable à la prise des nutriments, à la sécrétion de protéines et à l'efflux des drogues. D'une part, le passage des petites molécules hydrophiles à travers la membrane externe est facilitée par la présence de protéines formant des canaux, appelées porines. D'autre part, les bactéries ont développé plusieurs voies spécialisées pour les processus de sécrétion et d'efflux. Les systèmes de sécrétion de type I et les systèmes d'efflux de type RND fonctionnent grâce à une organisation transenvelopique tripartite dont le composant de membrane externe appartient à la famille TolC (2).

Les protéines TolC, membre du système AcrAB-TolC d'*E. coli*, et OprM, membre du système MexAB-OprM de *P. aeruginosa*, sont les représentants les plus étudiés. TolC s'assemble en trimère et forme une structure dite « canal-tunnel ». TolC est ancrée à la membrane externe par un tonneau de 40 Å de long et traverse le périplasme via un tonneau de 100 Å de long. Le trimère assemblé forme un pore unique dont le diamètre intérieur accessible est de 19.8 Å (30 Å de long brin) au niveau du canal transmembranaire et sur la majeure partie du tunnel. Le domaine transmembranaire de TolC est ouvert sur le milieu extracellulaire, mais le diamètre se réduit le long du domaine tunnel, atteignant ~3.9 Å à son extrémité périplasmique (13). OprM est un homologue fonctionnel de TolC. OprM diffère de TolC : (i) OprM est une lipoprotéine, modifiée à son extrémité N-terminale par un acide gras qui ancre la protéine dans la membrane externe et (ii) OprM n'intervient que dans l'efflux de drogues, alors que TolC est commune aux systèmes d'efflux d'antibiotiques et de sécrétion de

facteurs de virulence. Bien que les deux protéines ne partagent que 21 % d'identité de séquences, l'analyse de la structure tridimensionnelle de OprM montre un assemblage et une architecture similaires à TolC. Le canal transmembranaire offre une ouverture de 6-8 Å seulement, insuffisante pour permettre le passage d'un antibiotique. De même, le tunnel tend à se fermer à son extrémité périplasmique, empêchant l'engagement de toute molécule (1).

Les trimères TolC et OprM purifiés forment des pores d'une conductance moyenne de l'ordre de 85 pS dans 1M KCl, lorsqu'ils s'insèrent dans des bicouches lipidiques (3, 24). Ces faibles valeurs de conductance reflètent le faible diamètre des domaines tunnels à leur extrémité proximale. En effet, les données cristallographiques et électrophysiologiques indiquent que la conformation fermée du pore est très stable. Les événements menant à l'ouverture des canaux *in vivo* sont inconnus. Des changements de conformation font probablement intervenir des interactions avec le substrat et les autres composants du système. L'ouverture des canaux TolC et OprM a été démontrée *in vitro*. Les hélices du tunnel de TolC sont maintenues en conformation fermée par un réseau circulaire de liaisons inter- et intra-moléculaires. Andersen et al. ont montré que l'interruption simultanée de ces liaisons induisait une ouverture du domaine tunnel de TolC accompagnée d'une augmentation de la conductance unitaire du pore reconstitué en bicouches lipidiques planes (1). Yoshihara et al. ont également montré que la digestion protéolytique au niveau de résidus proches de la constriction périplasmique dans OprM permettait la diffusion d'antibiotiques à travers le pore reconstitué en protéoliposomes (25).

De nombreux isolats cliniques de *E. aerogenes* présentent un phénotype de multirésistance aux antibiotiques associé à un efflux actif. A ce jour, nous avons identifié et caractérisé deux pompes d'efflux d'antibiotiques tripartites chez *E. aerogenes*. Le système AcrAB-TolC est exprimé de façon constitutive dans les souches sauvages et sa surexpression participe à la multirésistance dans plusieurs isolats cliniques *in vivo* (14, 22) et dans des variants sélectionnés *in vitro* (6, 10). L'opéron *eefABC* est cryptique chez *E. aerogenes*. Néanmoins, la production de EefABC à partir d'un plasmide multi-copie restaure le niveau de résistance de mutants *acrA* d'*E. coli* et d'*E. aerogenes* vis-à-vis de plusieurs antibiotiques (16).

Dans ce travail, nous avons déterminé les caractéristiques des pores formés par les protéines d'efflux TolC et EefC d'*E. aerogenes* purifiées par des techniques biophysiques de reconstitution *in vitro*. Bien que certaines conditions expérimentales appliquées soient non-physiologiques, elles contribuent à la compréhension du comportement électrophysiologique de ces protéines et établissent des bases pour l'étude des relations structure-fonction.

Matériel et Méthodes

Souches bactériennes et conditions de croissance. Les cultures d'*E. coli* ont été réalisées en aérobie dans du milieu Luria-Bertani (LB) ou sur LB-agar (1,5 % agar). Les antibiotiques nécessaires ont été inclus dans les milieux de culture aux concentrations finales suivantes: ampicilline, 200 µg/ml; chloramphénicol (Cm), 30 µg/ml, kanamycine (Km), 30 µg/ml. *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagen) et BL21(DE3)pLysS (Novagen) ont été respectivement utilisées pour les clonages et pour la surexpression des gènes. Les souches portant les plasmides d'expression ont été cultivées à 37°C jusqu'à une densité optique de 0,6 à 600 nm. L'expression des protéines a alors été induite par l'ajout d'isopropyl-D-thiogalactoside (IPTG) à 1 mM final et l'incubation a été poursuivie pendant 4 heures à 37°C.

Protocoles de biologie moléculaire. L'ADN plasmidique a été purifié en routine en utilisant le kit Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega) conformément aux instructions du fabricant. La polymérase Elongase® (Invitrogen) a été utilisée pour les réactions d'amplification par PCR. Les fragments d'ADN ont été séquencés en utilisant le kit dRho Terminator cycle Sequencing Ready reaction et un séquenceur ABI PRISM 377 (Perkin Elmer). Les réactions de séquence ont été effectuées en utilisant des amorces universelles ou des amorces internes spécifiques. Les endonucléases de restriction (New England Biolabs) et la T4 DNA ligase (Roche) ont été utilisées selon des protocoles standard. L'extraction de fragments d'ADN à partir d'un gel d'agarose a été réalisée en utilisant le kit Concert Rapid Gel Extraction (Invitrogen) conformément aux instructions du fabriquant. Lors des clonages, XL1-Blue a été transformée par électroporation. Les plasmides recombinants ont été introduits dans la souche d'expression BL21(DE3)pLysS par la méthode du choc au calcium

Construction des plasmides d'expression. pMM762 est un plasmide dérivé de pET24a codant TolC-His$_6$ (15). *eefC* a été amplifié sans la séquence codant le peptide signal et le résidu Cys N-terminal de la protéine mature, en utilisant la matrice pEP784 (16) et le couple d'amorces MscI-*eefC* (5' tgg-cca-gtg-tct-ttg-acc-cgc-act 3') et *eefC*-SalI (5' gtc-gac-act-ggc-gcc-tcc-cag-aga-tt 3'). Les amorces contiennent les sites de restriction MscI et SalI (soulignés) pour cloner le produit d'amplification en phase avec la séquence signal N-terminale de PelB et l'étiquette His$_6$ C-terminale dans pET22b$^+$ (Novagen). La réaction de PCR s'est déroulée en 35 cycles d'amplification composés chacun d'une étape de dénaturation de 30 sec à 96ºC, d'une étape d'hybridation d'1 min à 60ºC, et d'une étape d'élongation d'1.30 min à 68°C. Le

produit de PCR a été purifié inséré dans le vecteur pGEM-T (Promega). L'insert a été soumis au séquençage pour vérifier qu'aucune mutation n'avait été insérée. Le fragment NdeI-SalI portant eefC a ensuite été isolé et sous-cloné entre les sites NdeI-XhoI du vecteur pET22b+ pour obtenir pMM33.

Purification de TolC et EefC. TolC-His_6 et EefC- His_6 ont été purifiées à partir de cultures de 500 ml de BL21(DE3)pLysS portant respectivement le plasmide pMM762 ou pMM33 induites à l'IPTG. Les cellules ont été lysées par sonication, les membranes totales ont été récupérées par ultracentrifugation (50000 x g, 40 min) et lavées dans 20 mM Tris-HCl pH 7,4/ 30 mM $MgCl_2$/ 0,5 % Triton X-100 (Sigma) pour éliminer les protéines de membrane interne. Les culots contenant les protéines de membrane externe ont été solubilisés dans 20 mM Tris-HCl pH 7,4/ 20 mM $MgCl_2$/ 5 % Triton X-100/ 10 % glycerol/ 10 mM imidazole et le matériel insoluble a été éliminé (50000 x g, 20 min). TolC-His_6 et EefC- His_6 ont été purifiées à partir du surnageant par fixation sur une colonne HiTrap Chelating 5 ml (Amersham Biosciences) préchargée avec des ions Ni^{2+} et élution avec des concentrations croissantes d'imidazole. Les concentrations en protéines ont été déterminées en utilisant le kit de dosage RC-DC (Bio-Rad) conformément aux instructions du fabricant. La pureté des préparations a été analysée par SDS-PAGE et coloration des gels au nitrate d'argent.

Reconstitution de TolC et EefC en bicouches lipidiques planes. Les bicouches lipidiques planes ont été formées selon la méthode de reconstitution de Montal et Mueller (19). Des trous d'un diamètre de 150 µm ont été percés dans des films de Téflon. Dans le montage, le film de Téflon sépare deux demi-cellules en verre, d'une contenance d'environ 3 ml. Avant la formation de la bicouche, le trou est prétraité de chaque côté avec 1 µl d'un mélange hexadécane/hexane (0,4 v/v). Après évaporation, les deux demi-cellules sont remplies d'une solution d'électrolyte, 10 mM Hepes, pH7,4/ 0,5 ou 1 M KCl. 15 µl d'une solution d'asolectine IV-S (Sigma) à 0,5% dans de l'hexane sont ensuite déposés à la surface des deux bains d'électrolyte et, après évaporation du solvant, la bicouche lipidique est formée par apposition de deux monocouches au niveau du trou. L'électrode du côté trans est reliée à la terre alors que l'électrode du côté cis est connectée à un amplificateur de courant. Le potentiel transmembranaire appliqué correspond à la différence de potentiel entre le côté cis et le côté trans. TolC et EefC ont été diluées dans de l'octyl-POE 1 % et ajoutées d'un côté de la membrane à une concentration finale de 10 ng/ml.

Dans les expériences de mesures de courants macroscopiques, les membranes ont été soumises à l'application d'une rampe de voltage à une fréquence de 10 mV/sec. Les courbes de courant en fonction de voltage (I-V) ont été suivies et enregistrées sur ordinateur à l'aide du programme Scope (ADI Instruments).
Dans les expériences de mesures de sélectivité ionique, un gradient de KCl a été généré de part et d'autre de la membrane, de 0,1 M du côté cis à 1 M du côté trans, en rajoutant un petit volume d'une solution concentrée d'un côté de la membrane alors que l'autre côté est maintenu à basse concentration. Le potentiel nécessaire pour atteindre un courant nul a été mesuré. Après rupture de la bicouche, le potentiel de jonction dû au gradient a été déterminé. La sélectivité ionique d'un canal se caractérise par le ratio de la perméabilité aux cations, P_{cation}, sur la perméabilité aux anions, P_{anion}, calculé selon l'équation de Goldman-Hodgkin-Katz.

Reconstitution de TolC et EefC en protéoliposomes et enregistrement en patch-clamp. Les liposomes d'asolectine ont été obtenus par sonication d'une suspension à 5 mg/ml dans 10 mM Hepes-KOH, pH 7,4/ 0,5 M KCl. TolC et EefC ont été incubées avec les liposomes (ratio protéine sur lipide 1:2000) pendant 30 min à température ambiante. Puis la suspension a été agitée en présence de Bio-Beads SM2 (Bio-Rad) pour éliminer le détergent (400 mg de Bio-Beads par ml d'échantillon protéique contenant 1 % de Triton-X100) pendant 3 h à température ambiante. Les protéoliposomes ont été collectés (50000 x g, 40 min) et resuspendus dans 10 mM Hepes-KOH, pH 7,4/ 0,5 M KCl. Des aliquotes de protéoliposomes ont été déposés sur des lames de verre puis déshydratés/réhydratés. Pour chaque expérience, un aliquote de 2 µl a été placé dans un compartiment contenant 1 ml d'une solution d'électrolyte, ici 10 mM Hepes-KOH, pH 7,4/ 0,5 M KCl. Les micro-pipettes ont été remplies de la même solution. Chaque patch a été obtenu en appliquant une brève aspiration à la surface d'un liposome uni-lamellaire. La résistance des bicouches ainsi formées à l'extrémité de la micro-pipette devait être comprise entre 1,1 et 3,3 GΩ. Les valeurs de conductances unitaires ont été calculées à partir des histogrammes d'amplitudes des intensités de courants. Les tracés ont été enregistrés sur ordinateur et traités à l'aide des programmes Biotools et Analysis (Science Instruments).

Construction des modèles tridimensionnels. Les séquences de TolC et EefC d'*E. aerogenes* ont été soumises au serveur FUGUE (www.cryst.bioc.cam.ac.uk/fugue) (23) pour alignement

avec leurs homologues recherchés sur la banque de données HOMSTRAD (www.cryst.bioc.cam.ac.uk/homstrad) (18) avec les paramètres par défaut. Les alignements structuraux de TolC d'*E. aerogenes* avec TolC d'*E. coli* (code PDB 1EK9) et de EefC d'*E. aerogenes* avec OprM de *P. aeruginosa* (code PDB 1WP1) ont été formatés par le programme JOY (17). Ces alignements ont ensuite été utilisés pour la construction des modèles tridimensionnels de TolC et EefC d'*E. aerogenes* avec le programme Swiss PDB Viewer.

Résultats et Discussion

Purification de TolC et EefC d'*E. aerogenes*. Pour faciliter la purification, un motif hexapeptidique d'histidine (H_6) C-terminal a été introduit dans TolC et EefC. L'amplification et le clonage des cadres ouverts de lecture *tolC* et *eefC* d'*E. aerogenes* sont décrits dans « Matériel et Méthodes ». Il faut noter que *eefC* a été amplifié à partir du codon 17. En effet, l'analyse de la séquence de EefC indique la présence d'une boîte lipoprotéine caractéristique avec un résidu cystéine acylable en position 16 (LVGC, SL), située directement en aval de la séquence signal d'exportation (20, 21). Dans les conditions physiologiques, à la suite du clivage du peptide signal, la cystéine N-terminale de la protéine mature est modifiée par acylation pour permettre son ancrage dans la membrane externe. Le produit d'amplification *eefC* a ensuite été cloné en aval de la séquence signal N-terminale de l'azurine dans pET22b pour permettre le transport du précurseur vers l'espace périplasmique. EefC a été produite sous forme non-lipidée car la présence de lipides pourrait compliquer les analyses ultérieures via des agrégations non-spécifiques et une hétérogénéité des formes protéiques engendrées par des processus inhérents de maturation et de modification.
TolC et EefC ont été surproduites dans *E. coli* BL21(DE3)pLysS pour minimiser l'effet toxique de la surproduction de protéines membranaires et favoriser ainsi leur insertion dans la membrane externe. TolC et EefC ont été extraites des membranes en utilisant le Triton X-100 et purifiées en une étape par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel en présence de Triton X-100. L'analyse SDS-PAGE du matériel élué montre que TolC et EefC ont été purifiées à homogénéité (Figure 1). En conditions semi-dénaturantes, TolC et EefC purifiées migrent à une masse moléculaire estimée à plus de 100 kDa, représentant les formes homotrimériques natives (Figure 1).

Modélisation structurale de TolC et EefC d'*E. aerogenes*. Les principaux éléments structuraux de la protéine TolC d'*E. coli* sont conservés dans la famille des protéines

homologues, suggérant un mécanisme d'efflux commun parmi les bactéries gram-négatives (2). Pour établir des modèles tridimensionnels des protéines TolC et EefC d'*E. aerogenes*, nous avons d'abord aligné leur séquence avec celle de leur plus proche homologue, respectivement les protéines TolC d'*E. coli* et OprM de *P. aeruginosa* (Figure 2A et C). Les protéines TolC d'*E. aerogenes* et d'*E. coli* partagent 82 % d'identité de séquence. Ainsi, la structure modélisée de TolC d'*E. aerogenes* est quasiment superposable à la structure cristalline de TolC d'*E. coli* (Figure 2B). Seule la boucle extracellulaire entre les feuillets 3 et 4 est plus courte de cinq acides aminés dans TolC d'*E. aerogenes* comparée à TolC d'*E. coli*. La comparaison des séquences primaires des protéines de la famille TolC montre que les deux boucles exposées à la face cellulaire sont des régions hyper-variables (12). Chez *E. coli*, les altérations (substitutions, délétions ou insertions) dans ces boucles confèrent une résistance vis-à-vis du bactériophage TLS et de la colicine E1 spécifiques de TolC, mais ne modifient pas les activités d'efflux d'antibiotiques et de sécrétion d'hémolysine dépendantes de TolC (9). La variabilité génétique des boucles extracellulaires représenterait une stratégie de défense efficace contre les infections par les bactériophages et d'autres attaques environnementales *in vivo*.

Bien que EefC d'*E. aerogenes* ne présente respectivement que 22 et 43 % d'identité de séquence avec TolC d'*E. coli* et OprM de *P. aeruginosa*, les principaux éléments structuraux sont conservés entre ces trois protéines (Figure 2C). Par exemple, des glycines à l'entrée du tunnel et de nombreux petits résidus, tels que alanine, leucine et sérine, aux interfaces des hélices favorisent l'enroulement serré des hélices coiled-coil et déterminent ainsi la structure de la protéine à son entrée périplasmique. Des prolines et des glycines conservées assurent les transitions de structures secondaires entre les hélices du tunnel et les feuillets du canal. A la base des feuillets , soit à l'interface du feuillet externe de la membrane externe et du périplasme, des résidus aromatiques se projettent vers l'extérieur et forment un anneau autour du domaine canal. Cette caractéristique se trouve d'ailleurs dans toutes les protéines bactériennes de la membrane externe qui ont été cristallisées jusqu'ici, et pourrait avoir une fonction d'ancrage. La sous-classe des pompes d'efflux présente un site d'acylation caractéristique en N-terminal. Le modèle tridimensionnel de EefC concorde avec la structure cristalline de OprM et prédit deux types d'ancrage dans la membrane externe, via l'extension lipidique N-terminale et le tonneau transmembranaire (Figure 2D).

En se basant sur les structures de TolC d'*E. coli* et OprM de *P. aeruginosa*, la comparaison des modèles structuraux des protéines TolC et EefC d'*E. aerogenes* soulève deux divergences. Bien que les brins soient géométriquement similaires, les boucles qui les

relient présentent des variations de taille et en flexibilité. La détermination de la structure de TolC d'E. coli a montré que le domaine canal était ouvert sur le milieu extracellulaire de façon constitutive avec un diamètre intérieur accessible d'environ 19 Å (13). Ainsi, la seule zone de constriction pour le passage des substrats est l'entrée périplasmique du tunnel.. Au contraire, dans la structure de OprM, la boucle extracellulaire entre les feuillets 1 et 2 se replie vers l'intérieur du canal en réduisant le diamètre accessible à 6-8 Å (1). La publication récente de la structure tridimensionnelle de la protéine VceC de *Vibrio cholerae* indique un repliement similaire (8). Cette caractéristique structurale pourrait aussi se retrouver dans EefC d'E. aerogenes. La surface intérieure des protéines de la famille TolC est électronégative. Dans les protéines TolC d'E. coli et d'E. aerogenes, un anneau de six résidus aspartate est conservé à l'entrée périplasmique du pore (D371 et D374 dans TolC d'E. coli ; D365 et D368 dans TolC d'E. aerogenes). Ces résidus sont respectivement remplacés par une sérine (S401) et une thréonine (T404) dans EefC d'E. aerogenes. Andersen et al. ont montré que le comportement électrophysiologique de TolC d'E. coli est déterminé par le diamètre du pore et la nature des résidus à l'extrémité périplasmique du tunnel (5). Ainsi, les différences observées entre TolC et EefC d'E. aerogenes pourraient avoir des conséquences sur les propriétés fonctionnelles des pores.

Caractérisation des canaux formés par TolC et EefC d'E. aerogenes. La formation des canaux a été étudiée en mesurant la conductance de canaux unitaires après reconstitution des protéines purifiées en protéoliposomes géants par la méthode du patch-clamp. La figure 3 montre des enregistrements sur patch excisé contenant soit TolC (panneau A) soit EefC (panneau B) à + 80 mV et – 80 mV dans 0,5 M KCl. Les valeurs des conductances unitaires ont été calculées à partir des histogrammes d'amplitude. Dans ces conditions, les canaux TolC présentent une conductance unitaire moyenne de 70,3 ± 5,9 pS à voltage positif et 72,9 ± 8,9 pS à voltage négatif. Les valeurs de conductance unitaire des canaux EefC sont légèrement supérieures à celles des canaux TolC, avec 89,8 ± 4,8 pS à voltage positif et 96,1 ± 1,4 pS à voltage négatif. Les enregistrements montrés dans la figure 3B indiquent la présence de plusieurs protéines EefC dans le patch et différents niveaux de flux de courant sont indiqués. Des enregistrements sur patch ne contenant qu'une seule molécule EefC ont également été obtenus sans affecter les valeurs de conductance unitaire. En revanche, l'association des canaux TolC dans une même patch n'a jamais été observée. La conductance des canaux TolC et EefC varie peu en fonction du voltage et reste stable même à haut voltage,

suggérant l'absence d'ouverture ou de fermeture dépendante du voltage (non montrés). A tous les potentiels testés, la conductance des canaux EefC reste supérieure à celle des canaux TolC. Les expériences de reconstitution de la protéine TolC d'E. coli en bicouches lipidiques planes montraient une conductance unitaire d'environ 38 pS dans 0,6 M KCl (3). Nos résultats sont concordants et montrent que la faible conductance des canaux TolC est une caractéristique conservée parmi les protéines d'efflux de la famille TolC. Ces valeurs reflètent une structure générale commune, en particulier une ouverture très étroite du pore à son entrée périplasmique. La conductance plus élevée des canaux EefC comparée à celle des canaux TolC pourrait s'expliquer par un diamètre proximal plus large et par une différence des charges dans cette zone. En effet, les résidus aspartate qui bordent la zone de constriction dans TolC sont remplacés par des résidus sérine et thréonine à chaînes latérales moins volumineuses et moins électronégatives dans EefC.

Les expériences en multi-canaux sont plus proches de la réalité in vivo que les expériences en canal unitaire. Ceci permet de caractériser le comportement général d'un ensemble de canaux en fonction de différents paramètres physico-chimiques tels que le voltage, l'espèce ionique ou le pH du milieu. TolC et EefC ont été reconstituées en bicouches lipidiques planes. Le courant macroscopique induit par de multiples canaux a été suivi sous une rampe de voltage (Figure 4). Les canaux TolC présentent un comportement ohmique de + 200 mV à – 200 mV, indiquant des valeurs de conductance constantes dans cette gamme de voltage. Les canaux EefC se distinguent par une augmentation du flux de courant et par l'apparition d'une hystérésis à partir de + 120 mV. Ceci suggère un changement de conformation dépendant du voltage. De plus, l'hystérésis induit une certaine lenteur des canaux pour se refermer.

Les études menées sur TolC d'E. coli indiquent un ratio P_{K^+}/P_{Cl^-} de 16,5 dans un gradient de 30 à 300 mM KCl. La sélectivité TolC d'E. coli aux cations repose exclusivement sur l'anneau de six résidus aspartate, deux par monomère, qui délimite l'entrée périplasmique du pore (3, 5). La sélectivité ionique de TolC et EefC a été déterminée après génération d'un gradient de concentration en sels de part et d'autre de la membrane (de 0,1 à 1 M KCl). Les protéines ont été insérées du côté de la plus faible concentration et le potentiel pour obtenir un courant nul a été calculé dans plusieurs essais indépendants. Pour TolC, le potentiel révertant était de 48 ± 0 mV avec un rapport de perméabilité P_{K^+}/P_{Cl^-} de 30,9. Ceci signifie que TolC est environ 31 fois plus perméable aux ions K^+ qu'aux ions Cl^-. Pour EefC, le potentiel révertant était de 19,5 ± 1,5 mV, avec un rapport de perméabilité P_{K^+}/P_{Cl^-} d'environ 2,9. EefC est dix fois moins sélective aux cations que TolC. Ceci pourrait s'expliquer par la perte de charges négatives à l'entrée proximale du tunnel. En effet, les résidus aspartate (D365 et

D368) qui bordent cette zone de constriction dans TolC sont remplacés dans EefC par des résidus sérine (S401) et thréonine (T404) dont les chaînes latérales sont faiblement électronégatives. La sélectivité cationique est une propriété répandue parmi les protéines formant des pores à travers la membrane externe des entérobactéries. Dans le cas particulier des protéines d'efflux, le transporteur de membrane interne est souvent considéré comme seul responsable de la spécificité des substrats. Pourtant, la distribution des charges dans la protéine de membrane externe pourrait influencer la translocation des substrats à travers le canal.

Inhibition des canaux TolC et EefC par des cations divalents. Une étude précédente a montré que la conductance unitaire des canaux TolC d'*E. coli* était sévèrement inhibée par l'addition de cations di- et trivalents (5). Parmi les cations divalents testés, Zn^{2+} et Co^{2+} étaient les plus efficaces pour bloquer les canaux. L'effet des ions Zn^{2+} a donc été examiné sur la conductance macroscopique des canaux TolC et EefC d'*E. aerogenes* dans 1 M KCl. La structure des protéines de la famille TolC est asymétrique et impose l'insertion orientée du domaine canal dans la bicouche lipidique. Ainsi, l'entrée périplasmique du tunnel est dans le compartiment dans lequel la protéine a été ajoutée. Nous désignerons ce compartiment cis comme le compartiment périplasmique, à l'inverse du compartiment trans correspondant à l'espace extracellulaire. L'addition de 1 mM $ZnCl_2$ dans le compartiment trans entraîne une chute du flux d'ions à travers les canaux TolC et EefC lorsque le potentiel transmembranaire appliqué est négatif (Figure 5). Dans ce cas, les ions sont « tirés » vers l'intérieur des pores. Dans TolC d'*E. coli*, l'anneau de six résidus aspartate situés à l'entrée périplasmique est le site d'interaction avec les cations di- et trivalents (5). Ainsi, le passage des ions Zn^{2+} (radius de l'ion hydraté 3,53 Å) est limité par le faible diamètre de la constriction périplasmique et par des interactions ioniques dans cette zone. L'analyse des séquences indique que les résidus D365 et D368 dans TolC sont remplacés par les résidus S401 et T404 dans EefC. Les interactions ioniques sont donc conservées dans TolC d'*E. aerogenes* mais pas dans EefC. De plus, la faible sélectivité cationique de EefC suggère qu'il n'existe pas d'autres sites d'interaction possibles. Les résidus sérine et thréonine situés à l'entrée périplasmique de EefC pourraient créer une aire suffisamment électronégative pour attirer les ions Zn^{2+}.

Influence du pH sur les canaux TolC d'*E. aerogenes*. Les canaux TolC d'*E. coli* se ferment à pH acide (3). L'influence du pH sur la conductance unitaire et macroscopique des canaux TolC d'*E. aerogenes* a donc été examinée dans 1 M KCl. Après insertion des protéines dans

la membrane, le pH a été abaissé par ajout de citrate. Aucun effet du pH sur la conductance unitaire des canaux TolC n'a été observé. Des exemples de courbes I-V à pH 7,4 ; 5,3 ; 4,7 ; 3,8 et 3,5 sont montrés dans la figure 6. Plusieurs effets sont visibles :

(i) L'acidification du milieu induit une dépendance au voltage. Cet effet est d'autant plus important que le pH est acide. La comparaison des courbes I-V à pH 3,5 et à pH 7,4 indique que le courant macroscopique est multiplié par 5 en voltage positif et par 7 en voltage négatif.

(ii) La diminution du pH fait apparaître une hystérésis. Ceci indique un délai de re-fermeture des canaux.

(iii) L'influence du pH sur le comportement des canaux TolC est fonction de la polarité du voltage. A pH 5,3, la dépendance au voltage et l'hystérésis n'apparaissent qu'en voltage positif. A partir de pH 4,7, les courbes I-V sont quasiment symétriques. Les hystérésis et les seuils critiques de voltage (± 100 mV) sont stables entre pH 4,7 et pH 3,5.

Nos résultats diffèrent de ceux obtenus pour TolC d'E. coli. A voltage constant, Andersen et al. mesurent une chute de la conductance unitaire des canaux TolC en fonction de l'acidité du pH. De cette observation, les auteurs ont conclu que les canaux TolC avaient tendance à se fermer pour protéger les bactéries d'un choc acide (3). A pH acide" (5.2), les auteurs observent également une augmentation progressive de la conductance unitaire des canaux en fonction du voltage. Au contraire, le pH acide induit un changement de conformation de TolC d'E. aerogenes. La dépendance au pH est une caractéristique des protéines coiled-coil (7). Récemment, une étude a montré que le pH acide induisait une oligomérisation associée à un changement de conformation des hélices coiled-coil de la protéine d'efflux périplasmique AcrA d'E. coli (11). Au cours du processus d'efflux, les protéines de la famille TolC doivent subir des modifications de conformation importantes pour permettre l'ouverture périplasmique du pore et la translocation des substrats à travers la membrane externe. La conformation «fermée» de l'entrée périplasmique est très stable, grâce à un réseau de liaisons hydrogène et de ponts salins intra- et intermoléculaires (4, 13). Les différents états d'ionisation des acides aminés chargés, dus aux variations de pH, pourraient entraîner une déstabilisation des liaisons contraignant et/ou faciliter de nouvelles liaisons accommodant la conformation ouverte. Ce phénomène pourrait être préalable à l'ouverture complète du pore après interaction avec ses protéines partenaires. Il serait donc utile d'examiner l'influence du pH sur les canaux Eef afin de conforter cette hypothèse.

Conclusions

Les études fonctionnelles/physico-chimiques sur les protéines d'efflux sont nécessaires à la compréhension des mécanismes qui régissent l'efflux d'antibiotiques. A terme, l'utilisation de ces connaissances pourrait aboutir sur la conception de nouveaux agents antibactériens pour le traitement des infections à bactéries multirésistantes. En particulier, le caractère ubiquitaire des protéines de la famille TolC parmi les bactéries gram-négatives en fait des cibles thérapeutiques potentielles.

Nous avons identifié deux systèmes d'efflux tripartites chez *E. aerogenes*. Bien que notre travail de caractérisation des protéines TolC et EefC ne soit pas complètement achevé, plusieurs propriétés communes se dégagent :

- Les faibles valeurs de conductance des canaux TolC et EefC suggèrent une structure générale similaire, quasiment fermée à leur extrémité périplasmique.
- Les canaux TolC et EefC peuvent être bloqués par des cations divalents. Le développement de petites molécules chargées positivement est donc envisageable pour cibler l'entrée périplasmique des protéines de la famille TolC et inhiber le mécanisme d'efflux.

Les différences de sélectivité ionique et de dépendance au voltage observées *in vitro* entre TolC et EefC ne peuvent pas être encore reliées à des rôles physiologiques différents *in vivo*.

Références

1. Akama, H., M. Kanemaki, M. Yoshimura, T. Tsukihara, T. Kashiwagi, H. Yoneyama, S. Narita, A. Nakagawa, and T. Nakae. 2004. Crystal structure of the drug discharge outer membrane protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa*: dual modes of membrane anchoring and occluded cavity end. J. Biol. Chem. 279:52816-52819.
2. Andersen, C. 2003. Channel-tunnels: outer membrane components of type I secretion systems and multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 147:122-165.
3. Andersen, C., C. Hughes, and V. Koronakis. 2002. Electrophysiological behavior of the TolC channel-tunnel in planar lipid bilayers. J. Membr. Biol. 185:83-92.
4. Andersen, C., E. Koronakis, E. Bokma, J. Eswaran, D. Humphreys, C. Hughes, and V. Koronakis. 2002. Transition to the open state of the TolC periplasmic tunnel entrance. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 99:11103-11108.
5. Andersen, C., E. Koronakis, C. Hughes, and V. Koronakis. 2002. An aspartate ring at the TolC tunnel entrance determines ion selectivity and presents a target for blocking by large cations. Mol. Microbiol. 44:1131-1139.

6. Bornet, C., R. Chollet, M. Mallea, J. Chevalier, A. Davin-Regli, J. M. Pages, and C. Bollet. 2003. Imipenem and expression of multidrug efflux pump in Enterobacter aerogenes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 301:985-990.

7. Burkhard, P., J. Stetefeld, and S. V. Strelkov. 2001. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. Trends Cell. Biol. 11:82-88.

8. Federici, L., D. Du, F. Walas, H. Matsumura, J. Fernandez-Recio, K. S. McKeegan, M. I. Borges-Walmsley, B.F. Luisi, and A. R. Walmsley. 2005. The crystal structure of the outer membrane protein VceC from the bacterial pathogen Vibrio cholerae at 1.8 Å resolution. J. Biol. Chem. 280:15307-15314.

9. German, G. J., and R. Misra. 2001. The TolC protein of Escherichia coli serves as a cell-surface receptor for the newly characterized TLS bacteriophage. J. Mol. Biol. 308:579-585.

10. Ghisalberti, D., M. Masi, J. M. Pagès, and J. Chevalier. 2005. Chloramphenicol and expression of multidrug efflux pump in Enterobacter aerogenes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 328:1113-1118.

11. Ip, H., K. Stratton, H. Zgurskaya, and J. Liu. 2003. pH-induced conformational changes of AcrA, the membrane fusion protein of Escherichia coli multidrug efflux system. J. Biol. Chem. 278:50474-50482.

12. Johnson, J. M., and G. M. Church. 1999. Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. J. Mol. Biol. 287:695-715.

13. Koronakis, V., A. Sharff, E. Koronakis, B. Luisi, and C. Hughes. 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. Nature. 405:914-919.

14. Malléa, M., J. Chevalier, C. Bornet, A. Eyraud, A. Davin-Regli, C. Bollet, and J. M. Pages. 1998. Porin alteration and active efflux: two in vivo drug resistance strategies used by Enterobacter aerogenes. Microbiology. 144:3003-3009.

15. Masi, M., J. M. Pagès, and E. Pradel. 2003. Overexpression and purification of the three components of the Enterobacter aerogenes AcrA-AcrB-TolC multidrug efflux pump. J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 786:197-205.

16. Masi, M., J. M. Pagès, C. Villard and E. Pradel. 2005. The eefABC multidrug efflux pump operon is repressed by H-NS in Enterobacter aerogenes. J. Bacteriol. 187:3894-3897.

17. Mizuguchi, K., C. M. Deane, T. L. Blundell, M. S. Johnson, and J. P. Overington. 1998. JOY: protein sequence-structure representation and analysis. Bioinformatics. 14:617-623.

18. Mizuguchi, K., C. M. Deane, T. L. Blundell, and J. P. Overington. 1998. HOMSTRAD: a database of protein structure alignments for homologous families. Protein Sci. 7:2469-2471.

19. Montal, M., and P. Mueller. 1972. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 69:3561-3566.

20. Nakajima, A., Y. Sugimoto, H. Yoneyama, and T. Nakae. 2000. Localization of the outer membrane subunit OprM of resistance-nodulation-cell division family multicomponent efflux pump in Pseudomonas aeruginosa. J. Biol. Chem. 275:30064-30068.

21. Paulsen, I. T., J. H. Park, P. S. Choi, and M. H. Saier, Jr. 1997. A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 156:1-8.

22. Pradel, E., and J. M. Pagès. 2002. The AcrAB-TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen Enterobacter aerogenes. Antimicrob. Agents Chemother. 46:2640-2643.

23. Shi, J., T. L. Blundell, and K. Mizuguchi. 2001. FUGUE: sequence-structure homology recognition using environment-specific substitution tables and structure-dependent gap penalties. J. Mol. Biol. 310:243-257.

24. Wong, K. K., F. S. Brinkman, R. S. Benz, and R. E. Hancock. 2001. Evaluation of a structural model of Pseudomonas aeruginosa outer membrane protein OprM, an efflux component involved in intrinsic antibiotic resistance. J. Bacteriol. 183:367-374.

25. Yoshihara, E., H. Maseda, and K. Saito. 2002. The outer membrane component of the multidrug efflux pump from Pseudomonas aeruginosa may be a gated channel. Eur. J. Biochem. 269:4738-4745.

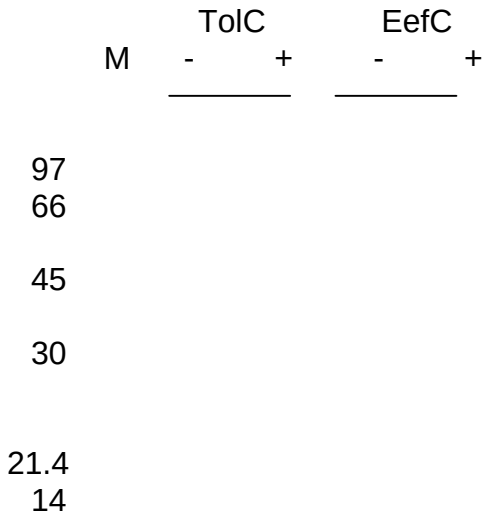
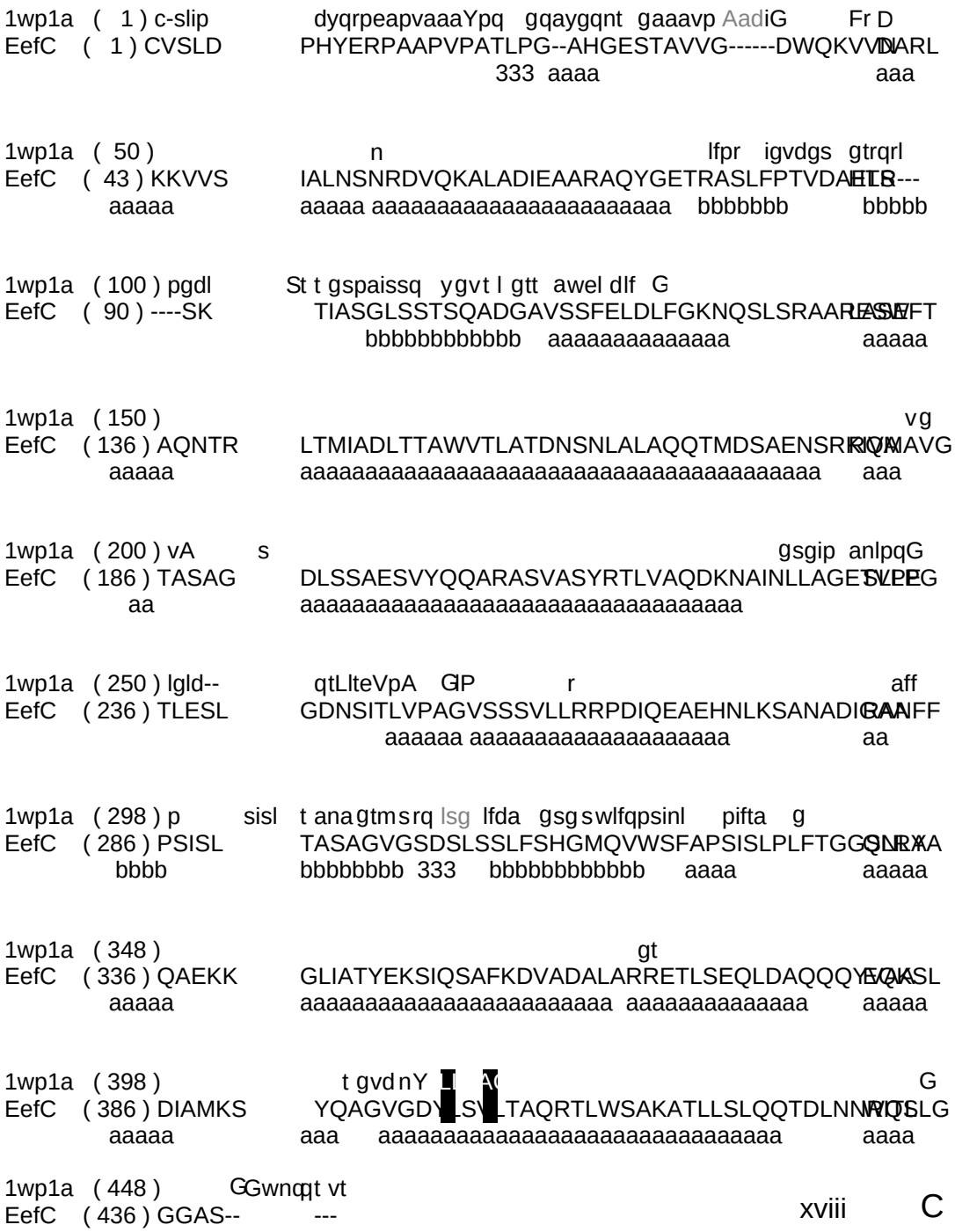


Figure 1. Purification de protéines TolC et EefC d'E. aerogenes. Les fractions éluées par chromatographie d'affinité ont été rassemblées, chauffées à 100 °C en présence de 3 % SDS et d'agents réducteurs (+, conditions dénaturantes) ou solubilisées dans 0.1 % SDS sans chauffage ni agents réducteurs (-, conditions semi-dénaturantes). Les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE et les gels ont été colorés au nitrate d'argent. Les masses moléculaires (en kDa) des marqueurs de taille sont indiquées.

```
1ek9a    (  1)  e              n              N                          spl lp glglgadyty
TolC          (  1)  ENLLQVYQQARISNPDLRKSAADRDAAFEKINEARSPLLPQLGLGADYTY
                aaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa333 bbbbbbbbbb

1ek9a    (  51)            sngyrd angi nsnatsaslqlt     qSif d
TolC          (  51)  TSGFRDYKNQNSNVTSGSLQLTQTLFDMSKWRALTLQEKAAGIQDVTYQT
              bb      bbbbbbbbbbbb    aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

1ek9a    ( 101)                                                      vglv
TolC          ( 101)  DQQTLILNTATAYFKVLAAIDTLSYTEAQKQAIYRQLDQTTQRFNVGLVA
              Aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa   a

1ek9a    ( 151)                                                  gnyyp eLAaLnven
TolC          ( 151)  ITDVQNARSQYDAVLANEVTARNDLDNAVEELRQVTGNYYPELASLNVNG
              aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa    bbbbb

1ek9a    ( 201)  fk             tdkpqpv              n                          Dgh lp tldl
TolC          ( 201)  FKTSKPQAVNALLKEAENRNLSLLQARLNQDLAREQIRQAQDGHLPTLDL
                aaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa333 bbbb

1ek9a    ( 251)            t astgis   dt sys gsk t r gaagt gyd dsn gqnkvglsfs    lp i yq gg
TolC          ( 251)  NASTGVSNNRYSGSKNI-----SQDADVGQNKVGLSFSLPLYQGGMVNSQ
              bbbbbbb              bbbbbbbbbb      aaaaa

1ek9a    ( 301)
TolC          ( 296)  VKQAQYNFVGASEQLESAHRSVVQTVRSSFNNVNASISSINAYKQAVVSA
              aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

1ek9a    ( 351)                          vgt r t    d   d
TolC          ( 346)  QSSLDAMEAGYSVGTRTVDVLDATTTLYNAKQQLSNARYNYLINELNIK
              aaaaaaaaaaaa    aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

1ek9a    ( 401)              GtL ne          naLskpv sTnpe
TolC          ( 396)  SALGTLNEQDLIALNNTLGKAIPISPD
              aaa    aaaaaaa bbbbbb
```

A B


1wp1a (1) c-slip dyqrpeapvaaaYpq gqaygqnt gaaavp AadiG Fr D
EefC (1) CVSLD PHYERPAAPVPATLPG--AHGESTAVVG------DWQKVVDV DARL
333 aaaa aaa
1wp1a (50) n lfpr igvdgs gtrqrl
EefC (43) KKVVS IALNSNRDVQKALADIEAARAQYGETRASLFPTVDAETS ---
aaaaa aaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa bbbbbbb bbbbb
1wp1a (100) pgdl St t gspaissq ygvt l gtt awel dlf G
EefC (90) ----SK TIASGLSSTSQADGAVSSFELDLFGKNQSLSRAARESSV FT
bbbbbbbbbbbb aaaaaaaaaaaaaa aaaaa
1wp1a (150) vg
EefC (136) AQNTR LTMIADLTTAWVTLATDNSNLALAQQTMDSAENSRKQVA AVG
aaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaa
1wp1a (200) vA s gsgip anlpqG
EefC (186) TASAG DLSSAESVYQQARASVASYRTLVAQDKNAINLLAGETVPP G
aa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
1wp1a (250) lgld-- qtLlteVpA GIP r aff
EefC (236) TLESL GDNSITLVPAGVSSSVLLRRPDIQEAEHNLKSANADIGAA FF
aaaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaa aa
1wp1a (298) p sisl t anagtmsrq lsg lfda gsgswlfqpsinl pifta g
EefC (286) PSISL TASAGVGSDSLSSLFSHGMQVWSFAPSISLPLFTGGSNRA A
bbbb bbbbbbbb 333 bbbbbbbbbbbb aaaa aaaaa
1wp1a (348) gt
EefC (336) QAEKK GLIATYEKSIQSAFKDVADALARRETLSEQLDAQQQYEQA SL
aaaaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaaaaaa aaaaa
1wp1a (398) t gvd nY G
EefC (386) DIAMKS YQAGVGDY SV TAQRTLWSAKATLLSLQQTDLNNV TSLG
aaaaa aaa aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa aaaa
1wp1a (448) GGwnqqt vt
EefC (436) GGAS-- ---
EefC
E. aerogenes
OprM
P. aeruginosa

C

D

Figure 2. Modélisation structurale de TolC et EefC d'*E. aerogenes*. A et C. Alignements des séquences de TolC d'*E. aerogenes* avec TolC d'*E. coli* (code PDB 1EK9 chaîne A); et de EefC d'*E. aerogenes* avec OprM de *P. aeruginosa* (code PDB 1WP1 chaîne A). Les éléments de structures secondaires de TolC d'*E. coli* et de OprM de *P. aeruginosa* sont indiqués : a, hélices α ; 3, hélices 3_{10} ; b, feuillets β. Selon le formatage des résidus par le programme JOY, les hélices α apparaissent en rouge ; les feuillets β en bleu ; les hélices 3_{10} en marron ; les résidus inaccessibles au solvant sont marqués en majuscules ; les résidus accessibles au solvant sont marqués en minuscules. Les principaux résidus déterminant l'architecture des monomères sont indiqués par un fond jaune. Les résidus déterminant l'aire électronégative périplasmique dans TolC et les résidus correspondant dans EefC sont indiqués par un fond bleu clair. **B et D.** Superposition des modèles tridimensionnels des monomères TolC et EefC d'*E. aerogenes* respectivement sur les structures tridimensionnelles de TolC d'*E. coli* et OprM de *P. aeruginosa*. Les figures ont été préparées avec PBD Viewer.

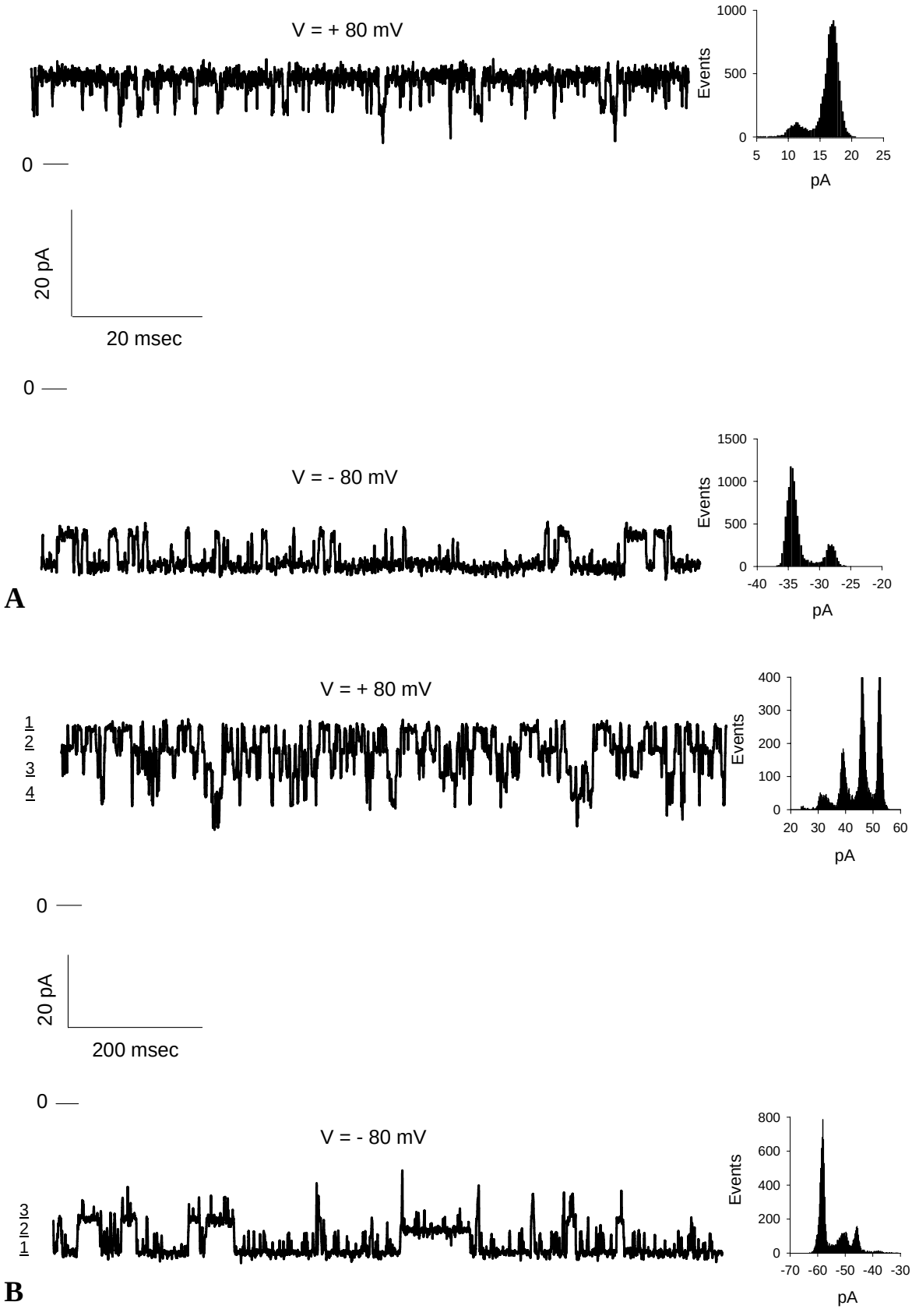


Figure 3. Conductances unitaires des canaux TolC et EefC d'*E. aerogenes*. Des liposomes d'asolectine géants contenant TolC ou EefC ont été étudiés en utilisant la méthode du pacth-clamp dans 10 mM Hepes pH 7,4/ 0,5 M KCl. Sélection d'enregistrements de TolC **(A)** et EefC **(B)** aux potentiels indiqués et leurs histogrammes d'amplitude associés.

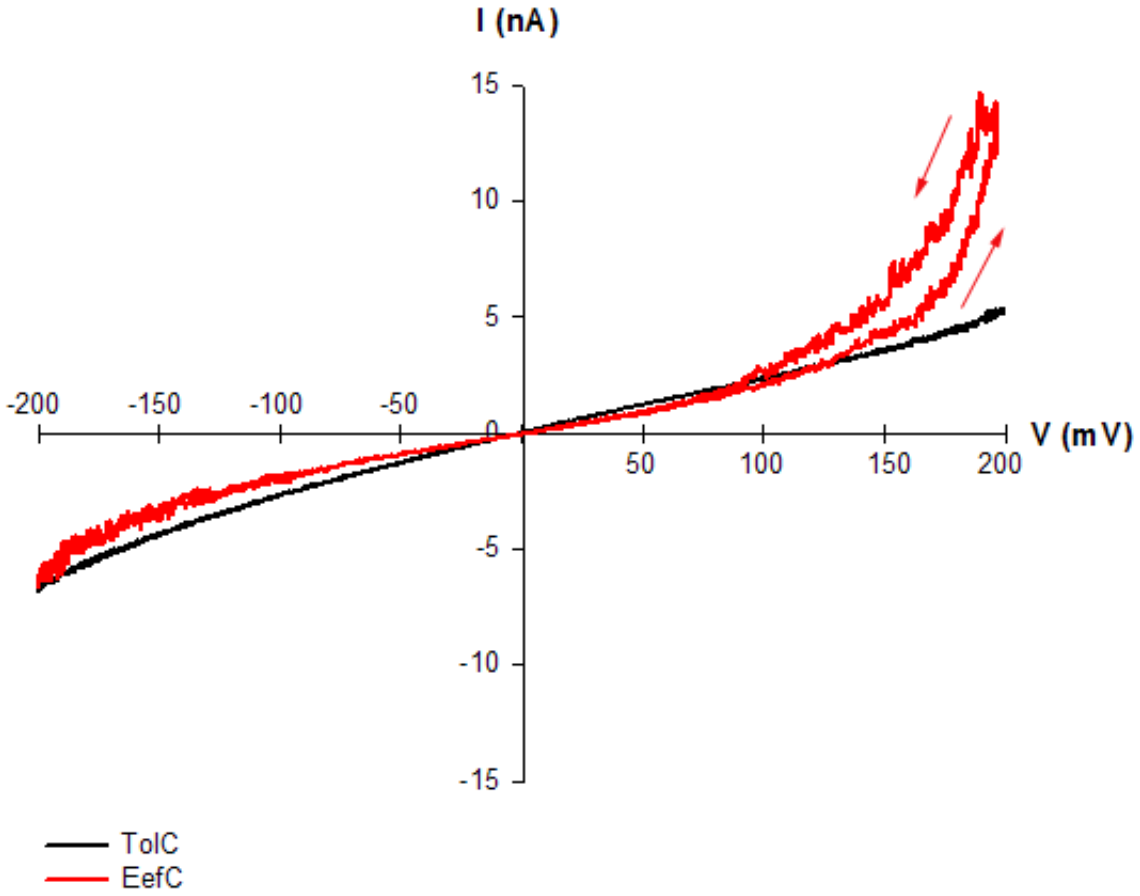


Figure 4. Courbes de courant macroscopique en fonction du voltage (I-V) pour TolC et EefC d'*E. aerogenes*. TolC et EefC (10 ng) ont été ajoutées du côté *cis* de la membrane d'asolectine baignant dans 10 mM Hepes pH 7,4/ 0,5 M KCl. Rampe de voltage : +/- 200 mV à 10 mV/sec.

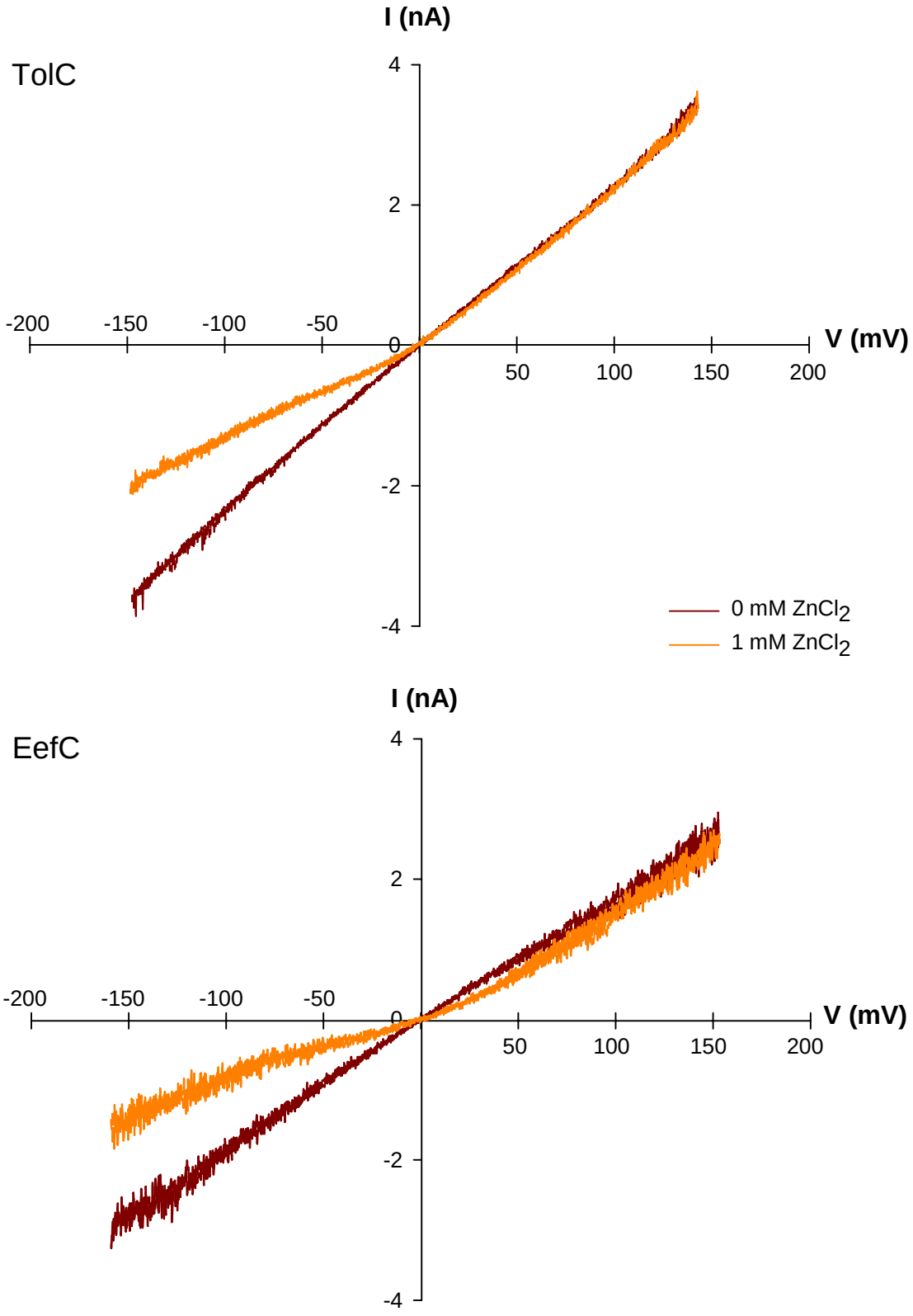


Figure 5. Inhibition de la conductance de TolC et de EefC par le zinc. TolC ou EefC (10 ng) a été ajoutée d'un côté de la membrane d'asolectine baignant dans 10 mM Hepes pH 7,4/ 1 M KCl. $ZnCl_2$ a été ajouté dans le compartiment *trans* aux concentrations finales indiquées. Rampe de voltage : +/- 150 mV à 2 mV/sec.

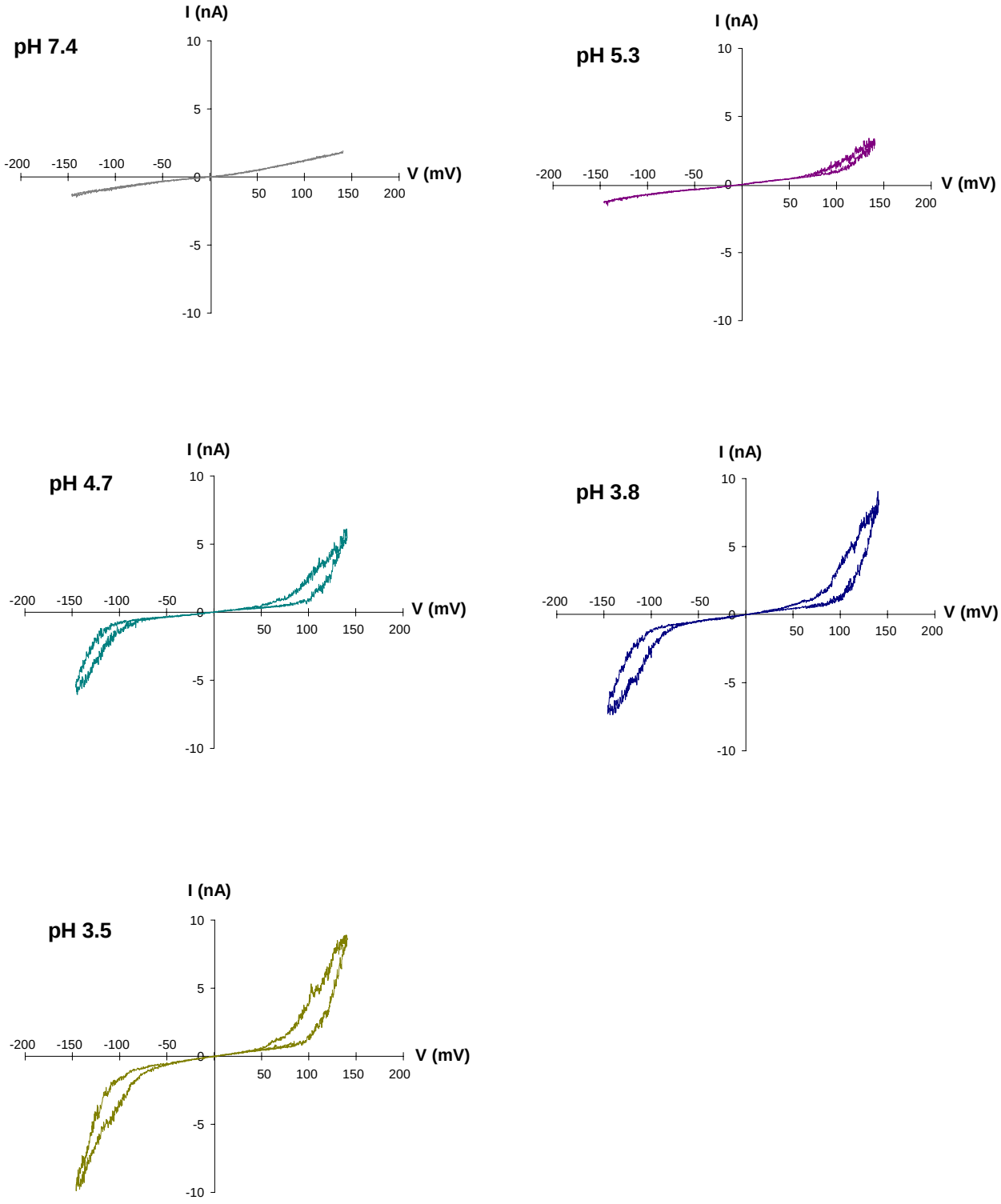


Figure 6. Courbes de courant macroscopique en fonction du voltage (I-V) pour TolC d'*E. aerogenes* à différentes valeurs de pH. TolC (10 ng) a été ajoutée d'un côté de la membrane d'asolectine baignant dans 10 mM Hepes pH 7,4/ 1 M KCl. Le pH du bain a été abaissé par additions successives de citrate 1M. Rampe de voltage : +/- 150 mV à 2 mV/sec.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'ensemble des données structurales sur les protéines d'efflux de membrane externe montre une architecture générale commune avec une extrémité périplasmique « fermée » (Koronakis *et al.*, 2000 ; Akama *et al.*, 2004b ; Federici *et al.*, 2005). L'analyse des caractéristiques électrophysiologiques des protéines reconstituées en bicouches lipidiques indique des conductances de l'ordre de 80 pS dans 1 M KCl et reflète ce faible diamètre d'ouverture (Andersen *et al.*, 2002a ; Wong *et al.*, 2001). L'extrémité périplasmique est la région clé de l'ouverture du pore nécessaire à l'efflux, mais elle représente aussi une cible pour le développement d'inhibiteurs capables de bloquer l'efflux.

La compréhension du mécanisme d'efflux nécessite une connaissance détaillée des évènements menant à l'ouverture du canal de membrane externe : les changements de conformation du transporteur induits par la fixation des substrats, la nature des interactions entre le canal et l'adaptateur périplasmique et le mécanisme d'ouverture du canal. Les moitiés N- et C-terminales des protéines d'efflux de membrane externe sont très homologues en séquence. Ainsi, les états ouverts des protéines TolC d'*E. coli* et VceC de *V. cholerae* ont été modélisés en réalignant les hélices C-terminales internes (H7 et H8) sur les hélices N-terminales externes (H3 et H4) (Koronakis *et al.*, 2000 ; Federici *et al.*, 2005). Andersen et coll. ont identifié des liens intra- et inter-moléculaires importants pour la stabilité de TolC dans sa conformation fermée (Andersen *et al.*, 2002c). Or, les résidus impliqués ne sont pas conservés et aucune de ces interactions ne sont possibles dans les homologues VceC et OprM cristallisés (Akama *et al.*, 2004b ; Federici *et al.*, 2005). L'hypothèse actuelle suggère des interactions entre le domaine équatorial des protéines de membrane externe et les hélices α *coiled-coil* des protéines de liaison périplasmiques. Il serait donc intéressant d'analyser le comportement de plusieurs mutants de différentes protéines de membrane externe reconstituées en bicouches. Ainsi, il serait possible d'identifier une (ou des) région(s) commune(s) impliquée(s) dans le mécanisme d'ouverture.

L'extrémité périplasmique est la seule zone de constriction dans les protéines d'efflux de membrane externe. L'inhibition de la conductance des canaux par des cations divalents est une propriété commune aux protéines TolC d'*E. coli*, TolC et EefC d'*E. aerogenes*. La structure 3D de TolC d'*E. coli* complexée à $Co(NH_3)_6^{3+}$ a été déterminée et montre que cet ion se fixe à l'entrée périplasmique du tunnel. Il est possible d'envisager la synthèse et le criblage *in vivo* de nouvelles molécules inhibitrices. Certaines molécules pourraient être testées selon leur capacité à bloquer la conductance des canaux. La modélisation des interactions *in silico* pourrait également améliorer le développement de telles molécules.

REVUE:

Inhibitors of efflux pump in Gram-negative bacteria. Jean-Marie Pagès, Muriel Masi, Jacques Barbe. Manuscrit accepté pour publication dans Trends in Molecular Medicine

Review TRENDS in Molecular Medicine Vol.11 No.8 August 2005

Full text provided by www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT

Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria

Jean-Marie Pagès[1], Muriel Masi[1] and Jacques Barbe[2]

[1]EA2197, IFR48, Faculté de Médecine, Université de la Méditerranée, 13385-Marseille, France
[2]GERCTOP UMR6178 CNRS, IFR48, Faculté de Pharmacie, Université de la Méditerranée, 13385-Marseille, France

In Gram-negative bacteria, efflux complexes, consisting of an inner-membrane pump, a periplasmic adaptor protein and outer-membrane channel, provide an efficient means for the export of structurally unrelated drugs, causing the multidrug-resistance phenotype. Resistance due to this antibiotic efflux is an increasing problem worldwide. A new molecular challenge is to combat this transport by searching for new molecules to block efflux and thus restore drug susceptibility to resistant clinical strains. Recent data shed new light on the structure and activity of the archetypal efflux pumps AcrAB–TolC and MexAB–OprM. Here, we describe recent insights into the molecular mechanisms of bacterial efflux pumps and their inhibitors. Current progress for the clinical use of efflux-pump inhibitors and new strategies to combat the drug-efflux mechanisms will be discussed.

Introduction

Active efflux systems – efflux pumps – are present in all living cells. They participate in the detoxifying process expelling various harmful compounds and xenobiotics. Originally described in mammalian cancer cells, this drug transport was reported among bacteria with tetracycline drugs in the early 1980s. The function of efflux pumps is to transport drugs through the bacterial envelope and limit the intracellular accumulation of toxic compounds (for example, antibiotics, antimicrobial peptides, metals and detergents). This pumping out is energized by ATP hydrolysis or by an ion antiport mechanism that contributes to the membrane energy state [1,2]. Interestingly, this efflux decreases the antibacterial activity of unrelated drug families and can be considered a 'general' resistance mechanism that cooperates with the target mutations, reduced membrane permeability or drug modifications [1–8].

Consequently, bacteria become insensitive to antibiotherapy and the colonization of patients is made easier. With the lack of development of new antimicrobial drugs, the emergence of multidrug resistance (MDR) phenotypes is like a sword of Damocles for public health. Faced with this threat, new therapeutic approaches must be looked for, including a careful use of current drugs and the search for new molecules.

Corresponding author: Pagès, J.-M. (Jean-Marie.Pages@medecine.univ-mrs.fr).
Available online 29 June 2005

The aim of this review is to summarize the recent structure–function data for efflux pumps, describe the current efflux inhibitors and draw attention to the clinical impact of MDR Gram-negative bacteria.

Bacterial efflux systems

The envelope of Gram-negative bacteria comprises two membranes: the inner, or cytoplasmic, membrane and the outer membrane, which are separated by the periplasmic space. This organization results in the presence of various proteins that expel different harmful compounds (positively or negatively charged, neutral or zwitterionic) [1]. The membrane-located transporters can be grouped into the four following families [1,5], based upon sequence homology, mechanism and supramolecular characteristics:

(i) ATP-binding cassette (ABC) transporters (traffic ATPases)
(ii) Small multidrug resistance (SMR)
(iii) Resistance–nodulation–division (RND)
(iv) Major facilitator superfamily (MFS)

In Gram-negative bacteria, efflux machineries display a complex arrangement comprising a cytoplasmic membrane-located transporter, a periplasmic-located membrane adaptor protein and an outer-membrane channel protein. In spite of rapid progress in the identification of a variety of bacterial drug transporters (see http://www.biology.ucsd.edu/~msaier/transport/), several questions have yet to be satisfactorily answered. In particular, many membrane channels remain to be unambiguously identified [1,5]. Furthermore, several species, such as *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, contain redundant efflux systems with overlapping properties: 37 distinct active-efflux gene systems were reported in *E. coli* [9]. The advantage of redundancy is that the mutational loss of one system does not render the bacterium irreparably susceptible to cytotoxic agents. In addition, such a system is not easily overwhelmed by an increasing amount of substrates. Efflux systems with broad substrate specificities can be seen as an adaptive advantage compared with more-specific pumps, which can only confer resistance to single antibacterial agents. In various environmental sites, bacteria are faced with biocides, antiseptics, antimicrobial peptides and detergents, which favor the emergence of well-adapted strains overproducing efflux systems. In addition to the use of antimicrobial agents, several natural compounds

 1471-4914/$ - see front matter © 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved. doi:10.1016/j.molmed.2005.06.006

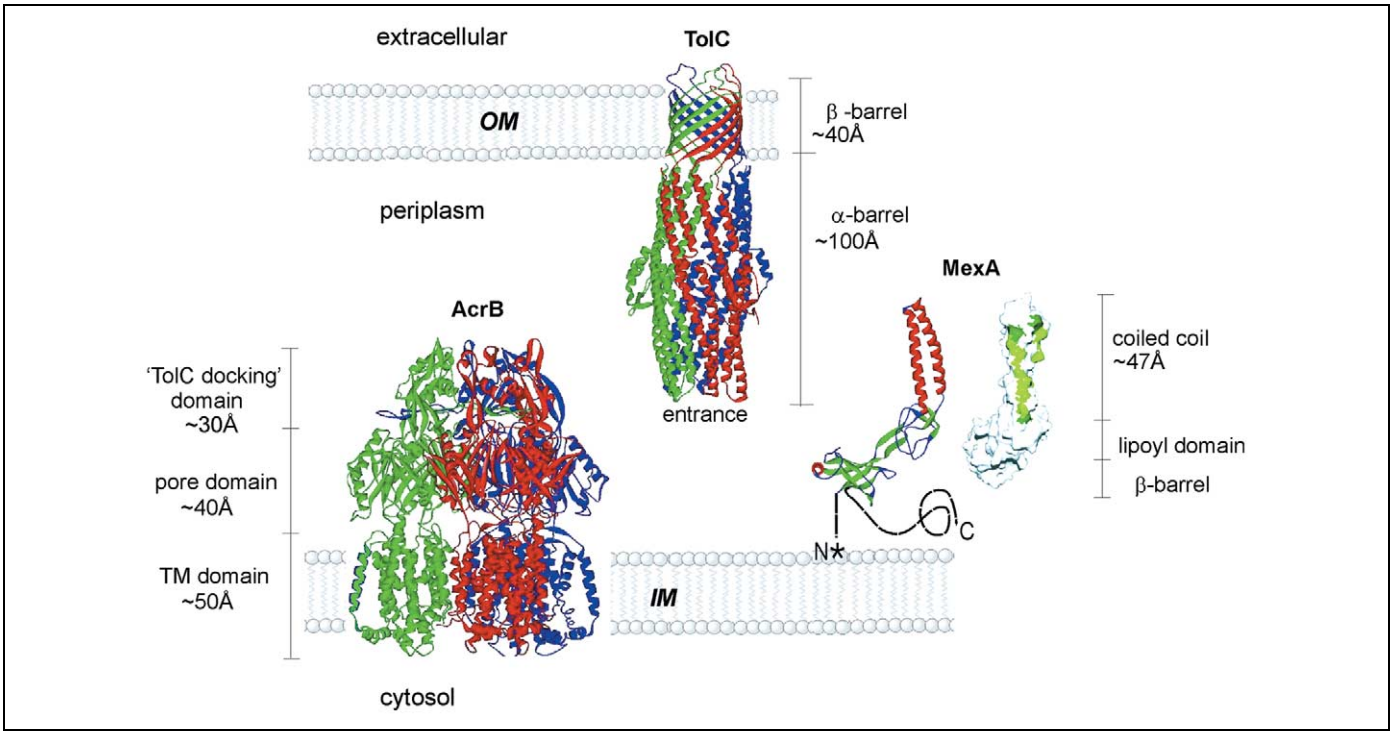


Figure 1. Structure of the tripartite efflux pump AcrAB–TolC (reproduced from Eswaran *et al.* [3]). Protomers of the trimeric AcrB and TolC proteins are colored blue, red and green. The MexA monomer is colored by secondary structure (red, α helices; green, β strands; blue, loops).

(for example, bile salts or flavonoids) are efficient activators of efflux expression, [10–12].

AcrAB–TolC and MexAB–OprM efflux pumps

In Gram-negative bacteria, the well-described complexes AcrAB–TolC and MexAB–OprM act to expel various antibiotic molecules (Figure 1). The recent resolution of the three-dimensional structures of TolC and AcrB from *E. coli* and MexA and OprM from *P. aeruginosa* gave rise to a better understanding of the efflux mechanism in Gram-negative bacteria (Box 1, Figure 1) [13–16]. In addition to these structural data, stable tripartite AcrA–AcrB–TolC complexes have been demonstrated by cross-linking and the differential fractionation of membranes [17,18]. However, important features remain unclear: the presence of a substrate (such as a drug) that is involved in the preliminary assembly of the complex is controversial, the role of the adaptor protein (the fusion periplasmic protein, such as AcrA or MexA) in the efflux process is poorly understood and a current hypothesis suggests that this protein transmits energy from the inner transporter to the outer channel.

AcrB has been crystallized in the presence of various ligands and the structure of co-crystals was resolved by X-ray crystallography. This first structural analysis of the transporter–ligand interaction demonstrates the presence of composite substrate-binding sites located inside AcrB, the internal cavity of which is highly flexible [19]. These data indicate that efflux pumps can accommodate themselves to transport a wide range of substrates, providing evidence for nonspecific drug transport [19,20]. This is strongly supported by the characterization of various clinical isolates expressing efflux pumps that are associated with the MDR phenotype. Moreover, the recent resolution of the three-dimensional structures of other drug transporters gives new clues to understand the structure–activity relationships in drug efflux [21–23].

Box 1. RND-efflux system: AcrAB–TolC and MexAB–OprM efflux-pump archetype

TolC is a homotrimeric exit duct that contains an outer-membrane β-barrel, prolonged by a 100 Å α-helical transperiplasmic tunnel. Although the TolC exit duct is constitutively open to the cell exterior with a pore diameter of 35 Å, the periplasmic domain folds into coiled-coil α-helices that constrict the entrance. Andersen and co-workers [68,69] proposed an iris-like transition to the open state based on the realignment of the inner coils on the outer ones, which is a prerequisite for efficient drug transport. Interactions with the periplasmic adaptor and/or the inner-membrane transporter could lead to such conformational changes. The drug transporter AcrB, which is also assembled as a trimer, contains two structural domains: a transmembrane domain that is topped by a large domain that protrudes ~70 Å into the periplasm. The length and topology of the periplasmic domains of both TolC and AcrB could afford direct interactions between the two partners. Substrates might access the AcrB central cavity either from the cytoplasm through the transmembrane region or from the periplasm through the AcrB lateral vestibules [70]. Analysis of the MexA protein suggests that the assembly of nine monomers results in a ring-shape structure that is sufficiently large to encircle the modeled open state of the outer-membrane component.

Efflux-pump inhibitors (EPIs)

The pace of anti-infective research has collapsed dramatically in the past decade; only two new anti-infective molecules obtained FDA approval in 2004 and few antibacterials are in pre- or clinical developments [24,25]. Consequently, novel molecules that overcome the resistance mechanisms involving enzymes, mutations or efflux appear to be a suitable strategy to bypass the restricted number of new antibiotics. With respect to this,

the efflux activity and pump components are putative targets for the development of new molecules [1,26–28]. To specifically block the activity of drug efflux pumps, several possibilities can be listed: create a jam in the outer-membrane channel, generate competition in the inner-membrane pump, alter the pump assembly or collapse the energy component of the mechanism (Figure 2). The recent demonstration of drug capture in the periplasm and outer-membrane pumping out, termed 'periport', by Lomovskaya and Totrov [29] offers the possibility to use periplasmic transit blockers to obstruct the AcrB-pump central cavity. From the structural data [20], few amino acid residues are involved in interactions with the transported substrate and these strategic sites are well preserved in the various efflux pumps belonging to the AcrB family. This multiplicity of sites might be the basis of the difference observed in the efflux rate of drugs.

To date, the activities of several structurally unrelated compounds (Figure 2) have been assessed on diverse drug-resistant Gram-negative bacteria, including *E. coli*, *Enterobacter aerogenes, Klebsiella pneumoniae, Campylobacter jejuni, P. aeruginosa* and *Salmonella enterica* [28,30–39]. These compounds include: (i) phenylalanyl arginyl β-naphthylamide (PAβN), an EPI that potentiates levofloxacin activity in resistant *P. aeruginosa* strains; (ii) globomycin, an inhibitor of lipoprotein-precursor-processing enzyme; (iii) carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone, an energy uncoupler that collapses the membrane energy; (iv) various quinolines, which block drug efflux in various clinical isolates; and (v) arylpiperazine derivatives, which reverse MDR in *E. coli* cells that overexpress efflux pumps. These molecules significantly and rapidly increase the intracellular accumulation of different efflux-sensitive drugs, such as quinolones, chloramphenicol or macrolides, in clinical isolates expressing different levels of efflux pumps, without affecting the integrity of the membrane under the conditions used. However, some EPIs, such as PAβN, can affect membrane integrity when used at high concentrations [34]. This point is of special interest because it might induce the emergence of resistance profiles, such as those described for certain cationic antimicrobial peptides or polymyxines (modification of the lipopolysaccharide structure inducing a change in drug penetration).

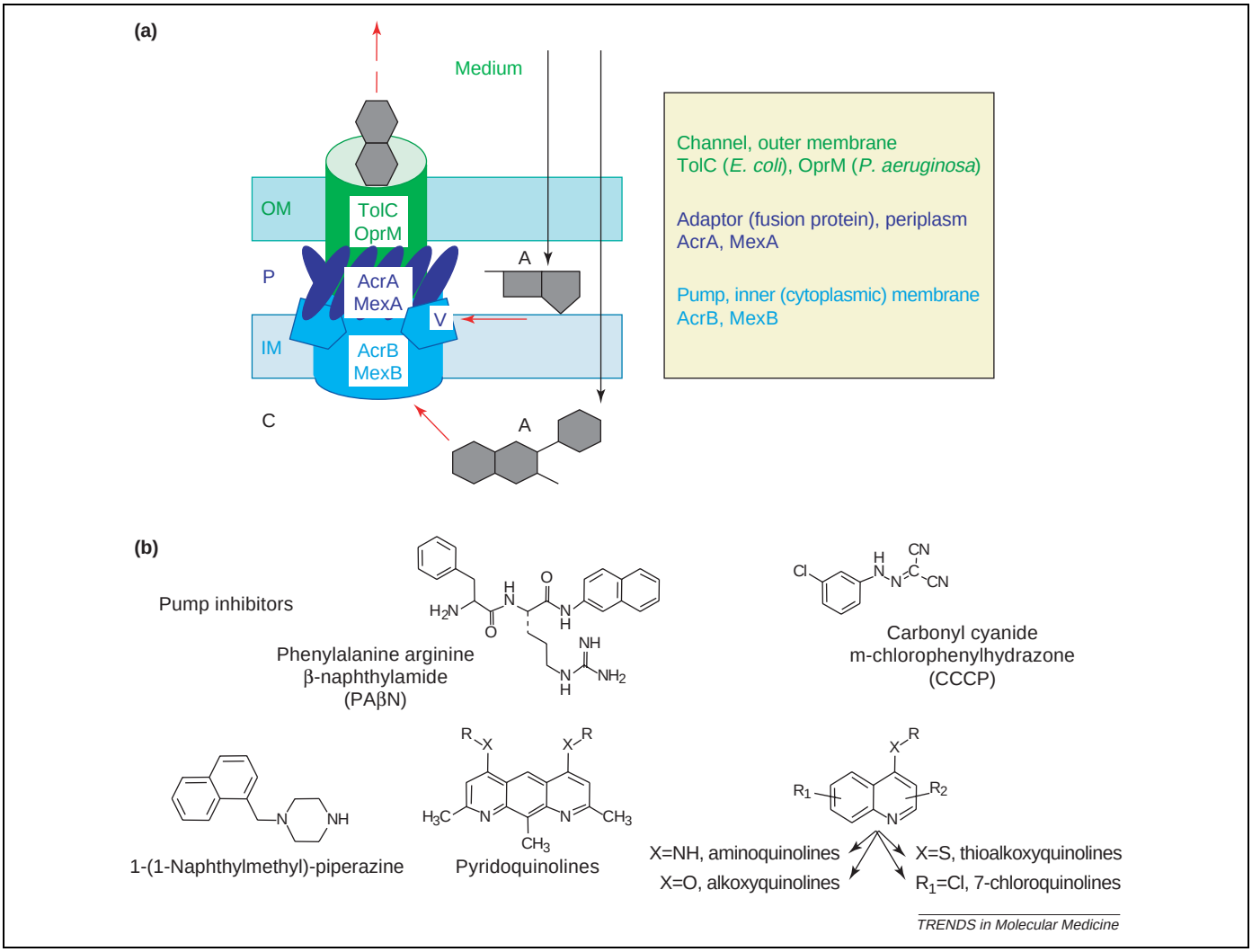


Figure 2. Efflux pump, potential targets and inhibitors. **(a)** AcrAB–TolC (*E. coli*) and MexAB–OprM (*P. aeruginosa*) assemblies are illustrated. The ejection of an antibiotic molecule is presented through the efflux pumps AcrAB–TolC or MexAB–OprM. The arrows represent the drug flows: a thick red arrow for the efflux and thin black arrow for the penetration, respectively. **(b)** Selected efflux-pump inhibitors [PAβN, CCCP, quinoline derivatives and 1-(1-Naphthylmethyl)-piperazine] are presented. Abbreviations: A, antibiotic molecule; C, cytoplasm; IM, inner (cytoplasmic) membrane; OM, outer membrane; P, periplasm; v, AcrB–MexB periplasmic vestibule.

For specific efflux pumps, many putative inhibitors that share tetracycline-analogue structural properties have been screened to combat the tetracycline efflux mechanism. Some of them demonstrate an interesting reversal capacity and these studies indicate that tetracycline derivatives, identified by their ability to block the Tet(B) efflux protein, can restore tetracycline activity against resistant bacteria bearing either of the two known resistance mechanisms (efflux and a ribosomal-protection mechanism) [40]. Blocking specific drug efflux and increasing intracellular drug concentrations constitute an effective approach to reverse tetracycline resistance in Gram-negative bacteria [41].

Another series of inhibitors have been developed to target the quinolone resistance and efflux pumps acting in the major opportunist pathogen *P. aeruginosa*. The high-throughput screening of a molecule collection on *P. aeruginosa* drug-resistant strains that express the MexAB, MexCD, MexEF and MexXY pumps enabled the discovery of peptidomimetics that could block drug efflux [27,42,43]. Diamine compounds were largely studied to design an efficient EPI [44]. PAβN and D-Orn-D-hPhe-3-aminoquinoline carry high chemosensitizer properties and inhibit *P. aeruginosa* efflux pumps [43,45] and PAβN itself was determined to be a substrate for the MexAB–OprM pumps [34]. Among the dipeptide amide products, PAβN exhibits an effect on efflux mechanisms in various Gram-negative bacteria, including *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *S. enterica* and *C. jejuni* [35,39,46,47]. In addition, PAβN reduces the emergence of levofloxacin-resistant *P. aeruginosa* strains [34]. Although the inhibition of Mex efflux pumps is significant, the general use of this molecule remains questionable owing to the divergent results obtained from various other resistant pathogens [48,49]. The optimization of these diamine-containing EPIs with respect to the restoration of levofloxacin activity versus *P. aeruginosa* resulted in the lead compound MC-04 124. This compound exhibits higher stability and reduced toxicity in experimental infections using an efflux-overexpressed strain of *P. aeruginosa* [43,45]. The interest of this diamine family comes first from its efflux-inhibitory capacity, which is associated with a reversal of fluoroquinolone resistance, second from its efficiency on *P. aeruginosa* efflux mechanisms and finally from its potent broad-spectrum activity.

With the aim of screening a limited molecular library on a collection of several clinical *E. aerogenes* and *K. pneumoniae* isolates, the activities of several quinoline derivatives, including various pyrrido-, alkoxy-, thioalkoxy-, alkylamino- and chloro- derivatives, were recently described [30,32,33,50,51]. Some of these compounds showed an interesting potential (i) to restore an intracellular concentration of antibiotic molecules expelled by efflux pumps and (ii) to induce a significant increase in the antibiotic susceptibility for various strains, including the selected resistant isolates. It is important to mention that these molecules have no intrinsic effect on membrane integrity under the concentrations and conditions used for restoring antibiotic susceptibility [30]. The magnitude of the effect of quinoline derivatives on drug susceptibility depends on the phenotype of clinical isolates, which can also include the mutation of the drug target and the modification and alteration of membrane permeability by specific enzymes, in addition to the efflux mechanism. However, the restoration of susceptibility obtained in *E. aerogenes* with the most active quinolines [30,32] is significantly better than that obtained with PAβN for some of the antibiotic classes tested (fluoroquinolones, tetracycline and chloramphenicol). This result could be attributed to differences in the internal structure of the active efflux pump in both *E. aerogenes* and *P. aeruginosa*. Alternatively, the volumes of the inhibitors differ, and PAβN exhibits a larger volume compared with that of quinoline derivatives; this could generate additional steric hindrances impairing the access of the inhibitor to the site located inside the cavity of the *E. aerogenes* pump. On this subject, it must be mentioned that the alkyl side chain that is branched on the heterocyclic moiety in the 4-alkylamino quinolines has a prominent role [32]. In this context, the best side chain (piperidinoethyl) also generates an efficient restoration of drug susceptibility when used in alkoxy and thio-alkoxy quinolines [52]. However, reversal activity increases from the oxo derivatives to the amino ones through the thio-alkyl compounds [30,32,52]. Thus, the nature of the heteroatom connecting the side chain to the ring is also of interest. Finally, the reversal potential is also modulated depending on the position of substituted groups directly branched on the ring but not depending on their electronic effects. These observations suggest that the pharmacophoric structures evaluated can bind to or mask the amino acid residues involved in the drug site if the molecular volume and charge are well adapted to the AcrB cavity. Under these conditions, the resulting complexes block the selective binding site or induce steric hindrances that collapse choramphenicol, norfloxacin and tetracycline transport [30,32,50,51]. However, with the recent determination of distinct sites located inside AcrB cavity that interact with selective drugs [19,20], it is reasonable to favor the steric hindrance hypothesis with the EPIs rather than a specific inhibition of the various binding sites.

Two other chemical families, pyridopyrimidines and arylpiperazines, have been also studied. The pyridopyrimidine derivatives have been assayed as inhibitors of the MexAB–OprM efflux pump and extensive studies have been carried out to improve their inhibitory activities against the *P. aeruginosa* efflux pump [36,50]. Some of the intrinsic problems associated with these efficient compounds (such as low stability and high affinity towards the serum proteins) have been addressed using molecular modeling; the resulting pyridopyrimidine derivatives exhibit improved properties [36,51]. However, further investigations are required to improve the solubility of these compounds for possible intravenous use. Arylpiperidines have been screened as potentiators of novobiocin activity in *E. coli* cells by high-throughput assays [37]. A subsequent assay, using the effect of different piperidine derivatives on the intracellular accumulation of linezolid, analyzed the level of inhibition of efflux pumps. The aryl substitutions, the tether length connecting the aryl and piperidine rings and the fluorine group have important roles in the reversal activity of this arylpiperidine

group [37]. Recently, structure–activity relationship studies reported the role of the spacer length between the arylpiperazine core and side chains in the inhibitory capacity of these drugs. Within the arylpiperazine family tested by Bohnert and Kern [38], 1-(1-naphthyl)piperazine and 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine significantly enhanced bacterial susceptibility to levofloxacin and other antibiotics (clarithromycin, linezolid, oxacillin, rifampin, chloramphenicol and tetracycline). The addition of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine induces an increase in the intracellular concentration of levofloxacin in an AcrAB-overproducing *E. coli* strain, similar to that obtained with PAβN; this indicates an inhibition of the efflux pump [38].

In spite of these efforts, none of the efflux inhibitors tested is yet in clinical use. However, some of them have been fruitfully used to determine the efflux prevalence in clinical isolates. In addition, two EPIs identified from peptidomimetic investigations are in preclinical development [24]. The reasons for this paucity are the difficulty in completely eliminating adverse effects, such as activity against the detoxifying eukaryotic efflux mechanisms, and the fact that most of the described molecules exhibit intrinsic pharmacological properties. Although these points remain unresolved, recent results are encouraging for the future use of inhibitors.

Clinical impact of drug efflux mechanisms

Efflux systems *per se* generate an initial level of resistance corresponding to a 4–64-fold increase in minimal inhibitory concentration (MIC) values for the drugs expelled [1,2,6]. This impact could be questionable because of (i) the small number of studies in the field, (ii) the lack of specific criteria, including the determination of flux kinetics, the affinity constant or the specificity of characterized efflux mechanism, and (iii) the few bacterial species genetically and biochemically investigated. Hence, it is difficult to estimate the precise role of efflux in clinical resistance and its impact on therapeutic failure. However, studies with *E. coli* and *P. aeruginosa* strains presenting deletions of the efflux pump or using plasmids encoding efflux pumps in efflux-deleted strains have enabled the investigation of diverse pumps [9,29,44].

The intrinsic resistance of *Enterobacteriaceae* against macrolides and ketolides is mainly due to an efflux activity that partially involves the general AcrAB–TolC complex [53]. For example, the MICs for macrolides is ~128–512 μg/ml for *E. coli* or *E. aerogenes* strains that display susceptibility towards a large panel of antibiotics; by contrast, the deleted AcrAB–TolC strains exhibit MIC values of 4–32 μg/ml for macrolides. A susceptible phenotype (MIC ~0.25–1 μg/ml) is restored in the presence of an efflux inhibitor. This demonstrates the role of efflux in the macrolide susceptibility of Gram-negative bacteria [53].

The simultaneous contribution of efflux pumps and target mutations has been extensively reported for *K. pneumoniae, E. aerogenes* and *P. aeruginosa* strains isolated after quinolone treatment. Recently, the presence of active efflux in *K. pneumoniae* strains isolated from Turkish hospitals was investigated by using (i) efflux inhibitors for evaluating changes in the MIC values of diverse antibiotics, (ii) immunodetection of efflux-pump components and (iii) determination of the intracellular drug concentration. The authors concluded that 39% of resistant isolates exhibit active efflux, which is involved in the resistance against the quinolone and the phenicol classes [46]. Similarly, the role of AcrA in fluoroquinolone-resistant *K. pneumoniae* isolates from Singapore has been investigated; among ten strains that are also tolerant to organic solvents, five overexpress AcrA [54]. In addition, several studies report the association of porin loss with the expression of an active efflux of quinolones in clinical *K. pneumoniae* strains [47,55].

The role of the AcrAB–TolC pump in several *E. aerogenes* clinical isolates showing resistance towards quinolone, phenicol and tetracycline drugs has been reported [56,57]. Various EPIs significantly increase the antibiotic susceptibility of these clinical isolates. Measurements of intracellular drug accumulation performed in the presence of a molecule that collapses membrane energy indicate the significant contribution of active efflux systems in the resistance of clinical isolates [30–32]. The overexpression of AcrAB in these isolates shows the role of this pump in the emergence of resistant variants in the hospital environment [57].

In *P. aeruginosa*, fluoroquinolone resistance is associated with efflux-pump overexpression and/or target mutations [2]. In a recent study, Kriengkauykiat *et al.* [58] used PAβN, the efflux inhibitor previously described to potentiate levofloxacin activity [44], to examine the prevalence of efflux in clinical isolates. The overexpression of PAβN-sensitive efflux was detected in 60% of fluoroquinolone-resistant strains without cross-resistance and was present at variable frequencies (86–27%) among strains with cross-resistance to other antibiotics. Efflux-mediated resistance results in a significant contribution to the MDR phenotype in *P. aeruginosa* clinical isolates [58].

The synergistic effect of various mechanisms has also to be mentioned in the β-lactam resistance observed in *Neisseria gonorrhoeae* [59]. The MtrCDE efflux system is involved in resistance against detergents, drugs and antimicrobial peptides [60]. To confer a significant resistance level to penicillin (up to a 60-fold increase in MIC), MtrCDE acts in conjunction with (i) a mutation on the penicillin-binding protein (PBP2) that reduces the affinity of the drug for the periplasmic target and (ii) an alteration of the outer-membrane porin (PorIB) that decreases drug uptake [59–61].

Finally, clinical strains in which overexpressed efflux pumps contribute to the MDR phenotype have also been described in other Gram-negative bacteria, such as *E. coli*, *C. jejuni, Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *S. enterica* and *Shigella* spp.

Prospects

The resolution of the three-dimensional structure of the tripartite efflux complex and co-crystallization studies of AcrAB with different substrates have provided important insights into the interactions between the antibiotics and the pump. With recent studies based on modeling and molecular dynamic simulations of β-lactam translocation through the porin channel [62,63], a similar approach is

now conceivable for deciphering antibiotic transport through the efflux pump. By combining the results obtained from site-directed mutageneses and hybrid efflux pumps with these modeling studies, the role of particular amino acid residues in the removal of drugs through the pump could be portrayed more precisely. A recent study investigated the affinity between efflux-pump substrates and efflux inhibitors [64]; this work provides an original method for screening new molecules. These pieces of information will be of major interest (i) for the rational design of an antibiotic structure that is less recognized by the efflux pump, (ii) for improving the affinity of existing inhibitors for the efflux pumps and (iii) for designing channel blockers that close the outer channel in a similar manner to the polyamines with porins. Another interesting point is the role of the outer-channel components, such as TolC, which are involved in the secretion of bacterial toxins; with respect to this, the development of channel blockers could also lead to novel weapons to be used against the secretion of virulence factors.

A different but potentially fruitful field concerns the regulation of the expression of efflux-pump components. Several regulators (for example, MarA and RamA) and chemical inducers (e.g. salicylic acid and chloramphenicol) with a role in the control of pump expression have been identified [65–67]. Analyses of the regulation cascade and the definition of effector binding sites might offer new clues to block the production of drug transporters. This might be an opportunity not only for tackling the chemoresistance problem but also for controlling the production of virulence factors.

Concluding remarks

Efflux pumps clearly reduce the activity of many antibiotic families. Inhibition of the pumps involved can restore the drug susceptibility of resistant strains and might favor the clinical activity of some 'old' antibiotics.

The activities of efflux inhibitors, such as diamine compounds, have been demonstrated in animal models with *P. aeruginosa* infections and two EPIs are in preclinical development. In addition to these molecules, the restoration of antibiotic susceptibility with other compounds has been successfully reported in *E. coli, E. aerogenes* and *K. pneumoniae*, among others, reflecting the promising potential of the combination 'antibiotic and efflux inhibitor'. However, many points remain concerning the concept of a general inhibitor (i) targeting all bacterial efflux pumps or (ii) restoring the activity for various antibiotic families. These points must be satisfied with the aim of improving the design of a new generation of inhibitors. Moreover, the development of molecules having affinity for the outer-membrane channel (such as TolC and OprM), by analogy to colicins which use these proteins as cell-surface receptors, should also represent possibilities to search for novel channel blockers. In addition, it is worth noting that the diagnosis of MDR bacteria based on the use of efflux inhibitors or efflux genes probes would enhance our capability to identify resistant pathogens and consequently select a suitable therapy (Box 2).

Box 2. Future for efflux pumps and inhibitors

Given the present concern over the lack of new antibiotics and the emergence of MDR bacteria, there is an urgent requirement (i) to develop the early diagnosis of the MDR phenotype by using genetic (real-time PCR on efflux transcripts) or biochemical (antibiotic susceptibility in the presence of inhibitors) assays and (ii) to identify clear targets to block the efflux mechanism (inner pump or outer channel) and to select molecules presenting a high inhibitory potential with minimal adverse effects (no toxic effects on eukaryotic pumps). As regards the inhibitor, the heart of the matter is in its properties: should it be a 'general blocker' that inhibits all activities of pumps (by inactivating the transport of all antibiotics) or a 'specific blocker' that collapses the transport of only one drug family (by recognition of a specific site); the respective advantages and drawbacks of these characteristics should be thus investigated, taking into account the resulting selective pressure on the bacterial population (enabling the selection of resistance), in addition to the effects on preclinical use of this new antibacterial agent family. The forthcoming data (from mutagenesis, co-crystallization, modeling and dynamic studies and preclinical investigations) will help to design, optimize the affinity and activity and finally choose novel compounds.

Acknowledgements

We gratefully thank J. Chevalier, A. Davin-Régli, S. Alibert-Franco and A. Mahamoud for fruitful discussions during the preparation of this manuscript and A. Favard for writing it. We apologize to those whose papers and studies are not cited owing to space limitation.

References

1 Li, X.Z. and Nikaido, H. (2004) Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 64, 159–204
2 Poole, K. (2004) Efflux mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 12–26
3 Eswaran, J. *et al*. (2004) Three's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14, 741–747
4 Levy, S.B. (2002) Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *J. Appl. Microbiol.* 92 (Suppl.), 65S–71S
5 Saier, M.H. and Paulsen, I.T. (2001) Phylogeny of multidrug transporters. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12, 205–213
6 Poole, K. (2002) Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram negative bacteria. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 3, 77–98
7 Nikaido, H. (2003) Molecular basis of outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 593–656
8 Pagès, J-M. (2004) Role of bacterial porins in antibiotic susceptibility of Gram-negative bacteria. In *Bacterial and Eukaryotic Porins* (Benz, R., ed.), pp. 41–59, Wiley-VCH Verlag Press
9 Nishino, K. and Yamaguchi, A. (2001) Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 5803–5812
10 Rosenberg, E.Y. *et al*. (2003) Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. *Mol. Microbiol.* 48, 1609–1619
11 Burse, A. *et al*. (2004) The phytoalexin-inducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17, 43–54
12 Prouty, A.M. *et al*. (2004) Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella typhimurium*. *Microbiology* 150, 775–783
13 Akama, H. *et al*. (2004) Crystal structure of the membrane fusion protein, MexA, of the multidrug transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 279, 25939–25942
14 Higgins, M.K. *et al*. (2004) Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 9994–9999
15 Koronakis, V. *et al*. (2000) Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405, 914–919

16 Murakami, S. *et al*. (2002) Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419, 587–593
17 Tikhonova, E.B. and Zgurskaya, H.I. (2004) AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* form a stable intermembrane multidrug efflux. *J. Biol. Chem.* 279, 32116–32124
18 Touze, T. *et al*. (2004) Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB–TolC multidrug efflux system. *Mol. Microbiol.* 53, 697–706
19 Yu, E.W. *et al*. (2003) Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump. *Science* 300, 976–980
20 Yu, E.W. *et al*. (2003) AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. *J. Bacteriol.* 185, 5657–5664
21 Hirai, T. *et al*. (2002) Three-dimensional structure of a bacterial oxalate transporter. *Nat. Struct. Biol.* 9, 597–600
22 Abramson, J. *et al*. (2003) Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* 301, 610–615
23 Ma, C. and Chang, G. (2004) Structure of the multidrug resistance efflux transporter EmrE from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2852–2857
24 Overbye, K.M. and Barrett, J.F. (2005) Antibiotics: where did we go wrong? *Drug Discov. Today* 10, 45–52
25 Lewis, K. (2001) In search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 247–254
26 Sheridan, C. (2005) Antiinfective biotechs face partnering gap. *Nat. Biotechnol.* 23, 155–156
27 Lomovskaya, O. and Watkins, W. (2001) Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3, 225–236
28 Maseda, H. *et al*. (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.* 4, 1320–1328
29 Lomovskaya, O. and Totrov, M. (2005) Vacuuming the periplasm. *J. Bacteriol.* 187, 1879–1883
30 Chevalier, J. *et al*. (2004) Inhibitor of antibiotic efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1043–1046
31 Malléa, M. *et al*. (2002) Inhibitors of antibiotic efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1370–1373
32 Malléa, M. *et al*. (2003) Alkylaminoquinolines inhibit bacterial antibiotic efflux pump in multidrug-resistant clinical isolates. *Biochem. J.* 376, 801–805
33 Chevalier, J. *et al*. (2001) New pyridoquinoline derivatives as potential inhibitors of the fluoroquinolone efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains. *J. Med. Chem.* 44, 4023–4026
34 Lomovskaya, O. *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
35 Baucheron, S. *et al*. (2002) The AcrB multidrug transporter plays a major role in high-level fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium phage type DT204. *Microb. Drug Resist.* 8, 281–289
36 Nakayama, K. *et al*. (2003) MexAB–OprM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 4201–4204 and 4205–4208
37 Thorarensen, A. *et al*. (2001) 3-Arylpiperidines as potentiators of existing antibacterial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 1903–1906
38 Bohnert, J.A. and Kern, W.N. (2005) Seleted arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overproducing RND efflux pumps. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 849–852
39 Mamelli, L. *et al*. (2003) A phenylalanine arginine β-naphthylamide sensitive multidrug efflux pump involved in intrinsic and acquired resistance of *Campylobacter* to macrolides. *Int. J. Antimicrob. Agents* 22, 237–241
40 Nelson, M.L. and Levy, S.B. (1999) Reversal of tetracycline resistance mediated by different bacterial tetracycline resistance determinants by an inhibitor of the Tet(B) antiport protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1719–1724
41 Chopra, I. (2002) New developments in tetracycline antibiotics: glycylcyclines and tetracycline efflux pump inhibitors. *Drug Resist. Updat.* 5, 119–125
42 Renau, T.E. *et al*. (2002) Peptidomimetics of efflux pump inhibitors potentiate the activity of levofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 763–766
43 Renau, T.E. *et al*. (2003) Conformationally-restricted analogues of efflux pump inhibitors that potentiate the activity of levofloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 2755–2758
44 Lomovskaya, O. *et al*. (1999) Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1340–1346
45 Watkins, W.J. *et al*. (2003) The relationship between physicochemical properties, *in vitro* activity and pharmacokinetic profiles of analogues of diamine-containing efflux pump inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13, 4241–4244
46 Hasdemir, U.O. *et al*. (2004) Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2701–2706
47 Chevalier, J. *et al*. (2000) Modification of membrane permeability involved in antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 274, 496–499
48 Ribera, A. *et al*. (2002) Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 697–698
49 Sanchez, P. *et al*. (2003) The efflux pump inhibitor Phe–Arg–β-naphthylamide does not abolish the activity of the *Stenotrophomonas maltophilia* SmeDEF multidrug efflux pump. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 1042–1045
50 Nakayama, K. *et al*. (2004) MexAB–OprM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 3: Optimization of potency in the pyridopyrimidine series through the application of a pharmacophore model. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 475–479
51 Nakayama, K. *et al*. (2004) MexAB–OprM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 4: Addressing the problem of poor stability due to photoisomerization of an acrylic acid moiety. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 2493–2497
52 Gallo, S. *et al*. (2003) 4-Alkoxy and 4-thioalkoxyquinoline derivatives as chemosensitizers for the chloramphenicol resistant clinical *Enterobacter aerogenes* 27 strain. *Int. J. Antimicrob. Agents* 22, 270–273
53 Chollet, R. *et al*. (2004) The AcrAB–TolC pump is involved in macrolide resistance but not in telithromycin efflux in *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3621–3624
54 Schneiders, T. *et al*. (2003) Role of AcrR and RamA in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2831–2837
55 Martinez-Martinez, L. *et al*. (2002) Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum β-lactamase production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3926–3932
56 Gayet, S. *et al*. (2003) Modification of outer membrane protein profile and evidence suggesting an active drug pump in *Enterobacter aerogenes* clinical strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1555–1559
57 Pradel, E. and Pagès, J-M. (2002) The AcrAB–TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2640–2643
58 Kriengkauykiat, J. *et al*. (2005) Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 565–570
59 Veal, W.L. *et al*. (2002) Overexpression of the MtrC–MtrD–MtrE efflux pump due to an mtrR mutation is required for chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.* 184, 5619–5624
60 Xia, M. *et al*. (2000) Gonorrhea among men who have sex with men: outbreak caused by a single genotype of erythromycin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* with a single-base pair deletion in the mtrR promoter region. *J. Infect. Dis.* 181, 2080–2082
61 Olesky, M. *et al*. (2002) Identification and analysis of amino acid

mutations in porin IB that mediate intermediate-level resistance to penicillin and tetracycline in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2811–2820
62 Nestorovich, E.M. *et al*. (2002) Designed to penetrate: time-resolved interaction of single antibiotic molecules with bacterial pores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9789–9794
63 Vidal, S. *et al*. (2005) β-Lactam screening by specific residues of the OmpF eyelet. *J. Med. Chem.* 48, 1395–1400
64 Zloh, M. *et al*. (2004) Inhibitors of multidrug resistance (MDR) have affinity for MDR substrates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 881–885
65 Poole, K. (2004) Uninhibited antibiotic target discovery via chemical genetics. *Nat. Biotechnol.* 12, 1528–1529
66 Levy, S.B. and Marshall, B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenge and responses. *Nat. Med.* 10 (Suppl.), 122–129
67 Grkovic, S. *et al*. (2002) Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 671–701
68 Andersen, C. *et al*. (2000) Chunnel vision. Export and efflux through bacterial channel-tunnels. *EMBO Rep.* 1, 313–318
69 Andersen, C. *et al*. (2002) Transition to the open state of the TolC periplasmic tunnel entrance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11103–11108
70 Elkins, C.A. and Nikaido, H. (2003) 3D structure of AcrB: the archetypal multidrug efflux transporter of *Escherichia coli* likely captures substrates from periplasm. *Drug Resist. Updat.* 6, 9–13

Elsevier.com – Dynamic New Site Links Scientists to New Research & Thinking

Elsevier.com has had a makeover, inside and out. Designed for scientists' information needs, the new site, launched in January, is powered by the latest technology with customer-focused navigation and an intuitive architecture for an improved user experience and greater productivity.

Elsevier.com's easy-to-use navigational tools and structure connect scientists with vital information – all from one entry point. Users can perform rapid and precise searches with our advanced search functionality, using the FAST technology of Scirus.com, the free science search engine. For example, users can define their searches by any number of criteria to pinpoint information and resources. Search by a specific author or editor, book publication date, subject area – life sciences, health sciences, physical sciences and social sciences – or by product type. Elsevier's portfolio includes more than 1800 Elsevier journals, 2200 new books per year, and a range of innovative electronic products. In addition, tailored content for authors, editors and librarians provides up-to-the-minute news, updates on functionality and new products, e-alerts and services, as well as relevant events.

Elsevier is proud to be a partner with the scientific and medical community. Find out more about who we are in the About section: our mission and values and how we support the STM community worldwide through partnerships with libraries and other publishers, and grant awards from The Elsevier Foundation.

As a world-leading publisher of scientific, technical and health information, Elsevier is dedicated to linking researchers and professionals to the best thinking in their fields. We offer the widest and deepest coverage in a range of media types to enhance cross-pollination of information, breakthroughs in research and discovery, and the sharing and preservation of knowledge. Visit us at Elsevier.com.

Elsevier. Building Insights. Breaking Boundaries.

CHAPITRE III : DISCUSSION

Pourquoi *E. aerogenes* ?

E. aerogenes est l'une des bactéries les plus souvent rencontrées lors les infections respiratoires et urinaires d'origine nosocomiale. En effet, sa fréquence d'isolement en milieu hospitalier, en particulier celle d'un clone prévalent, est en augmentation constante depuis les années 90. De manière inquiétante, un nombre croissant d'isolats cliniques présentent un phénotype de résistance multiple couvrant la plupart des antibiotiques utilisés à l'hôpital. Etant capable d'acquérir et d'exprimer simultanément divers déterminants de résistance, *E. aerogenes* s'est parfaitement adaptée au milieu hospitalier. Aujourd'hui, seuls l'imipénème et la gentamycine sont encore efficaces. Cependant, des études récentes rapportent l'émergence d'isolats résistants à l'imipénème après utilisation de cet antibiotique en mono-thérapie.

En une dizaine d'années, l'évolution du profil de résistance d'*E. aerogenes* est remarquable. Au début des années 90, les isolats présentaient un phénotype de résistance aux pénicillines et aux céphalosporines de 1ère et de 2ème générations. A l'heure actuelle, des clones résistants à l'ensemble des β–lactamines y compris à l'imipénème, aux aminoglycosides et aux fluoroquinolones sont rapidement sélectionnés.

Comment peut-on expliquer une telle adaptation ?

- Une étape importante dans l'épidémiologie d'*E. aerogenes* est l'acquisition du plasmide codant la BLSE de type TEM-24. TEM-24 lui procure un double avantage : elle confère la résistance vis-à-vis des β–lactamines de 3ème génération et est insensible aux inhibiteurs des β–lactamases. L'association entre *E. aerogenes* et TEM-24 est stable et permet à ce « couple » de se maintenir dans les hôpitaux. Cela se traduit d'ailleurs par une expansion clonale dans toute l'Europe. Il serait intéressant d'obtenir la séquence de ce plasmide pour deux raisons. Premièrement, *E. aerogenes* est devenue un réservoir important de BLSE et plusieurs études rapportent la présence de TEM-24 à d'autres espèces bactériennes. Le séquençage du plasmide pourrait donc fournir des informations sur les gènes de transfert. Deuxièmement, ce grand plasmide confère une résistance à d'autres antibiotiques, tels que les sulfamides, le chloramphénicol et les aminoglycosides, par des mécanismes encore inconnus. Chez d'autres pathogènes, la dissémination des marqueurs de résistance se fait par l'intermédiaire de plasmides ou de transposons conjugatifs et les gènes sont rassemblés sous forme d'îlots génomiques intégrés sur leur chromosome. Les îlots SGI1 chez *Salmonella enterica* et STX chez *Vibrio cholerae* en sont des exemples. Tous les deux portent notamment le gène *floR* qui code un transporteur d'efflux de la famille MF spécifique des phénicolés

(florfénicol, chloramphénicol et thiamphénicol) ainsi que des régulateurs qui pourraient jouer un rôle dans le contrôle de la résistance.

- Parallèlement, l'efflux actif d'antibiotiques joue un rôle important dans l'établissement d'un phénotype multirésistant dans plusieurs isolats cliniques (Malléa *et al.*, 1998 ; Pradel & Pagès, 2002 ; Gayet *et al.*, 2003).

Au laboratoire EA2197, l'ensemble des travaux portant sur l'identification des pompes d'efflux et l'étude des mécanismes qui gouvernent leur expression nous permet de mieux comprendre la multirésistance chez *E. aerogenes*. En l'absence de projet de séquençage du génome d'*E. aerogenes*, nous avons complémenté des mutants *acrAB* ou *tolC* d'*E. coli* avec une banque d'ADN génomique pour identifier les différentes pompes d'efflux dans cet organisme. Dans un premier temps, nous avons identifié les loci *acrAB* et *tolC*. La surexpression de la pompe AcrAB-TolC participe de façon significative à la multirésistance dans un isolat clinique (Pradel & Pagès, 2002). L'inactivation des gènes *acrA* ou *tolC* dans cet isolat conduit à une diminution drastique (de 2 à 32 fois) de la résistance aux fluoroquinolones, au chloramphénicol et à la tétracycline. Dans un second temps, nous avons étudié le locus *eefABC*. Nous avons montré que la surexpression de la pompe EefABC à partir d'un plasmide multi-copie restaurait le phénotype multirésistant d'un mutant *acrA* d'*E. aerogenes*. Cependant, l'opéron *eefABC* est cryptique chez *E. aerogenes* sous l'action répressive de la protéine H-NS. Le génome de toutes les bactéries contient de multiples gènes codant des transporteurs d'efflux. L'analyse exhaustive récente du génome d'*E. coli* a montré la présence de 37 transporteurs d'efflux putatifs (Nishino & Yamaguchi, 2001). L'expression individuelle de chacun de ces transporteurs dans une souche sensible laisse apparaître des fonctions redondantes. De même chez *E. aerogenes*, AcrB et EefB présentent 56 % d'identité de séquence et sont capables d'expulser les mêmes substrats antibiotiques avec une efficacité quasiment équivalente. Le phénotype de souches d'*E. coli* délétées de gènes codant des transporteurs d'antibiotiques putatifs a été analysé. Seule la délétion de l'opéron *acrAB* augmente la sensibilité des mutants, indiquant que la plupart des gènes d'efflux ne sont pas exprimés dans des conditions de culture standard (Sulavik *et al.*, 2001). Les conditions de culture en laboratoire sont très éloignées des conditions de vie dans l'hôte. Des études détaillées sur la régulation de ces gènes silencieux sont donc nécessaires afin de mieux comprendre leur rôle physiologique *in vivo*.

Chez *E. aerogenes*, l'opéron *acrAB* est transcrit de façon constitutive. Son expression est régulée négativement par le répresseur local AcrR (Pradel & Pagès, 2002), et positivement par des activateurs globaux de la famille AraC : MarA et RamA (Chollet *et al.*, 2002 ; Chollet *et al.*, 2004). La surexpression de MarA ou de RamA ne permet pas de lever l'action répressive de H-NS sur *eefABC*. Ceci suggère que l'opéron *eefABC* n'est pas une cible des régulateurs MarA et RamA. Existe-t-il un activateur de l'opéron *eefABC* ? Quelles sont les conditions et quels sont les inducteurs capables de lever l'inhibition exercée par H-NS ?

La littérature est riche d'études sur le développement de la multirésistance *in vitro* et *in vivo*. D'une part, la résistance par efflux peut être induite de façon transitoire par des composés naturels, tels que le salicylate et ses dérivés (l'aspirine). Chez les entérobactéries, le répresseur MarR complexé au salicylate est inactif. La surproduction transitoire de MarA active l'expression des gènes *acrAB* et *tolC*. Des signaux physiologiques, tels que le stress oxydatif ou la présence de sels biliaires, pourraient favoriser la sélection de mutants multirésistants. Malgré plusieurs essais (cultures en présence de salicylate, de sels biliaires, de détergents, de solvants, de métaux lourds, de colorants, d'ammonium quaternaire, d'antibiotiques…), nous n'avons pas identifié les conditions permettant l'induction transitoire de *eefABC*. D'autre part, la pression antibiotique sélectionne des mutations dans les gènes de régulation. A la différence de l'induction qui est transitoire, la mutation est un avantage sélectif important car elle entraîne une dé-répression ou une activation permanente des systèmes de contrôle. Au cours de ce travail, nous avons montré que le chloramphénicol était capable de sélectionner des variants multirésistants aux antibiotiques à partir de souches d'*E. aerogenes* sensibles. La souche CM-64, variant de *E. aerogenes* 13048, présente une surproduction de la pompe d'efflux AcrAB-TolC associée à une diminution de la sensibilité aux fluoroquinolones, à la tétracycline et au chloramphénicol. Dans ce variant, le niveau d'expression de la porine majoritaire est stable et la sensibilité aux β–lactamines n'est pas affectée. Les souches CM-1 à -4, variants de *E. aerogenes* 15038, présentent une surproduction de la pompe d'efflux EefABC associée à une augmentation de la résistance à l'érythromycine, à la tétracycline, à la ticarcilline et au chloramphénicol. L'analyse des profils protéiques membranaires en western-blot ne montre aucune variation du niveau d'expression des porines dans les mutants CM-1 à -4 en comparaison à la souche parentale. Ces deux études montrent que le développement de la multirésistance dans ces souches est indépendant des voies de régulation connues MarA, RamA, SoxS ou Rob. De plus, la fusion P*eef*::*lacZ* ne s'exprime pas dans le variant CM-64. Ceci indique que les mutations à l'origine des

phénotypes multirésistants dans les variants CM-1 à -4 et CM-64 sont différentes et indépendantes.

Le chloramphénicol est un agent très efficace pour sélectionner des mutants multirésistants par efflux. Dans le monde occidental, le thiamphénicol (dérivé soufré du chloramphénicol) est le seul antibiotique phénicolé utilisé en clinique, mais le chloramphénicol est toujours prescrit en Asie. Le chloramphénicol a longtemps été considéré comme traitement de choix pour traiter les infections chez l'animal. Depuis 1994, son utilisation a été interdite dans l'Union Européenne et remplacée par le florfénicol (dérivé fluoré du chloramphénicol). L'impact de cette classe d'antibiotiques sur le développement de la multirésistance par efflux *in vivo* est encore inconnu.

L'impact des pompes d'efflux et/ou des systèmes de régulation sur le développement de la multirésistance en clinique est peu documentée. Le niveau de résistance aux antibiotiques de souches de laboratoire d'*E. aerogenes* exprimant une pompe d'efflux reste très inférieur à celui d'isolats cliniques. Cependant, l'activation du mécanisme d'efflux pourrait jouer un rôle déterminant dans l'adaptation des isolats face à la pression de sélection des antibiotiques. Par exemple, lors d'un traitement aux fluoroquinolones, la diminution de la concentration intracellulaire en antibiotique due à l'efflux permettrait aux bactéries de disposer de plus de temps pour synthétiser une cible mutée. Plusieurs études menées sur des isolats d'*E. coli* , de *K. pneumoniae* et d'*E. cloacae* vont dans ce sens. Des mutations dans les gènes de régulation *acrR*, *marR*, *ramA* ou *soxS*, responsables d'une surproduction de la pompe AcrAB, ainsi que des mutations dans la région QRDR des gènes *gyrA* et *parC* ont été retrouvées dans des isolats résistants aux fluoroquinolones (Oethinger *et al.*, 1998 ; Mazzariol *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2001 ; Schneiders *et al.*, 2003). Ainsi, la surexpression des pompes d'efflux représenterait une première étape dans le développement d'isolats cliniques multirésistants aux antibiotiques.

Chez *E. aerogenes*, au moins quatre systèmes de régulation ciblent la pompe d'efflux AcrAB-TolC. On peut supposer que cette redondance permet à *E. aerogenes* de répondre à différents types de stress. Ceci rend compte de sa grande adaptabilité à un environnement hostile tel que l'hôpital.

L'ensemble des résultats obtenus au laboratoire EA2197 témoigne de la complexité de la régulation de la multirésistance chez *E. aerogenes* (figure 15).

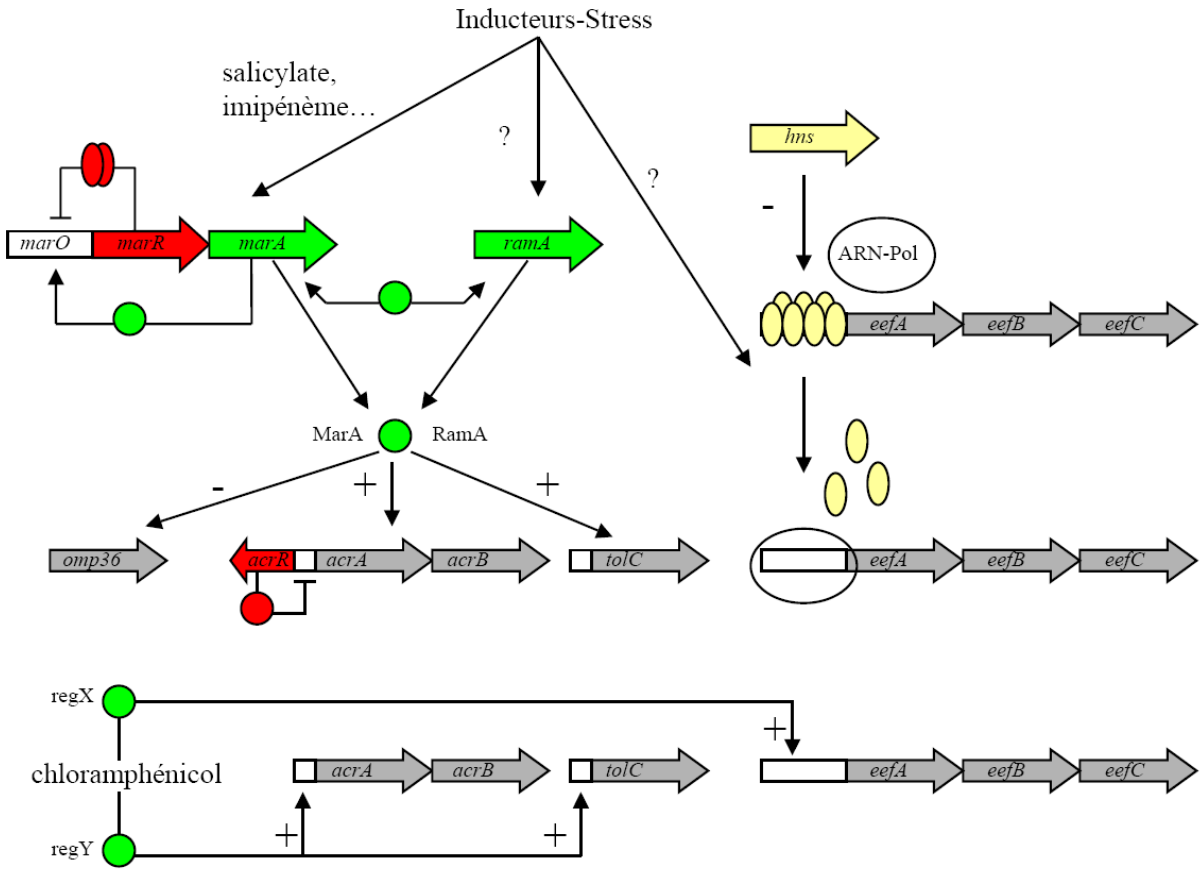


Figure 15 : Voies de régulation de la multirésistance chez *E. aerogenes*

Ce schéma a été complété à partir des études effectuées par Renaud Chollet et Charléric Bornet au cours de leurs thèses de doctorat. Pour plus de clarté, les effets du chloramphénicol sur l'expression des pompes d'efflux ont été dissociés. ARN-Pol : ARN-Polymérase.

Maintenant, il serait intéressant d'identifier les régulateurs « regX » et « regY » et d'étudier leurs rôles spécifiques dans le contrôle de la multirésistance chez *E. aerogenes*.

Pourquoi des pompes d'efflux ?

La résistance bactérienne se réfère souvent à des mécanismes « classiques », tels que l'inactivation enzymatique de l'antibiotique ou la mutation de la cible. Dans plusieurs cas, l'origine des gènes de résistance a été attribuée aux organismes producteurs d'antibiotiques. Par exemple, la production des β–lactamines est très répandue parmi les champignons et les bactéries. On comprend donc que les bactéries, notamment les bactéries telluriques, aient développé des mécanismes de résistance pour se protéger des β–lactamines présentes dans leur environnement et survivre face aux organismes producteurs.

Pendant plusieurs années, l'industrie pharmaceutique a développé des molécules antibiotiques de nature synthétique, auxquelles les bactéries n'avaient jamais été exposées au cours de leur évolution. Les fluoroquinolones sont un exemple de cette approche. L'efflux de ces molécules, et pire, l'activation de pompes d'efflux à large spectre par ces molécules étaient complètement inattendus. Rétrospectivement, cela nous semble peu surprenant. En effet, les mutations de la cible sont des évènements rares et la bactérie n'a pas d'autre possibilité que d'activer l'efflux pour se protéger contre cette classe d'antibiotiques. En outre, l'efflux est un mécanisme rapidement sélectionné et efficace.

Les pompes d'efflux, présentes dans les cellules de tous les règnes vivants, posent plusieurs questions fascinantes. Quelles sont les bases moléculaires de leur poly-spécificité ? Pourquoi sont-elles poly-spécifiques ? Pourquoi les cellules possèdent-t-elles plusieurs pompes d'efflux ? Quelles sont les fonctions naturelles des pompes d'efflux ?

Ces cinq dernières années ont été marquées par d'énormes progrès en matière de séquençage de génomes entiers d'organismes procaryotes et eucaryotes. A ce jour, près de 400 génomes bactériens sont disponibles ou en cours de séquençage (http://wit.integratedgenomics.com/ERGO_supplement/genomes_bacteria.html). Ainsi, l'analyse des séquences génomiques disponibles appartenant à diverses bactéries indique que 6 à 18 % des transporteurs sont des transporteurs d'antibiotiques connus ou putatifs (Paulsen *et al.*, 1998). Chez *P. aeruginosa* et *E. coli*, on dénombre une trentaine de pompes d'efflux (Stover *et al.*, 2000 ; Nishino & Yamaguchi, 2001).

Une étude comparative intéressante entre les génomes de bactéries pathogènes et non-pathogènes montre qu'elles possèdent toutes, sur leur chromosome, un nombre similaire de transporteurs d'antibiotiques par rapport au nombre total de transporteurs (Saier *et al.*, 1998). A l'inverse des idées reçues, cette observation suggère que de tels systèmes n'ont pas émergé récemment chez les pathogènes humains exposés à hautes doses d'antibiotiques, mais plutôt

qu'ils sont anciens et jouent des rôles physiologiques importants dans l'extrusion de substances toxiques naturelles (métabolites, métaux lourds présents dans l'environnement…). Leur rôle dans l'efflux d'antibiotiques observé en clinique serait donc le résultat de l'adaptation bactérienne à l'environnement hospitalier.

La présence respective de 7 et 12 cadres ouverts de lecture codant des pompes d'efflux de la famille RND sur les chromosomes de *E. coli* et de *P. aeruginosa* indique que la fonction naturelle de ces pompes n'est pas l'export d'antibiotiques. L'expression individuelle de certaines pompes d'efflux dans une même cellule a des effets redondants. Les transporteurs d'antibiotiques sont homologues en séquences et transportent des antibiotiques de même nature et la même efficacité. Pourtant, la majorité des gènes codant les pompes d'efflux forment un opéron avec un gène codant un régulateur local spécifique (*acrRAB* chez *E. coli* ; *mexRAB-oprM*, *mexTEF-oprN*, *mexZEF*… chez *P. aeruginosa*). Une telle organisation suggère que l'expression de chaque opéron d'efflux est régulée de façon indépendante : chaque pompe d'efflux répond à un stimulus caractéristique par une fonction spécifique.

Les fonctions naturelles des pompes d'efflux est un sujet de débat. L'état actuel des connaissances favorise l'idée selon laquelle les pompes d'efflux représentent un mécanisme de défense contre les agents antibactériens exogènes. Chez *E. coli* et *S. enterica*, l'induction du système AcrAB en présence de sels biliaires et le rôle démontré de AcrAB dans l'efflux de sels biliaires (Thanassi *et al.*, 1997 ; Rosenberg *et al.*, 2003 ; Prouty *et al.*, 2004) s'accordent sur un rôle de protection contre ces agents présents dans le tractus intestinal. Les pompes CmeABC chez *Campylobacter jejuni* et AcrAB-TolC chez *V. cholerae* confèrent également une résistance aux sels biliaires et deviennent ainsi essentielles pour la colonisation de l'hôte (Bina & Mekalanos, 2001 ; Lin et *al.*, 2003).

Plusieurs équipes recherchent des substrats d'efflux endogènes. Nous avons évoqué le fait que certains produits du métabolisme puissent être des substrats pour les pompes d'efflux. La surproduction de la pompe AcrAB dans des souches d'*E. coli* déficientes pour des voies centrales de biosynthèse, résulte probablement de l'accumulation intracellulaire de produits intermédiaires toxiques, et supporte cette hypothèse (Helling *et al.*, 2002). De même, une étude récente a montré que des mutations dans un gène codant une oxydoréductase entraînaient la surexpression de *mexEF-oprN* chez *P. aeruginosa* (Sobel *et al.*, 2005).

Nous avons largement commenté les avancées récentes concernant les mécanismes de reconnaissance et de translocation des substrats en prenant l'exemple du transporteur AcrB d'*E. coli*. Dans tous les cas, les ligands pénètrent dans une cavité, dans laquelle ils établissent des liaisons de van der Waal avec les résidus hydrophobes à proximité. De plus, cette cavité

est suffisamment large pour permettre aux différents ligands d'adopter différentes orientations et d'engager des liaisons avec différentes combinaisons d'acides aminés. La poly-spécificité des transporteurs d'antibiotiques semble parfaitement adaptée à leur rôle protecteur.

Les questions concernant l'évolution et le rôle biologique des pompes d'efflux restent donc ouvertes. Pour y répondre, il est primordial d'étudier la régulation des gènes d'efflux en détails et d'identifier les composés qui influencent directement leur expression.

Les stratégies pour le futur

Aujourd'hui, les mécanismes d'efflux doivent être pris en compte dans le développement des nouveaux antibiotiques mais aussi dans la prescription médicale. L'impact de la résistance par efflux est encore mal apprécié en clinique. Les collections d'isolats cliniques ne sont pas exploitables car il n'existe aucun test diagnostique rapide et efficace. La caractérisation phénotypique est longue et compliquée puisque les isolats multirésistants associent souvent plusieurs mécanismes de résistance. L'utilisation de méthodes génétiques (recherche de mutations dans les gènes de régulation et/ou évaluation du niveau de transcription des gènes d'efflux par Northern-blot) n'est pas envisageable compte tenu du trop grand nombre de cibles. Les tests de sensibilité en présence et en l'absence inhibiteurs des pompes d'efflux (EPIs) offrent une alternative intéressante. Ces molécules sont déjà utilisées dans les laboratoires de recherche pour caractériser l'efflux et pourraient être également utilisées en routine dans les laboratoires de microbiologie clinique. La détermination des concentrations minimales inhibitrices est un exercice fastidieux. De plus, les résultats sont variables selon l'antibiotique, l'inhibiteur et l'espèce bactérienne étudiés. Cela nécessite donc la mise en place d'un protocole automatisé et harmonisé. Ce type de test pourrait être réalisé en remplaçant l'antibiotique par un colorant. En effet, certains colorants sont des substrats des pompes d'efflux. Il serait intéressant de pouvoir mesurer des variations de « l'indice de coloration » des souches en présence et en absence d'EPI et de corréler ces variations à la surproduction d'au moins une pompe d'efflux.

Nous avons discuté de l'utilisation des EPIs comme adjuvants thérapeutiques capables de restaurer ou d'augmenter l'efficacité des antibiotiques sur des souches surproduisant une ou plusieurs pompes d'efflux. Il est nécessaire de poursuivre les études dans cet axe de recherche afin de caractériser le mécanisme d'inhibition des EPIs et de mesurer leur constante d'affinité sur des transporteurs purifiés.

La technologie des ARN antisens est une alternative intéressante pour lutter contre les bactéries multirésistantes. Une étude a montré que la transformation d'un mutant *mar* avec des oligonucléotides antisens ciblant l'opéron *marRAB* diminuait le niveau de résistance aux antibiotiques et rétablissait partiellement l'effet bactéricide de la norfloxacine (White *et al.*, 1997). La pénétration des oligonucléotides antisens dans les bactéries est un problème majeur qui retarde la recherche et les applications dans ce champ.

En ce qui concerne le développement de nouvelles molécules antibiotiques, celles-ci devront être des substrats de faible affinité pour les pompes d'efflux et ne devront plus favoriser la surexpression des gènes d'efflux. Les structures 3D de transporteurs d'antibiotiques et de protéines de régulation pourront être utilisées pour améliorer les relations structure-activité des nouveaux antibiotiques et satisfaire ces deux critères.

REFERENCES

2000-2003. Rapport d'enquête-BMR SUD-EST. C-CLIN SUD-EST.

2000-2003. Résultats de la surveillance des bactéries multi-résistantes. C-CLIN OUEST.

2000-2003. Surveillance des bactéries multirésistantes-Rapport des résultats. C-CLIN PARIS-NORD.

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

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

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

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

Akama, H., M. Kanemaki, M. Yoshimura, T. Tsukihara, T. Kashiwagi, H. Yoneyama, S. Narita, A. Nakagawa, and T. Nakae. 2004b. Crystal structure of the drug discharge outer membrane protein, OprM, of *Pseudomonas aeruginosa*: dual modes of membrane anchoring and occluded cavity end. J. Biol. Chem. **279:**52816-52819.

Albertini, M. T., C. Benoit, L. Berardi, Y. Berrouane, A. Boisivon, P. Cahen, C. Cattoen, Y. Costa, P. Darchis, E. Deliere, D. Demontrond, F. Eb, F. Golliot, G. Grise, A. Harel, J. L. Koeck, M. P. Lepennec, C. Malbrunot, M. Marcollin, S. Maugat, M. Nouvellon, B. Pangon, S. Ricouart, M. Roussel-Delvallez, A. Vachee, A. Carbonne, L. Marty, and V.

Jarlier. 2002. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBLE) in Northern France: a five-year multicentre incidence study. J. Hosp. Infect. **52:**107-113.

Alekshun, M. N., and S. B. Levy. 1999. Alteration of the repressor activity of MarR, the negative regulator of the *Escherichia coli marRAB* locus, by multiple chemicals *in vitro*. J. Bacteriol. **181:**4669-46672.

Andersen, C., C. Hughes, and V. Koronakis. 2002a. Electrophysiological behavior of the TolC channel-tunnel in planar lipid bilayers. J. Membr. Biol. **185:**83-92.

Andersen, C., E. Koronakis, C. Hughes, and V. Koronakis. 2002b. An aspartate ring at the TolC tunnel entrance determines ion selectivity and presents a target for blocking by large cations. Mol. Microbiol. **44:**1131-1139.

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

Andersen, C. 2003. Channel-tunnels: outer membrane components of type I secretion systems and multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. **147:**122-165.

Arpin, C., C. Coze, A. M. Rogues, J. P. Gachie, C. Bebear, and C. Quentin. 1996. Epidemiological study of an outbreak due to multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* in a medical intensive care unit. J. Clin. Microbiol. **34:**2163-2169.

Arpin, C., V. Dubois, L. Coulange, C. André, I. Fischer, P. Noury, F. Grobost, J. P. Brochet, J. Jullin, B. Dutilh, G. Larribet, I. Lagrange, and C. Quentin. 2003. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in community and private health care centers. Antimicrob. Agents Chemother. **47:**3506-3514.

Atlung, T., and H. Ingmer. 1997. H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. Mol. Microbiol. **24:**7-17.

Augustus, A. M., T. Celaya, F. Husain, M. Humbard, and R. Misra. 2004. Antibiotic-sensitive TolC mutants and their suppressors. J. Bacteriol. **186:**1851-1860.

Barbosa, T. M., and S. B. Levy. 2000. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. J. Bacteriol. **182:**3467-3674.

Barnes, A. I., C. Ortiz, M. G. Paraje, L. E. Balanzino, and I. Albesa. 1997. Purification and characterization of a cytotoxin from *Enterobacter cloacae*. Can. J. Microbiol. **43:**729-733.

Bauernfeind, A., E. Rosenthal, E. Eberlein, M. Holley, and S. Schweighart. 1993. Spread of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta-lactamase among hospitalized patients. Infection. **21:**18-22.

Beloin, C., and C. J. Dorman. 2003. An extended role for the nucleoid structuring protein H-NS in the virulence gene regulatory cascade of *Shigella flexneri*. Mol. Microbiol. **47:**825-838.

Benz, R., E. Maier, and I. Gentschev. 1993. TolC of *Escherichia coli* functions as an outer membrane channel. Zentralbl. Bakteriol. **278:**187-196.

Bina, J. E., and J. J. Mekalanos. 2001. *Vibrio cholerae tolC* is required for bile resistance and colonization. Infect. Immun. **69:**4681-4685.

Bolhuis, H., H. W. van Veen, J. R. Brands, M. Putman, B. Poolman, A. J. Driessen, and W. N. Konings. 1996. Energetics and mechanism of drug transport mediated by the lactococcal multidrug transporter LmrP. J. Biol. Chem. **271:**24123-24128.

Bone, R. C. 1993. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. Clin. Microbiol. Rev. **6:**57-68.

Borges-Walmsley, M. I., J. Beauchamp, S. M. Kelly, K. Jumel, D. Candlish, S. E. Harding, N. C. Price, and A. R. Walmsley. 2003. Identification of oligomerization and drug-binding domains of the membrane fusion protein EmrA. J. Biol. Chem. **278:**12903-12912.

Borgstrom, B. 1974. Bile salts-their physiological functions in the gastrointestinal tract. Acta. Med. Scand. **196:**1-10.

Bornet, C., A. Davin-Régli, and C. Bollet. 2000a. *Enterobacter*, p. 1175-1182. *In* J. Freney, F. Renaud, W. Hansen, and C. Bollet. Précis de bactériologie clinique, ESKA ed.

Bornet, C., A. Davin-Régli, C. Bosi, J. M. Pagès, and C. Bollet. 2000b. Imipenem resistance of *Enterobacter aerogenes* mediated by outer membrane permeability. J. Clin. Microbiol. **38:**1048-1052.

Bornet, C., R. Chollet, M. Malléa, J. Chevalier, A. Davin-Régli, J. M. Pagès, and C. Bollet. 2003. Imipenem and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **301:**985-990.

Bosi, C., A. Davin-Régli, C. Bornet, M. Malléa, J. M. Pagès, and C. Bollet. 1999. Most *Enterobacter aerogenes* strains in France belong to a prevalent clone. J. Clin. Microbiol. **37:**2165-2169.

Bradford, P. A. 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin. Microbiol. Rev. **14:**933-995.

Bradford, P. A., C. Urban, N. Mariano, S. J. Projan, J. J. Rahal, and K. Bush. 1997. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. Antimicrob. Agents Chemother. **41:**563-569.

Brown, M. H., I. T. Paulsen, and R. A. Skurray. 1999. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. Mol. Microbiol. **31:**394-395.

Burkhard, P., J. Stetefeld, and S. V. Strelkov. 2001. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. Trends Cell. Biol. **11:**82-88.

Calladine, C. R., A. Sharff, and B. Luisi. 2001. How to untwist an alpha-helix: structural principles of an alpha-helical barrel. J. Mol. Biol. **305:**603-618.

Canton, R., A. Oliver, T. M. Coque, C. Varela Mdel, J. C. Perez-Diaz, and F. Baquero. 2002. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. J. Clin. Microbiol. **40:**1237-1243.

Charrel, R. N., J. M. Pagès, P. De Micco, and M. Malléa. 1996. Prevalence of outer membrane porin alteration in beta-lactam-antibiotic-resistant *Enterobacter aerogenes*. Antimicrob. Agents Chemother. **40:**2854-2858.

Chevalier, J., S. Atifi, A. Eyraud, A. Mahamoud, J. Barbe, and J. M. Pagès. 2001. New pyridoquinoline derivatives as potential inhibitors of the fluoroquinolone efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains. J. Med. Chem. **44:**4023-4026.

Chevalier, J., J. Bredin, A. Mahamoud, M. Malléa, J. Barbe, and J. M. Pagès. 2004. Inhibitors of antibiotic efflux in resistant *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* strains. Antimicrob. Agents Chemother. **48:**1043-1046.

Chollet, R., C. Bollet, J. Chevalier, M. Malléa, J. M. Pagès, and A. Davin-Régli. 2002. *mar* operon involved in multidrug resistance of *Enterobacter aerogenes*. Antimicrob. Agents Chemother. **46:**1093-1097.

Chollet, R., J. Chevalier, C. Bollet, J. M. Pagès, and A. Davin-Régli. 2004. RamA is an alternate activator of the multidrug resistance cascade in *Enterobacter aerogenes*. Antimicrob. Agents Chemother. **48:**2518-2523.

Chopra, I., and M. Roberts. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **65:**232-260.

Chow, J. W., and D. M. Shlaes. 1991. Imipenem resistance associated with the loss of a 40 kDa outer membrane protein in *Enterobacter aerogenes*. J. Antimicrob. Chemother. **28:**499-504.

Chuanchuen, R., C. T. Narasaki, and H. P. Schweizer. 2002. The MexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan. J. Bacteriol. **184:**5036-5044.

Chung, Y. J., and M. H. Saier, Jr. 2001. SMR-type multidrug resistance pumps. Curr. Opin. Drug Discov. Devel. **4:**237-245.

Cohen, S. P., L. M. McMurry, D. C. Hooper, J. S. Wolfson, and S. B. Levy. 1989. Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. Antimicrob. Agents Chemother. **33:**1318-1325.

Cooper, A. 1999. Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. Curr. Opin. Chem. Biol. **3:**557-563.

Davies, J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. Science. **264:**375-382.

Davies, J. K., and P. Reeves. 1975. Genetics of resistance to colicins in *Escherichia coli* K-12: cross-resistance among colicins of group A. J. Bacteriol. **123:**102-117.

Davin-Régli, A., D. Monnet, P. Saux, C. Bosi, R. Charrel, A. Barthelemy, and C. Bollet. 1996. Molecular epidemiology of *Enterobacter aerogenes* acquisition: one-year prospective study in two intensive care units. J. Clin. Microbiol. **34:**1474-1480.

De Champs, C., M. P. Sauvant, C. Chanal, D. Sirot, N. Gazuy, R. Malhuret, J. C. Baguet, and J. Sirot. 1989. Prospective survey of colonization and infection caused by expanded-spectrum-beta-lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* in an intensive care unit. J. Clin. Microbiol. **27:**2887-2890.

De Champs, C., D. Rouby, D. Guelon, J. Sirot, D. Sirot, D. Beytout, and J. M. Gourgand. 1991. A case-control study of an outbreak of infections caused by *Klebsiella pneumoniae* strains producing CTX-1 (TEM-3) beta-lactamase. J. Hosp. Infect. **18:**5-13.

Dé, E., A. Basle, M. Jaquinod, N. Saint, M. Malléa, G. Molle, and J. M. Pagès. 2001. A new mechanism of antibiotic resistance in *Enterobacteriaceae* induced by a structural modification of the major porin. Mol. Microbiol. **41:**189-198.

De Gheldre, Y., N. Maes, F. Rost, R. De Ryck, P. Clevenbergh, J. L. Vincent, and M. J. Struelens. 1997. Molecular epidemiology of an outbreak of multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* infections and *in vivo* emergence of imipenem resistance. J. Clin. Microbiol. **35:**152-160.

De Gheldre, Y., M. J. Struelens, Y. Glupczynski, P. De Mol, N. Maes, C. Nonhoff, H. Chetoui, C. Sion, O. Ronveaux, and M. Vaneechoutte. 2001. National epidemiologic surveys of *Enterobacter aerogenes* in Belgian hospitals from 1996 to 1998. J. Clin. Microbiol. **39:**889-896.

Deighan, P., A. Free, and C. J. Dorman. 2000. A role for the *Escherichia coli* H-NS-like protein StpA in OmpF porin expression through modulation of *micF* RNA stability. Mol. Microbiol. **38:**126-139.

Dinh, T., I. T. Paulsen, and M. H. Saier, Jr. 1994. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. J. Bacteriol. **176:**3825-3831.

Domenech-Sanchez, A., S. Hernandez-Alles, L. Martinez-Martinez, V. J. Benedi, and S. Alberti. 1999. Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in beta-lactam antibiotic resistance. J. Bacteriol. **181:**2726-2732.

Dorman, C. J. 2004. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. Nat. Rev. Microbiol. **2:**391-400.

Drancourt, M. 2000. *Klebsiella*, p. 1171-1174. *In* J. Freney, F. Renaud, W. Hansen, and C. Bollet. Précis de bactériologie clinique, ESKA ed.

Dumarche, P., C. De Champs, D. Sirot, C. Chanal, R. Bonnet, and J. Sirot. 2002. TEM derivative-producing *Enterobacter aerogenes* strains: dissemination of a prevalent clone. Antimicrob. Agents Chemother. **46:**1128-1131.

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

Ehrhardt, A. F., and C. C. Sanders. 1993. Beta-Lactam resistance amongst *Enterobacter* species. J. Antimicrob. Chemother. **32 Suppl B:**1-11.

Elkins, C. A., and H. Nikaido. 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.

Elkins, C. A., and H. Nikaido. 2003. Chimeric analysis of AcrA function reveals the importance of its C-terminal domain in its interaction with the AcrB multidrug efflux pump. J. Bacteriol. **185:**5349-5356.

Epp, S. F., T. Kohler, P. Plésiat, M. Michea-Hamzehpour, J. Frey, and J. C. Pechère. 2001. C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. Antimicrob. Agents Chemother. **45:**1780-1787.

Eswaran, J., C. Hughes, and V. Koronakis. 2003. Locking TolC entrance helices to prevent protein translocation by the bacterial type I export apparatus. J. Mol. Biol. **327:**309-315.

Farmer, J. J., 3rd, B. R. Davis, F. W. Hickman-Brenner, A. McWhorter, G. P. Huntley-Carter, M. A. Asbury, C. Riddle, H. G. Wathen-Grady, C. Elias, G. R. Fanning, and et al. 1985. Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol. **21:**46-76.

Federici, L., D. Du, F. Walas, H. Matsumura, J. Fernandez-Recio, K. S. McKeegan, M. I. Borges-Walmsley, B. F. Luisi, and A. R. Walmsley. 2005. The crystal structure of the

outer membrane protein VceC from the bacterial pathogen *Vibrio cholerae* at 1.8 A resolution. J. Biol. Chem. **280:**15307-15314.

Fernandez-Recio, J., F. Walas, L. Federici, J. Venkatesh Pratap, V. N. Bavro, R. N. Miguel, K. Mizuguchi, and B. Luisi. 2004. A model of a transmembrane drug-efflux pump from Gram-negative bacteria. FEBS Lett. **578:**5-9.

Fralick, J. A., and L. L. Burns-Keliher. 1994. Additive effect of *tolC* and *rfa* mutations on the hydrophobic barrier of the outer membrane of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **176:**6404-6406.

Fralick, J. A. 1996. Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **178:**5803-5805.

Freney, J. 2000. *Enterobacteriacea*e - Généralités, p. 1107-1113. *In* J. Freney, F. Renaud, W. Hansen, and C. Bollet. Précis de bactériologie clinique, ESKA ed.

Fujihira, E., N. Tamura, and A. Yamaguchi. 2002. Membrane topology of a multidrug efflux transporter, AcrB, in *Escherichia coli*. J. Biochem. (Tokyo) **131:**145-151.

Galdbart, J. O., F. Lemann, D. Ainouz, P. Feron, N. Lambert-Zechovsky, and C. Branger. 2000. TEM-24 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter aerogenes*: long-term clonal dissemination in French hospitals. Clin. Microbiol. Infect. **6:**316-323.

Gallo, S., J. Chevalier, A. Mahamoud, A. Eyraud, J. M. Pagès, and J. Barbe. 2003. 4-alkoxy and 4-thioalkoxyquinoline derivatives as chemosensitizers for the chloramphenicol-resistant clinical *Enterobacter aerogenes* 27 strain. Int. J. Antimicrob. Agents **22:**270-273.

Gaston, M. A. 1988. *Enterobacter*: an emerging nosocomial pathogen. J. Hosp. Infect. **11:**197-208.

Gayet, S., R. Chollet, G. Molle, J. M. Pagès, and J. Chevalier. 2003. Modification of outer membrane protein profile and evidence suggesting an active drug pump in *Enterobacter aerogenes* clinical strains. Antimicrob. Agents Chemother. **47:**1555-1559.

German, G. J., and R. Misra. 2001. The TolC protein of *Escherichia coli* serves as a cell-surface receptor for the newly characterized TLS bacteriophage. J. Mol. Biol. **308:**579-585.

Goossens, H., M. Ferech, R. Vander Stichele, and M. Elseviers. 2005. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. Lancet. **365:**579-587.

Gotoh, N., H. Tsujimoto, A. Nomura, K. Okamoto, M. Tsuda, and T. Nishino. 1998. Functional replacement of OprJ by OprM in the MexCD-OprJ multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. **165:**21-27.

Gotoh, N., T. Kusumi, H. Tsujimoto, T. Wada, and T. Nishino. 1999. Topological analysis of an RND family transporter, MexD of *Pseudomonas aeruginosa*. FEBS Lett. **458:**32-36.

Griffith, J. K., M. E. Baker, D. A. Rouch, M. G. Page, R. A. Skurray, I. T. Paulsen, K. F. Chater, S. A. Baldwin, and P. J. Henderson. 1992. Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. Curr. Opin. Cell. Biol. **4:**684-695.

Grinius, L., G. Dreguniene, E. B. Goldberg, C. H. Liao, and S. J. Projan. 1992. A staphylococcal multidrug resistance gene product is a member of a new protein family. Plasmid. **27:**119-129.

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

Guan, L., M. Ehrmann, H. Yoneyama, and T. Nakae. 1999. Membrane topology of the xenobiotic-exporting subunit, MexB, of the MexA,B-OprM extrusion pump in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. **274:**10517-10522.

Gutmann, L., R. Williamson, N. Moreau, M. D. Kitzis, E. Collatz, J. F. Acar, and F. W. Goldstein. 1985. Cross-resistance to nalidixic acid, trimethoprim, and chloramphenicol associated with alterations in outer membrane proteins of *Klebsiella*, *Enterobacter*, and *Serratia*. J. Infect. Dis. **151:**501-507.

Hakenbeck, R., and J. Coyette. 1998. Resistant penicillin-binding proteins. Cell. Mol. Life Sci. **54:**332-340.

Hancock, R. E., and D. P. Speert. 2000. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. Drug Resist. Updat. **3:**247-255.

Hancock, R. E., and F. S. Brinkman. 2002. Function of *pseudomonas* porins in uptake and efflux. Annu. Rev. Microbiol. **56:**17-38.

Hasdemir, U. O., J. Chevalier, P. Nordmann, and J. M. Pagès. 2004. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. J. Clin. Microbiol. **42:**2701-2706.

Hejazi, A., and F. R. Falkiner. 1997. *Serratia marcescens*. J. Med. Microbiol. **46:**903-912.

Helling, R. B., B. K. Janes, H. Kimball, T. Tran, M. Bundesmann, P. Check, D. Phelan, and C. Miller. 2002. Toxic waste disposal in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **184:**3699-3703.

Hernandez-Alles, S., S. Alberti, D. Alvarez, A. Domenech-Sanchez, L. Martinez-Martinez, J. Gil, J. M. Tomas, and V. J. Benedi. 1999. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Microbiology. **145 (Pt. 3):**673-679.

Hernandez, H., and C. V. Robinson. 2001. Dynamic protein complexes: insights from mass spectrometry. J. Biol. Chem. **276:**46685-46688.

Heyde, M., and R. Portalier. 1987. Regulation of major outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K 12 by pH. Mol. Gen. Genet. **208:**511-517.

Higgins, C. F. 2001. ABC transporters: physiology, structure and mechanism-an overview. Res. Microbiol. **152:**205-210.

Higgins, M. K., E. Bokma, E. Koronakis, C. Hughes, and V. Koronakis. 2004a. Structure of the periplasmic component of a bacterial drug efflux pump. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **101:**9994-9999.

Higgins, M. K., J. Eswaran, P. Edwards, G. F. Schertler, C. Hughes, and V. Koronakis. 2004b. Structure of the ligand-blocked periplasmic entrance of the bacterial multidrug efflux protein TolC. J. Mol. Biol. **342:**697-702.

Hommais, F., E. Krin, C. Laurent-Winter, O. Soutourina, A. Malpertuy, J. P. Le Caer, A. Danchin, and P. Bertin. 2001. Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. Mol. Microbiol. **40:**20-36.

Hooper, D. C. 2000. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. Clin. Infect. Dis. **31 Suppl. 2:**S24-28.

Husain, F., M. Humbard, and R. Misra. 2004. Interaction between the TolC and AcrA proteins of a multidrug efflux system of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **186:**8533-8536.

Hwang, J., X. Zhong, and P. C. Tai. 1997. Interactions of dedicated export membrane proteins of the colicin V secretion system: CvaA, a member of the membrane fusion protein family, interacts with CvaB and TolC. J. Bacteriol. **179:**6264-6270.

Jacoby, G. A., and A. A. Medeiros. 1991. More extended-spectrum beta-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. **35:**1697-1704.

Jacoby, G. A. 1996. Antimicrobial-resistant pathogens in the 1990s. Annu. Rev. Med. **47:**169-179.

Johnson, J. M., and G. M. Church. 1999. Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. J. Mol. Biol. **287:**695-715.

Karlowsky, J. A., M. E. Jones, C. Thornsberry, I. R. Friedland, and D. F. Sahm. 2003. Trends in antimicrobial susceptibilities among *Enterobacteriaceae* isolated from hospitalized patients in the United States from 1998 to 2001. Antimicrob. Agents Chemother. **47:**1672-1680.

Keller, R., M. Z. Pedroso, R. Ritchmann, and R. M. Silva. 1998. Occurrence of virulence-associated properties in *Enterobacter cloacae*. Infect. Immun. **66:**645-649.

Khan, M. A., and R. E. Isaacson. 1998. *In vivo* expression of the beta-glucoside (*bgl*) operon of *Escherichia coli* occurs in mouse liver. J. Bacteriol. **180:**4746-4749.

Kobayashi, N., K. Nishino, and A. Yamaguchi. 2001. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **183:**5639-5644.

Kohler, T., M. Michea-Hamzehpour, U. Henze, N. Gotoh, L. K. Curty, and J. C. Pechère. 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. **23:**345-354.

Kohler, T., M. Michea-Hamzehpour, S. F. Epp, and J. C. Pechère. 1999. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. Antimicrob. Agents Chemother. **43:**424-427.

Koronakis, V., J. Li, E. Koronakis, and K. Stauffer. 1997. Structure of TolC, the outer membrane component of the bacterial type I efflux system, derived from two-dimensional crystals. Mol. Microbiol. **23:**617-626.

Koronakis, V., A. Sharff, E. Koronakis, B. Luisi, and C. Hughes. 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. Nature. **405:**914-919.

Koronakis, V., J. Eswaran, and C. Hughes. 2004. Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. Annu. Rev. Biochem. **73:**467-489.

Lavigne, J. P., N. Bouziges, C. Chanal, A. Mahamat, S. Michaux-Charachon, and A. Sotto. 2004. Molecular epidemiology of *Enterobacteriaceae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases in a French hospital. J. Clin. Microbiol. **42:**3805-3808.

Leclercq, R., and P. Courvalin. 1991. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. Antimicrob. Agents Chemother. **35:**1267-1272.

Lee, E. H., E. Collatz, I. Podglajen, and L. Gutmann. 1996. A *rob*-like gene of *Enterobacter cloacae* affecting porin synthesis and susceptibility to multiple antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. **40:**2029-2033.

Levy, S. B. 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. Antimicrob. Agents Chemother. **36:**695-703.

Li, X. Z., D. Ma, D. M. Livermore, and H. Nikaido. 1994. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to beta-lactam resistance. Antimicrob. Agents Chemother. **38:**1742-1752.

Li, X. Z., H. Nikaido, and K. Poole. 1995. Role of *mexA-mexB-oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **39:**1948-1953.

Li, X. Z., and K. Poole. 2001. Mutational analysis of the OprM outer membrane component of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **183:**12-27.

Li, X. Z., and H. Nikaido. 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. Drugs. **64:**159-204.

Lin, J., O. Sahin, L. O. Michel, and Q. Zhang. 2003. Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and *in vivo* colonization of *Campylobacter jejuni*. Infect. Immun. **71:**4250-4259.

Livermore, D. M. 1995. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin. Microbiol. Rev. **8:**557-584.

Livermore, D. M. 2001. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. J. Antimicrob. Chemother. **47:**247-250.

Lomovskaya, O., and K. Lewis. 1992. *emr*, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **89:**8938-8942.

Lomovskaya, O., M. S. Warren, A. Lee, J. Galazzo, R. Fronko, M. Lee, J. Blais, D. Cho, S. Chamberland, T. Renau, R. Léger, S. Hecker, W. Watkins, K. Hoshino, H. Ishida, and V. J. Lee. 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.

Ma, C., and G. Chang. 2004. Structure of the multidrug resistance efflux transporter EmrE from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **101:**2852-2857.

Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, and J. E. Hearst. 1993. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **175:**6299-6313.

Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, and J. E. Hearst. 1995. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **16:**45-55.

Ma, D., M. Alberti, C. Lynch, H. Nikaido, and J. E. Hearst. 1996. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. Mol. Microbiol. **19:**101-112.

Mäkelä, P. H., D. J. Bradley, H. Brandis, M. M. Franck, H. Hahn, W. Henkel, K. Jann, S. A. Marse, J. B. Robbins, L. Rosenstreich, H. Smith, K. Timmis, A. Tomasz, M. J. Turner, and D. C. Wiley. 1980. Evasion of host defenses group report, p. 147-197. *Dans* H.

Smith, J. J. Skehel, and M. J. Turner. The molecular basis of microbial pathogenicity, ed. Verlag Chemre GmbH.

Malléa, M., J. Chevalier, C. Bornet, A. Eyraud, A. Davin-Régli, C. Bollet, and J. M. Pagès. 1998. Porin alteration and active efflux: two in vivo drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes*. Microbiology. **144:**3003-3009.

Malléa, M., J. Chevalier, A. Eyraud, and J. M. Pagès. 2002. Inhibitors of antibiotic efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains. Biochem. Biophys. Res. Commun. **293:**1370-1373.

Malléa, M., A. Mahamoud, J. Chevalier, S. Alibert-Franco, P. Brouant, J. Barbe, and J. M. Pagès. 2003. Alkylaminoquinolines inhibit the bacterial antibiotic efflux pump in multidrug-resistant clinical isolates. Biochem. J. **376:**801-805.

Mamelli, L., J. P. Amoros, J. M. Pagès, and J. M. Bolla. 2003. A phenylalanine-arginine beta-naphthylamide sensitive multidrug efflux pump involved in intrinsic and acquired resistance of *Campylobacter* to macrolides. Int. J. Antimicrob. Agents. **22:**237-241.

Mao, W., M. S. Warren, D. S. Black, T. Satou, T. Murata, T. Nishino, N. Gotoh, and O. Lomovskaya. 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.

Marchandin, H., C. Carrière, D. Sirot, H. J. Pierre, and H. Darbas. 1999. TEM-24 produced by four different species of *Enterobacteriaceae*, including *Providencia rettgeri*, in a single patient. Antimicrob. Agents Chemother. **43:**2069-2073.

Marchandin, H., H. Jean-Pierre, C. De Champs, D. Sirot, H. Darbas, P. F. Périgault, and C. Carrière. 2000. Production of a TEM-24 plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase by a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **44:**213-216.

Martin, R. G., and J. L. Rosner. 1995. Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to *mar* operator sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **92:**5456-5460.

Martinez-Martinez, L., S. Hernandez-Alles, S. Alberti, J. M. Tomas, V. J. Benedi, and G. A. Jacoby. 1996. *In vivo* selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. Antimicrob. Agents Chemother. **40:**342-348.

Maseda, H., K. Saito, A. Nakajima, and T. Nakae. 2000. Variation of the *mexT* gene, a regulator of the MexEF-oprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. **192:**107-112.

Masuda, N., and S. Ohya. 1992. Cross-resistance to meropenem, cephems, and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **36:**1847-1851.

Mazzariol, A., Y. Tokue, T. M. Kanegawa, G. Cornaglia, and H. Nikaido. 2000. High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. Antimicrob. Agents Chemother. **44:**3441-3443.

McClain, M. S., M. C. Hurley, J. K. Brieland, and N. C. Engleberg. 1996. The *Legionella pneumophila hel* locus encodes intracellularly induced homologs of heavy-metal ion transporters of *Alcaligenes* spp. Infect. Immun. **64:**1532-1540.

McMurry, L. M., A. M. George, and S. B. Levy. 1994. Active efflux of chloramphenicol in susceptible *Escherichia coli* strains and in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants. Antimicrob. Agents Chemother. **38:**542-546.

Medeiros, A. A., T. F. O'Brien, E. Y. Rosenberg, and H. Nikaido. 1987. Loss of OmpC porin in a strain of *Salmonella typhimurium* causes increased resistance to cephalosporins during therapy. J. Infect. Dis. **156:**751-717.

Mine, T., Y. Morita, A. Kataoka, T. Mizushima, and T. Tsuchiya. 1999. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **43:**415-417.

Mokhonov, V. V., E. I. Mokhonova, H. Akama, and T. Nakae. 2004. Role of the membrane fusion protein in the assembly of resistance-nodulation-cell division multidrug efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **322:**483-489.

Monnet, D., and J. Freney. 2000. *Serratia*, p. 1183-1192. *In* J. Freney, F. Renaud, W. Hansen, and C. Bollet. Précis de bactériologie clinique, ESKA ed.

Morita, Y., K. Kodama, S. Shiota, T. Mine, A. Kataoka, T. Mizushima, and T. Tsuchiya. 1998. NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. **42:**1778-1782.

Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita, and A. Yamaguchi. 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. Nature. **419:**587-593.

Murray, I. A., and W. V. Shaw. 1997. O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. Antimicrob. Agents Chemother. **41:**1-6.

Nagel de Zwaig, R., and S. E. Luria. 1967. Genetics and physiology of colicin-tolerant mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **94:**1112-1123.

Nakajima, H., K. Kobayashi, M. Kobayashi, H. Asako, and R. Aono. 1995. Overexpression of the *robA* gene increases organic solvent tolerance and multiple antibiotic and heavy metal ion resistance in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. **61:**2302-2307.

Nakajima, A., Y. Sugimoto, H. Yoneyama, and T. Nakae. 2000. Localization of the outer membrane subunit OprM of resistance-nodulation-cell division family multicomponent efflux pump in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. **275:**30064-30068.

Nakamura, H. 1968. Genetic determination of resistance to acriflavine, phenethyl alcohol, and sodium dodecyl sulfate in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **96:**987-996.

Nakayama, K., Y. Ishida, M. Ohtsuka, H. Kawato, K. Yoshida, Y. Yokomizo, T. Ohta, K. Hoshino, T. Otani, Y. Kurosaka, H. Ishida, V. J. Lee, T. E. Renau, and W. J. Watkins. 2003. MexAB-OprM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 2: achieving activity *in vivo* through the use of alternative scaffolds. Bioorg. Med. Chem. Lett. **13:**4205-4208.

Narita, S., S. Eda, E. Yoshihara, and T. Nakae. 2003. Linkage of the efflux-pump expression level with substrate extrusion rate in the MexAB-OprM efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **308:**922-926.

Nehme, D., X. Z. Li, R. Elliot, and K. Poole. 2004. Assembly of the MexAB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of mutations in *mexA* compromising MexA multimerization and interaction with MexB. J. Bacteriol. **186:**2973-2983.

Neuwirth, C., E. Siebor, J. Lopez, A. Péchinot, and A. Kazmierczak. 1996. Outbreak of TEM-24-producing *Enterobacter aerogenes* in an intensive care unit and dissemination of the extended-spectrum beta-lactamase to other members of the family *Enterobacteriaceae*. J. Clin. Microbiol. **34:**76-79.

Neuwirth, C., E. Siebor, A. Péchinot, J. M. Duez, M. Pruneaux, F. Garel, A. Kazmierczak, and R. Labia. 2001. Evidence of *in vivo* transfer of a plasmid encoding the extended-spectrum beta-lactamase TEM-24 and other resistance factors among different members of the family *Enterobacteriaceae*. J. Clin. Microbiol. **39:**1985-1988.

Nikaido, H. 1989. Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. Antimicrob. Agents Chemother. **33:**1831-1836.

Nikaido, H. 1998. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. Clin. Infect. Dis. **27 Suppl 1:**S32-41.

Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **67:**593-656.

Nikaido, H., and T. Nakae. 1979. The outer membrane of Gram-negative bacteria. Adv. Microb. Physiol. **20:**163-250.

Nikaido, H., and E. Y. Rosenberg. 1983. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with liposomes reconstituted from purified proteins. J. Bacteriol. **153:**241-252.

Nikaido, H., E. Y. Rosenberg, and J. Foulds. 1983. Porin channels in *Escherichia coli*: studies with beta-lactams in intact cells. J. Bacteriol. **153:**232-240.

Nishino, K., and A. Yamaguchi. 2001. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **183:**5803-5812.

Oethinger, M., I. Podglajen, W. V. Kern, and S. B. Levy. 1998. Overexpression of the *marA* or *soxS* regulatory gene in clinical topoisomerase mutants of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. **42:**2089-2094.

Okusu, H., D. Ma, and H. Nikaido. 1996. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. J. Bacteriol. **178:**306-308.

Overbye, K. M., and J. F. Barrett. 2005. Antibiotics: where did we go wrong? Drug Discov. Today. **10:**45-52.

Pagès, J. M. 2004. Role of bacterial porins in antibiotic susceptibility of gram-negative bacteria. *In* R. Benz, Bacterial and Eukaryotic Porins: Structure, Function, Mechanism. Wiley-VCH (ed.).

Pai, H., J. Kim, J. H. Lee, K. W. Choe, and N. Gotoh. 2001. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother. **45:**480-484.

Paton, A. W., and J. C. Paton. 1996. *Enterobacter cloacae* producing a Shiga-like toxin II-related cytotoxin associated with a case of hemolytic-uremic syndrome. J. Clin. Microbiol. **34:**463-465.

Paulsen, I. T., and R. A. Skurray. 1993. Topology, structure and evolution of two families of proteins involved in antibiotic and antiseptic resistance in eukaryotes and prokaryotes-an analysis. Gene. **124:**1-11.

Paulsen, I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiol. Rev. **60:**575-608.

Paulsen, I. T., J. H. Park, P. S. Choi, and M. H. Saier, Jr. 1997. A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Lett. **156:**1-8.

Paulsen, I. T., M. K. Sliwinski, and M. H. Saier, Jr. 1998. Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. J. Mol. Biol. **277:**573-592.

Podschun, R., and U. Ullmann. 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin. Microbiol. Rev. **11:**589-603.

Pomposiello, P. J., M. H. Bennik, and B. Demple. 2001. Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate. J. Bacteriol. **183:**3890-3902.

Poole, K., D. E. Heinrichs, and S. Neshat. 1993a. Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. Mol. Microbiol. **10:**529-544.

Poole, K., K. Krebes, C. McNally, and S. Neshat. 1993b. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. J. Bacteriol. **175:**7363-7372.

Poole, K., N. Gotoh, H. Tsujimoto, Q. Zhao, A. Wada, T. Yamasaki, S. Neshat, J. Yamagishi, X. Z. Li, and T. Nishino. 1996. Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux

operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol. **21:**713-724.

Pradel, E., and J. M. Pagès. 2002. The AcrAB-TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. Antimicrob. Agents Chemother. **46:**2640-2643.

Pratt, L. A., W. Hsing, K. E. Gibson, and T. J. Silhavy. 1996. From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **20:**911-917.

Prouty, A. M., I. E. Brodsky, S. Falkow, and J. S. Gunn. 2004. Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella typhimurium*. Microbiology **150:**775-783.

Quinn, J. P., E. J. Dudek, C. A. DiVincenzo, D. A. Lucks, and S. A. Lerner. 1986. Emergence of resistance to imipenem during therapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections. J. Infect. Dis. **154:**289-294.

Rahmati, S., S. Yang, A. L. Davidson, and E. L. Zechiedrich. 2002. Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. Mol. Microbiol. **43:**677-685.

Rappsilber, J., S. Siniossoglou, E. C. Hurt, and M. Mann. 2000. A generic strategy to analyze the spatial organization of multi-protein complexes by cross-linking and mass spectrometry. Anal. Chem. **72:**267-275.

Renau, T. E., R. Léger, E. M. Flamme, J. Sangalang, M. W. She, R. Yen, C. L. Gannon, D. Griffith, S. Chamberland, O. Lomovskaya, S. J. Hecker, V. J. Lee, T. Ohta, and K. Nakayama. 1999. Inhibitors of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* potentiate the activity of the fluoroquinolone antibacterial levofloxacin. J. Med. Chem. **42:**4928-4931.

Rosenberg, E. Y., D. Ma, and H. Nikaido. 2000. AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. J Bacteriol **182:**1754-1756.

Rosenberg, E. Y., D. Y.Bertenthal, M. L. Nilles, K. P. Bertrand, and H. Nikaido. 2003. Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. Mol. Microbiol. **48:**1609-1619.

Rouquette-Loughlin, C., I. Stojiljkovic, T. Hrobowski, J. T. Balthazar, and W. M. Shafer. 2002. Inducible, but not constitutive, resistance of gonococci to hydrophobic agents due to the MtrC-MtrD-MtrE efflux pump requires TonB-ExbB-ExbD proteins. Antimicrob. Agents Chemother. **46:**561-565.

Saier, M. H., Jr., R. Tam, A. Reizer, and J. Reizer. 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. Mol. Microbiol. **11:**841-847.

Saier, M. H., Jr., I. T. Paulsen, M. K. Sliwinski, S. S. Pao, R. A. Skurray, and H. Nikaido. 1998. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. Faseb J. **12:**265-274.

Saier, M. H., Jr., J. T. Beatty, A. Goffeau, K. T. Harley, W. H. Heijne, S. C. Huang, D. L. Jack, P. S. Jahn, K. Lew, J. Liu, S. S. Pao, I. T. Paulsen, T. T. Tseng, and P. S. Virk. 1999. The major facilitator superfamily. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **1:**257-279.

Salso, S., E. Culebras, R. Andrade, and J. J. Picazo. 2003. Outbreak of TEM-24-producing *Enterobacter aerogenes* in a Spanish hospital. Microb. Drug Resist. **9:**299-305.

Sanders, W. E., Jr., and C. C. Sanders. 1997. *Enterobacter* spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. Clin. Microbiol. Rev. **10:**220-241.

Schneiders, T., S. G. Amyes, and S. B. Levy. 2003. Role of AcrR and ramA in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore. Antimicrob. Agents Chemother. **47:**2831-2837.

Schuldiner, S., M. Lebendiker, and H. Yerushalmi. 1997. EmrE, the smallest ion-coupled transporter, provides a unique paradigm for structure-function studies. J. Exp. Biol. **200:**335-341.

Sharff, A., C. Fanutti, J. Shi, C. Calladine, and B. Luisi. 2001. The role of the TolC family in protein transport and multidrug efflux. From stereochemical certainty to mechanistic hypothesis. Eur. J. Biochem. **268:**5011-5026.

Shyu, J. B., D. P. Lies, and D. K. Newman. 2002. Protective role of tolC in efflux of the electron shuttle anthraquinone-2,6-disulfonate. J. Bacteriol. **184:**1806-1810.

Sinz, A. 2003. Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes. J. Mass. Spectrom. **38:**1225-1237.

Sirot, D. 1995. Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases. J. Antimicrob. Chemother. **36 Suppl. A.:**19-34.

Sirot, J., M. H. Nicolas-Chanoine, H. Chardon, J. L. Avril, C. Cattoen, J. C. Croix, H. Dabernat, T. Fosse, J. C. Ghnassia, E. Lecaillon, A. Marmonier, M. Roussel-Delvallez, C. J. Soussy, A. Trevoux, F. Vandenesch, C. Dib, N. Moniot-Ville, and Y. Rezvani. 2002. Susceptibility of *Enterobacteriaceae* to beta-lactam agents and fluoroquinolones: a 3-year survey in France. Clin. Microbiol. Infect. **8:**207-213.

Sobel, M. L., S. Neshat, and K. Poole. 2005. Mutations in PA2491 (*mexS*) promote MexT-dependent *mexEF-oprN* expression and multidrug resistance in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **187:**1246-1253.

Stermitz, F. R., P. Lorenz, J. N. Tawara, L. A. Zenewicz, and K. Lewis. 2000. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **97:**1433-1437.

Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrener, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrock-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. Nature. **406:**959-964.

Streit, J. M., R. N. Jones, H. S. Sader, and T. R. Fritsche. 2004. Assessment of pathogen occurrences and resistance profiles among infected patients in the intensive care unit: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 2001). Int. J. Antimicrob. Agents. **24:**111-8.

Sulavik, M. C., C. Houseweart, C. Cramer, N. Jiwani, N. Murgolo, J. Greene, B. DiDomenico, K. J. Shaw, G. H. Miller, R. Hare, and G. Shimer. 2001. Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. Antimicrob. Agents Chemother. **45:**1126-1136.

Thanabalu, T., E. Koronakis, C. Hughes, and V. Koronakis. 1998. Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E. coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. Embo J. **17:**6487-6496.

Thanassi, D. G., L. W. Cheng, and H. Nikaido. 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **179:**2512-2518.

Thiolas, A., C. Bornet, A. Davin-Régli, J. M. Pagès, and C. Bollet. 2004. Resistance to imipenem, cefepime, and cefpirome associated with mutation in Omp36 osmoporin of *Enterobacter aerogenes*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **317:**851-856.

Thomson, K. S., and E. Smith Moland. 2000. Version 2000: the new beta-lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. Microbes Infect. **2:**1225-1235.

Tikhonova, E. B., Q. Wang, and H. I. Zgurskaya. 2002. Chimeric analysis of the multicomponent multidrug efflux transporters from gram-negative bacteria. J. Bacteriol. **184:**6499-6507.

Tikhonova, E. B., and H. I. Zgurskaya. 2004. AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* Form a Stable Intermembrane Multidrug Efflux Complex. J. Biol. Chem. **279:**32116-32124.

Touzé, T., J. Eswaran, E. Bokma, E. Koronakis, C. Hughes, and V. Koronakis. 2004. Interactions underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system. Mol. Microbiol. **53:**697-706.

Trias, J., J. Dufresne, R. C. Levesque, and H. Nikaido. 1989. Decreased outer membrane permeability in imipenem-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **33:**1202-1206.

Trias, J., and H. Nikaido. 1990a. Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. **34:**52-57.

Trias, J., and H. Nikaido. 1990b. Protein D2 channel of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane has a binding site for basic amino acids and peptides. J. Biol. Chem. **265:**15680-15684.

Troillet, N., Y. Carmeli, L. Venkataraman, P. DeGirolami, and M. H. Samore. 1999. Epidemiological analysis of imipenem-resistant *Serratia marcescens* in hospitalized patients. J. Hosp. Infect. **42:**37-43.

Tseng, T. T., K. S. Gratwick, J. Kollman, D. Park, D. H. Nies, A. Goffeau, and M. H. Saier, Jr. 1999. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **1:**107-125.

Tzouvelekis, L. S., E. Tzelepi, M. E. Kaufmann, and A. F. Mentis. 1994. Consecutive mutations leading to the emergence *in vivo* of imipenem resistance in a clinical strain of *Enterobacter aerogenes*. J. Med. Microbiol. **40:**403-407.

Vakharia, H., G. J. German, and R. Misra. 2001. Isolation and characterization of *Escherichia coli tolC* mutants defective in secreting enzymatically active alpha-hemolysin. J. Bacteriol. **183:**6908-6916.

Walsh, C. 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature. **406:**775-781.

Wandersman, C., and P. Delepelaire. 1990. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **87:**4776-4780.

Wang, H., J. L. Dzink-Fox, M. Chen, and S. B. Levy. 2001. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. Antimicrob. Agents Chemother. **45:**1515-1521.

Wenzel, R. P., D. F. Sahm, C. Thornsberry, D. C. Draghi, M. E. Jones, and J. A. Karlowsky. 2003. *In vitro* susceptibilities of gram-negative bacteria isolated from hospitalized patients in four European countries, Canada, and the United States in 2000-2001 to expanded-spectrum cephalosporins and comparator antimicrobials: implications for therapy. Antimicrob. Agents Chemother. **47:**3089-3098.

White, D. G., K. Maneewannakul, E. von Hofe, M. Zillman, W. Eisenberg, A. K. Field, and S. B. Levy. 1997. Inhibition of the multiple antibiotic resistance (*mar*) operon in *Escherichia coli* by antisense DNA analogs. Antimicrob. Agents Chemother. **41:**26699-26704.

Whitney, E. N. 1970. The *tolC* locus in *Escherichia coli* K-12. Genetics **67:**39-59.

Wong, K. K., F. S. Brinkman, R. S. Benz, and R. E. Hancock. 2001. Evaluation of a structural model of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprM, an efflux component involved in intrinsic antibiotic resistance. J. Bacteriol. **183:**367-374.

Wright, G. D. 1999. Aminoglycoside-modifying enzymes. Curr. Opin. Microbiol. **2:**499-503.

Wright, G. D., A. M. Berghuis, and S. Mobashery. 1998. Aminoglycoside antibiotics. Structures, functions, and resistance. Adv. Exp. Med. Biol. **456:**27-69.

Yamanaka, H., T. Nomura, Y. Fujii, and K. Okamoto. 1998. Need for TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein, in the secretion of heat-stable enterotoxin I across the outer membrane. Microb. Pathog. **25:**111-120.

Yoshihara, E., H. Maseda, and K. Saito. 2002. The outer membrane component of the multidrug efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa* may be a gated channel. Eur. J. Biochem. **269:**4738-4745.

Yu, E. W., G. McDermott, H. I. Zgurskaya, H. Nikaido, and D. E. Koshland, Jr. 2003a. Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump. Science. **300:**976-980.

Yu, E. W., J. R. Aires, and H. Nikaido. 2003b. AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. J. Bacteriol. **185:**5657-5664.

Zgurskaya, H. I., and H. Nikaido. 1999a. AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm. J. Mol. Biol. **285:**409-420.

Zgurskaya, H. I., and H. Nikaido. 1999b. 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., and H. Nikaido. 2000a. Cross-linked complex between oligomeric periplasmic lipoprotein AcrA and the inner-membrane-associated multidrug efflux pump AcrB from *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **182:**4264-4267.

Zgurskaya, H. I., and H. Nikaido. 2000b. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. Mol. Microbiol. **37:**219-25.

Zheleznova, E. E., P. N. Markham, A. A. Neyfakh, and R. G. Brennan. 1999. Structural basis of multidrug recognition by BmrR, a transcription activator of a multidrug transporter. Cell. **96:**353-362.

Ziha-Zarifi, I., C. Llanes, T. Kohler, J. C. Pechère, and P. Plésiat. 1999. *In vivo* emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. Antimicrob. Agents Chemother. **43:**287-291.