

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE PHARMACIE

**APPORTS DE L'ETUDE DES ARNm
DANS L'INVESTIGATION DE LA RESISTANCE
AUX β -LACTAMINES
CHEZ LES BACILLES A GRAM NEGATIF**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale : Chimie biologique

Discipline : Pharmacie

Spécialité : Bactériologie

présentée et soutenue publiquement par

Stéphane CORVEC

le 6 Juillet 2004

Devant le jury ci-dessous :

Rapporteurs : Mme le Professeur Claudine QUENTIN-NOURY
M. le Professeur Patrice NORDMANN

Examineurs : M. le Professeur Michel CORMIER
M. le Professeur Henri DRUGEON
M. le Professeur Alain REYNAUD
Mme le Docteur Nathalie CAROFF

Directeur de Thèse : M. le Professeur Alain REYNAUD
Co-encadrement : Mme le Docteur Nathalie CAROFF

SOMMAIRE

pp.

LISTE DES ABREVIATIONS.....	5
LISTE DES TABLEAUX.....	6
LISTE DES FIGURES.....	7
INTRODUCTION.....	10
RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE.....	14
I- La transcription chez les procaryotes.....	15
<i>I.1- Rappel de quelques éléments essentiels de la structure des ARN bactériens :</i>	15
I.1.1- Les ARN ribosomiques (ARNr).....	15
I.1.2- Les ARN de transfert (ARNt).....	17
I.1.3- Les ARN messagers (ARNm).....	18
I.1.4- Les petits ARN ("small RNA").....	18
I.2- Spécificité des ARNm bactériens.....	19
I.3- Synthèse des ARNm :	20
I.3.1 - Fonctionnement de l'ARN-polymérase :	20
I.3.1.1- Structure de l'ARN-polymérase.	21
I.3.1.2- Un co-facteur : le facteur σ	21
I.3.2- Structure générale des promoteurs bactériens.....	22
I.3.3- Les différentes étapes de la transcription chez les procaryotes :	25
I.3.3.1- Initiation de la transcription.....	26
I.3.3.2- Elongation.....	26
I.3.3.3- Terminaison.....	27
I.4- Dégradation des ARNm :	28
I.4.1- Demi-vie des ARNm.....	28
I.4.2- Le dégradosome.....	28
I.4.3- Rôle de la poly-adénylation dans la dégradation des ARNm.....	31
I.4.4- Différentes voies de dégradation.....	32

I.5- Régulation transcriptionnelle :	33
I.5.1- Régulations positive et négative.....	33
I.5.2- Exemple de l'activateur transcriptionnel CAP.....	33
I.5.3- Rôle des séquences d'insertion.....	34
I.5.4- Surenroulement de l'ADN.....	35
I.5.5- Régulation de la transcription par l'ARN.....	36
I.6- Méthodes d'étude des ARNm :	36
I.6.1- Techniques d'extraction des ARN totaux.....	36
I.6.2- Contrôle de la qualité et de la quantité des ARN obtenus.....	37
I.6.3- Conservation des ARN.....	38
I.6.4- Principales techniques moléculaires de mise en évidence des ARNm :	38
I.6.4.1- Le Northern blot.....	38
I.6.4.2- La RT-PCR classique.....	39
I.6.4.3- La RT-PCR quantitative.....	41
I.6.4.4- La RT-PCR en temps réel.....	41
I.6.4.5- Détection du site d'initiation de la transcription, à la nucléase S1.....	45

II- Supports et régulation génétiques de la résistance aux β -lactamines

<i>chez les bacilles à Gram négatif :</i>	<i>46</i>
II.1- Les supports génétiques de la résistance :	46
II.1.1- Le chromosome bactérien.....	46
II.1.2- Les supports plasmidiques.....	47
II.1.3- Les transposons.....	48
II.1.4- Les intégrons.....	51
II.2- Résistance par production d'enzymes inactivatrices :	55
II.2.1- Rappel succinct des différentes classes de β-lactamases.....	55
II.2.2- Données actuelles sur la régulation de l'expression des gènes codant pour les β-lactamases :	58
II.2.2.1- Les enzymes constitutives.....	58
II.2.2.1.1- Les enzymes de type TEM.....	58
II.2.2.1.2- Les autres enzymes de classe A.....	60

II.2.2.1.3- La β -lactamase AmpC de <i>E. coli</i>	61
II.2.2.2- Les enzymes inductibles.....	63
II.3- Autres mécanismes de résistance :	66
II.3.1- Modification des porines :.....	66
II.3.1.1- Rôle physiologique et structure des porines.....	66
II.3.1.2- Implication dans la résistance aux antibiotiques.....	68
II.3.1.3- Régulation de la synthèse des porines.....	69
II.3.2- Systèmes d'efflux actif :	71
II.3.2.1- Structure et fonctionnement.....	71
II.3.2.2- Organisation et régulation génétiques.....	75
PARTIE EXPÉRIMENTALE	79
Nature et objectifs des recherches.....	80
I - Etude du promoteur du gène <i>ampC</i> d'une souche hyperproductrice de céphalosporinase : rôle d'une nouvelle mutation dans la Pribnow box chez <i>Escherichia coli</i>	83
I.1 - Présentation.....	83
I.2 - Matériel et méthodes - Résultats (Article n°1).....	84
I.3 - Commentaires.....	88
II - Mise au point d'une technique d'évaluation quantitative de l'expression génétique des ARNm bactériens par RT-PCR, chez <i>Escherichia coli</i> : comparaison des techniques de RT-PCR conventionnelle et RT-PCR en temps réel.	91
II.1 - Présentation.....	91
II.2 - Matériel et méthodes - Résultats (Article n°2).....	91
II.3 - Commentaires.....	97
III - Etude bactériologique et épidémiologique de souches de <i>Acinetobacter baumannii</i> : rôle d'une séquence d'insertion en amont du gène <i>ampC</i> , chez les souches hyperproductrices de céphalosporinase, résistantes à la ceftazidime.....	102
III.1 - Présentation.....	102
III.2 - Matériel et méthodes - Résultats (Article n°3).....	103
III.3 - Commentaires.....	111
IV - Etude de l'hyperproduction de la β -lactamase SHV-1 chez des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> de sensibilité diminuée ou résistantes à l'association amoxicilline plus acide clavulanique.	118

IV.1 - Présentation.....	118
IV.2 - Matériel et méthodes - Résultats (Article n°4).....	118
IV.3 - Commentaires.....	137
V - Etude du système d'efflux constitutif MexAB-OprM chez une souche de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> hyperproductrice : rôle d'une séquence d'insertion IS21 dans le gène régulateur <i>mexR</i>	141
V.1 - Présentation.....	141
V.2 - Matériel et méthodes - Résultats (Article n°5).....	141
V.3 - Commentaires.....	146
DISCUSSION GENERALE.....	149
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	160
REFERENCES.....	162

LISTE DES ABREVIATIONS

ABC transporteurs	ATP binding cassettes transporteurs
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
ATP	Adénosine triphosphate
ARN	Acide ribonucléique
BET	Bromure d'éthidium
BLSE	Bêta-lactamase à spectre étendu
CAP	Catabolite receptor protein
CAT	Chloramphénicol acétyltransférase
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CRP	c AMP receptor protein
Ct	Cycle seuil ou threshold cycle
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DR	Direct repeat
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène diamino-tétra-acétique
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GAPDH	D-glycéraldéhyde-3-phosphate-deshydrogénase
IEF	Isoélectrofocalisation
IR	Inverted repeat
IS	Séquence d'insertion
KD	kiloDalton
MATE	Multidrug and toxic compound extrusion family
MFS	Major facilitator superfamily
OMP	Outer membran protein : protéine de membrane externe
ORF	Open reading frame : cadre ouvert de lecture
PCR	Polymerase chain reaction
PLP	Protéine liant les pénicillines
RND	Resistance nodulation cell division
RT-PCR	Reverse transcription-Polymerase chain reaction
SMR	Small multidrug resistance
TRIS	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
UV	Ultra-violet

LISTE DES TABLEAUX

	pp.
Tableau I : Comparaison des caractéristiques des ARN, chez les procaryotes et les eucaryotes.	19
Tableau II : Caractéristiques des principales séquences d'insertion décrites chez les bactéries, d'après Mahillon et Chandler (1998).	50
Tableau III : Séquences promotrices des intégrons P1 et P2, distance inter-boxes et force relative des régions promotrices -35 et -10, d'après Fluit et Schmitz (1999).	54
Tableau IV : Correspondance entre les classifications de Ambler et de Bush, d'après Livermore (1995).	55
Tableau V : Tableau récapitulatif des familles d'antibiotiques impliqués dans les systèmes d'efflux de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , d'après P. Plésiat (2002).	78
Tableau VI : Comparaison des séquences nucléotidiques des promoteurs et des gènes <i>bla</i> _{TEM} retrouvés chez les souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> étudiées	140

LISTE DES FIGURES

pp.

Figure 1 :	Structure secondaire des ARN.	16
Figure 2 :	Structure tertiaire des ARNt, d'après http://ir2lcb.cnrs-mrs.fr/~acedb/tutorial/Intro_bio_mol.html	17
Figure 3 :	Structure d'un ARNt.	18
Figure 4 :	Structure du complexe ARN-polymérase et double hélice d'ADN, d'après Murakami et Darst (2003).	21
Figure 5 :	Interactions promoteurs et ARN-polymérase, d'après Busby et Ebright (1994)	24
Figure 6 :	Les différentes étapes de la transcription chez les procaryotes, d'après Mooney <i>et al.</i> (1998).	25
Figure 7 :	Schéma du dégradosome, d'après Rauhut et Klug (1999).	30
Figure 8 :	Rôle de la poly-adenylation dans la dégradation des ARN, d'après Carpousis <i>et al.</i> (1999).	31
Figure 9 :	Les différentes voies de dégradation des ARNm, d'après Steege (2000).	32
Figure 10 :	Principe de la technique du Northern Blot.	39
Figure 11 :	Principe de la RT-PCR avec le SYBR Green, d'après Poitras et Houde (2002).	42
Figure 12 :	Principe de la RT-PCR avec une sonde TaqMan, d'après Poitras et Houde (2002).	43
Figure 13 :	Principe de détection de la PCR en temps réel et du cycle seuil ou Ct, d'après Poitras et Houde (2002).	44
Figure 14 :	Organisation des transposons, d'après http://www.biochimie7.fr	51
Figure 15 :	Structure générale des intégrons de classe 1.	52
Figure 16 :	Schéma de l'intégration d'une cassette dans un intégron de classe 1.	53
Figure 17 :	Séquences des promoteurs Pa et Pb des gènes <i>bla</i> _{TEM}	59
Figure 18 :	Structure de l'opéron fumarate-réductase chez <i>E. coli</i> , d'après Bergström <i>et al.</i> (1983).	61

Figure 19 : Séquence de l'atténuateur du gène <i>ampC</i> : représentation de la structure dite en épingle à cheveux, d'après Siu <i>et al.</i> (2003).	62
Figure 20 : Environnement génétique de différentes β -lactamases AmpC, d'après Girlich <i>et al.</i> (2000).	64
Figure 21 : Interconnexion entre le recyclage de la muréine et l'induction des β-lactamases AmpC, d'après Jacobs <i>et al.</i> (1997).	65
Figure 22 : Structure de la porine OmpF de <i>Escherichia coli</i> , d'après Nikaido (2003). .	67
Figure 23 : Régulation de l'expression des porines OmpF et OmpC chez <i>Escherichia coli</i> par osmorégulation, d'après Pagès J.M (2000).	70
Figure 24 : Modèle de structure des différentes familles de systèmes d'efflux, d'après Putman <i>et al.</i> (2000).	72
Figure 25 : Système d'efflux AcrAB-TolC chez <i>Escherichia coli</i> , d'après Nikaido et Zgurskaya (2001).	73
Figure 26 : Structure générale des systèmes d'efflux de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, d'après Plésiat <i>et al.</i> (1998).	74
Figure 27 : Cartographie des sites de restriction de l'opéron <i>mexA-mexB-oprM</i> et du gène régulateur <i>mexR</i> chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , d'après Srikumar <i>et al.</i> (2000).	76
Figure 28 : Schéma de l'organisation génétique et de la régulation des systèmes d'efflux de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , d'après Plésiat <i>et al.</i> (1998).	77
Figure 29 : Structure du vecteur d'expression pKK232-8 du gène de la chloramphénicol-acétyl-transférase, utilisé pour l'étude de la force des promoteurs.	90
Figure 30 : Photographie du gel d'agarose après migration du plasmide, clonage de l'insert dans pKK232-8 et digestion par <i>Pst</i> I.	90
Figure 31 : Visualisation, sur gel, des ARNr 16S de 4 souches de <i>E. coli</i> , après RT-PCR précédée d'une étape de pré-traitement des échantillons à la DNase, par rapport au résultat obtenu après PCR réalisée dans les mêmes conditions préalables.	98

Figure 32 : Visualisation de la différence de taille entre le gène cible <i>ampC</i> et le standard interne construit à l'aide d'une amorce délétée de 7 paires de bases : mise en évidence par migration en gel d'acrylamide 6 %	99
Figure 33 : Gamme de standard interne délété de 7 paires de bases, utilisé en RT-PCR compétitive, après migration en gel d'acrylamide à 6 %	100
Figure 34 : Courbe de fusion des témoins ARN 16S, avec pics cibles et dimères de primers	101
Figure 35 : Amplification, par PCR, de la partie 5' non codante du gène <i>ampC</i> : mise en évidence par migration en gel d'agarose 1,5 %	112
Figure 36 : IS en amont du gène <i>ampC</i> des souches de <i>Acinetobacter baumannii</i> résistantes à la ceftazidime.	113
Figure 37 : Comparaison des profils obtenus par électrophorèse en champ pulsé, pour les souches de <i>Acinetobacter baumannii</i> étudiées	114
Figure 38 : Détection du point isoélectrique des β -lactamases produites par diverses souches de <i>Acinetobacter baumannii</i> , par isoélectrofocalisation analytique	114
Figure 39 : Détection du gène de l'intégrase des intégrons de classe 1 de <i>Acinetobacter baumannii</i> , par PCR : mise en évidence après migration en gel d'agarose à 1,5 %	115
Figure 40 : Détection de l'intégron de classe 1, par PCR, chez <i>Acinetobacter baumannii</i> :	

mise en évidence en gel d'agarose à 1, 5 %.....	116
Figure 41 : Séquence de l'intégron identifié chez des souches de <i>Acinetobacter baumannii</i> résistantes aux carbapénèmes (Gen bank accession number AJ310480), d'après Gombac <i>et al.</i> , 2002.....	116
Figure 42 : Comparaison des profils obtenus par électrophorèse en champ pulsé, pour 7 souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i> étudiées.....	137
Figure 43 : Visualisation de la différence de taille de l'amplicon correspondant à la région située entre la région promotrice et le début du gène <i>bla_{SHV}</i> des souches de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	138
Figure 44 : Test de synergie réalisé sur la souche n°11 exprimant uniquement le gène <i>bla_{SHV44}</i>	139

INTRODUCTION

En l'absence de moyens de prévention suffisamment efficaces, les antibiotiques restent le principal élément de la lutte contre les infections bactériennes. Ils sont ainsi très (voire trop) largement utilisés, notamment en milieu hospitalier.

Du fait de leurs importantes capacités d'adaptation génétique, les bactéries développent constamment de nouvelles résistances, en fonction de la pression de sélection à laquelle elles se trouvent exposées, en utilisant les possibilités que leur offre leur propre patrimoine génétique, mais aussi celui de leurs congénères. Ainsi, la résistance aux antibiotiques constitue un élément essentiel du problème posé par les infections acquises à l'hôpital, qui font désormais partie des préoccupations sanitaires prioritaires. En effet, la dissémination des résistances aux antibiotiques concerne de plus en plus de sujets, notamment du fait d'un passage plus fréquent en structure hospitalière, où l'on observe une rapide modification des flores de l'individu, susceptible d'acquérir ainsi des bactéries résistantes. Elle est aussi partiellement liée à une large utilisation de nombreux antibiotiques en pathologie communautaire. Enfin, l'environnement humain constitue également un réservoir de bactéries résistantes, notamment par les rejets qu'il subit de la part de l'Homme ou des animaux.

L'étude de la résistance bactérienne aux antibiotiques reste quotidiennement assurée par la réalisation d'antibiogrammes, fournissant des informations plus ou moins précises par estimation ou mesure de concentrations minimales inhibitrices (CMI). Cela permet d'établir des phénotypes de comportement, qu'il s'avère plus ou moins délicat de relier ensuite à un mécanisme de résistance et au génotype correspondant. Par ailleurs, l'introduction de techniques moléculaires dans les études épidémiologiques permet désormais de suivre les évolutions de comportement et les transferts de souches bactériennes, soit chez un même patient en cours de traitement, soit au sein d'une structure (unité de soins, hôpital...). Ces techniques ont aussi conduit à une considérable évolution des connaissances et possibilités d'investigation nouvelles, dans le domaine de la résistance bactérienne aux antibiotiques.

L'adaptation des bactéries apparaît liée à diverses possibilités d'évolution génétique :

- des mutations ponctuelles au niveau de gènes codant, par exemple, pour des enzymes antérieurement connues, responsables de l'inactivation d'antibiotiques, dont le profil de substrats va se trouver plus ou moins fortement modifié : on peut citer, dans ce domaine, les β -lactamases à spectre étendu, issues des enzymes de type TEM-1, TEM-2 ou SHV-1 ;

- l'émergence, chez des bactéries pathogènes, de gènes de résistance provenant, le plus souvent par transmission horizontale, de souches environnementales ou appartenant aux flores commensales ;
- des perturbations survenant dans la régulation de l'expression de gènes qui codent pour des mécanismes de résistance connus et répandus, se traduisant par un accroissement du niveau de résistance observé.

Dans le cadre de nos activités hospitalières, nous sommes régulièrement confrontés à des observations de ce type, qui incitent à s'interroger sur l'impact, à plus ou moins long terme, des différents mécanismes de résistance potentiellement impliqués. Par ailleurs, la fréquence des infections par bacilles à Gram négatif tels que les entérobactéries (quel que soit le contexte considéré) ou bien *Pseudomonas aeruginosa* ou *Acinetobacter baumannii* (plus spécifiquement en milieu hospitalier), ainsi que l'utilisation habituelle des β -lactamines dans leur traitement, nous ont également incité à nous intéresser plus particulièrement aux interactions entre ces bactéries et ces antibiotiques.

Nos objectifs étaient d'étudier, de façon approfondie, différents mécanismes de résistance d'intérêt pratique, dépistés au cours d'activités de diagnostic en laboratoire hospitalier. Nous souhaitions : (i) évaluer leur impact respectif en termes de niveau de résistance aux diverses β -lactamines, (ii) établir une corrélation directe avec le support génétique et le ou les mécanisme(s) de régulation impliqué(s), (iii) envisager le risque potentiel d'émergence et de dissémination des résistances correspondantes.

L'application de techniques moléculaires usuelles nous a initialement fourni les outils nécessaires à l'initiation de notre travail. Puis nous avons développé une RT-PCR, dans un but d'analyse quantitative des ARNm spécifiques des gènes de résistance concernés. Ceci a alors permis l'investigation des mécanismes de régulation de l'expression des gènes de résistance impliqués.

Les travaux rapportés concerneront principalement la résistance aux β -lactamines par inactivation enzymatique, soit par hyperproduction de céphalosporinase AmpC chez *E. coli* ou *A. baumannii*, soit par hyperproduction de β -lactamase SHV-1 chez *Klebsiella pneumoniae*. Une application des développements technologiques réalisés, dans le domaine de la résistance aux β -lactamines par mécanisme d'efflux chez *P. aeruginosa*, sera également évoquée.

Dans un premier temps, nous présenterons un rappel des bases fondamentales des travaux réalisés, concernant les aspects principaux de la régulation génétique chez les procaryotes et leurs implications dans les phénomènes de résistance aux β -lactamines chez les bacilles à Gram négatif. Les travaux que nous avons publiés dans la littérature seront ensuite successivement présentés, suivis de quelques commentaires. Enfin, nous aborderons une discussion générale sur l'intérêt des données rapportées et les perspectives qu'elles peuvent ouvrir.

RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

bases fondamentales des travaux rapportés

I - La transcription chez les procaryotes

1.1 - Rappel de quelques éléments essentiels de la structure des ARN bactériens :

Les molécules d'ARN sont caractérisées par le remplacement du 2'-désoxyribose présent dans les molécules d'ADN par du ribose, celui d'une des bases pyrimidiques : la thymidine par l'uracile, ainsi que par leur structure monocaténaire. Ainsi, en raison de la présence d'un groupement hydroxyle supplémentaire sur le sucre, les molécules d'ARN forment plus difficilement une structure en double hélice stable, comme le fait l'ADN. Ce sont donc des molécules simple brin, dans la majorité des cas. Cependant, il peut exister des régions "d'hélices doubles brins", au sein des molécules d'ARN, lorsqu'on retrouve quelques bases complémentaires qui forment des structures caractéristiques dites "boucles en épingles à cheveux". Les molécules d'ARN qui présentent ce type d'élément interne, au sein de leur chaîne, représentent la structure secondaire des ARN (**Figure 1**, p. 16). Par ailleurs, de nombreuses interactions moléculaires peuvent exister, formant la structure tertiaire. (**Figure 2**, p. 17).

Comme chez les eucaryotes, différents types de molécules d'ARN, caractérisées par une structure, une taille et une fonction différentes, coexistent chez les procaryotes,

principalement les ARN ribosomiques ou ARNr, les ARN de transfert ou ARNt et les ARN messagers ou ARNm.

I.1.1 - Les ARN ribosomiques (ARNr).

Les ribosomes sont des organites intracellulaires situés dans le cytoplasme et qui constituent l'usine de fabrication des protéines de la cellule bactérienne. Les ribosomes 70S sont formés d'une petite sous-unité 30S et d'une grande sous-unité 50S. Chacune est constituée de protéines ribosomales (ou r-protéines) et des ARNr. Ainsi, la sous-unité 50S contient deux types d'ARNr 5S et 23S, ainsi qu'un nombre considérable de protéines (plus d'une trentaine), alors que la sous-unité 30S ne contient qu'un ARNr 16S, avec plus d'une vingtaine de protéines. Les ribosomes possèdent une région permettant la fixation d'une molécule d'ARNm. Ils possèdent également deux sites de fixation pour les molécules d'ARNt : le site P, responsable de la liaison du peptidyl-ARNt et le site A, responsable de la liaison de l'aminoacyl-ARNt.

Ces ARNr jouent un rôle essentiel dans la structure et le maintien de l'intégrité des ribosomes, en association avec les protéines ribosomales (Schneider *et al.*, 2003).

Figure 1 : Structure secondaire des ARN.

Secondary Structure: small subunit ribosomal RNA

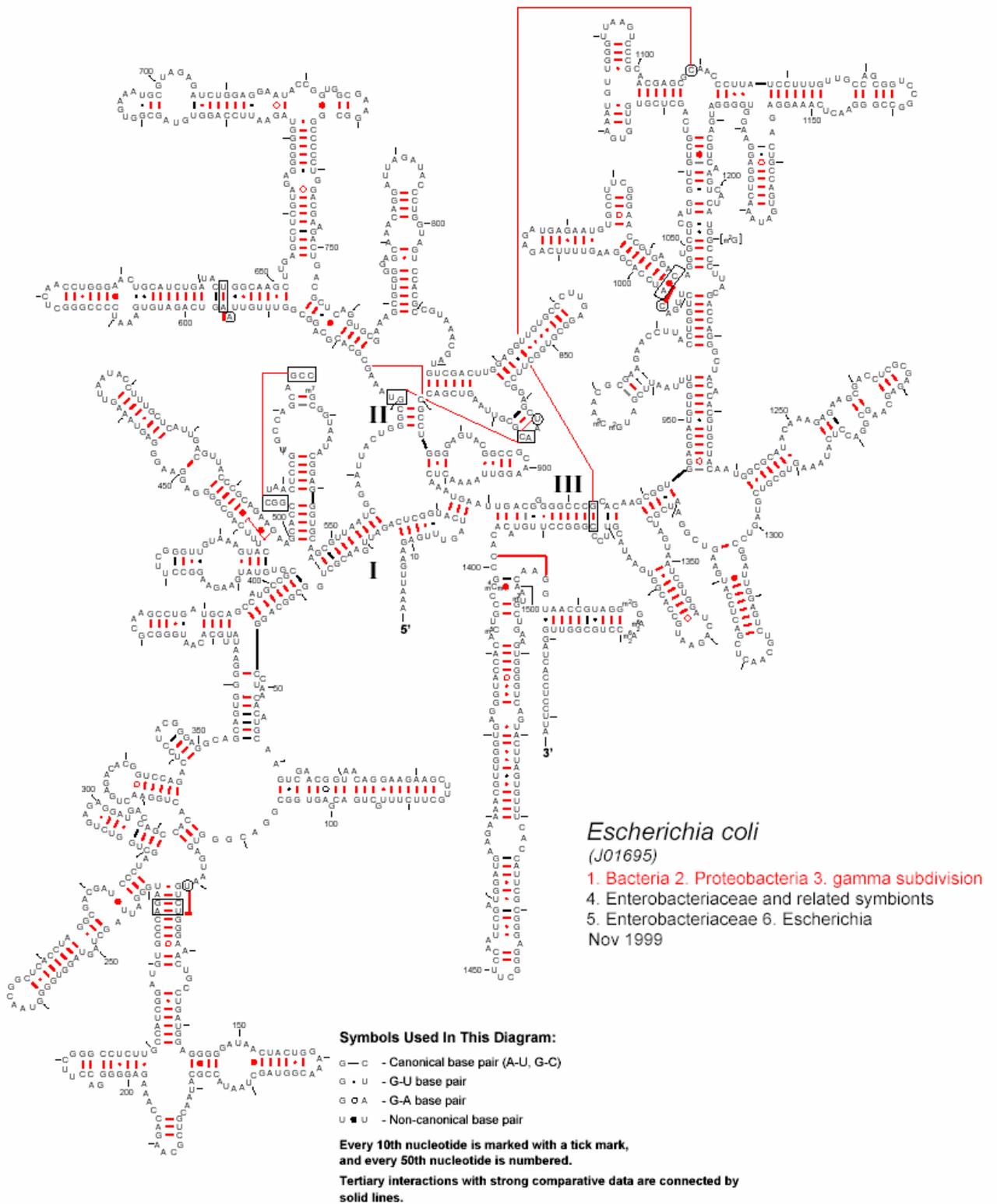
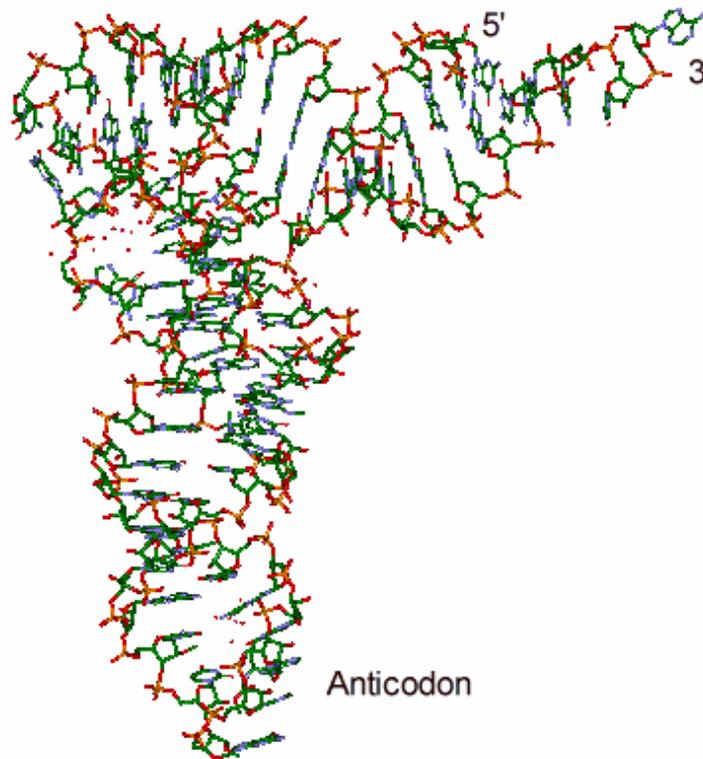


Figure 2 : Structure tertiaire des ARNt,
d'après http://ir2lcb.cnrs-mrs.fr/~acedb/tutorial/Intro_bio_mol.html.

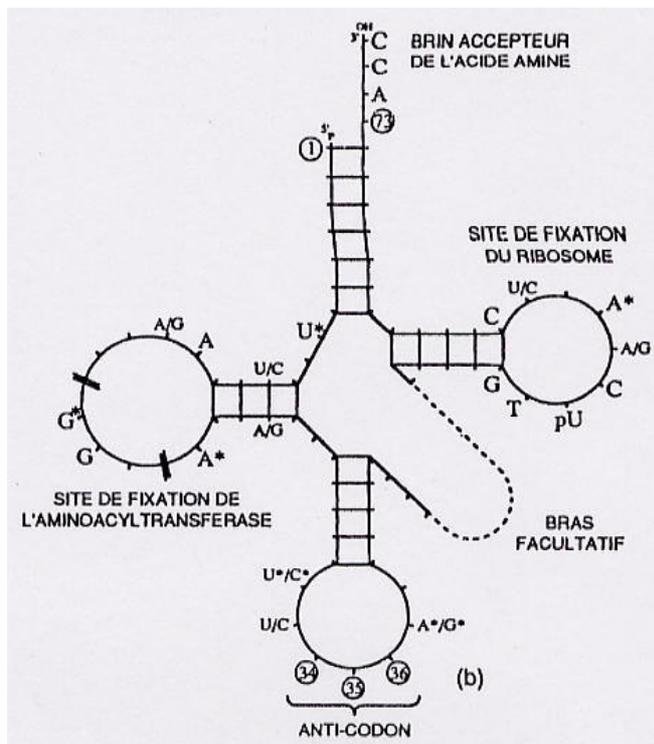


I.1.2 - Les ARN de transfert (ARNt).

Les ARNt jouent un rôle capital dans la synthèse des protéines. Ce sont de petits ARN très spécifiques par leurs structures secondaires et tertiaires, capables de jouer le rôle de vecteur. Ils transportent l'acide aminé à la place appropriée, définie par la séquence de l'ARNm. Ils sont transcrits à partir de gènes spécifiques, existant dans le génome en plusieurs exemplaires. Les ARNt présentent la structure primaire classique des ARN, avec quelques spécificités, notamment la présence de nucléotides inhabituels par les bases qu'ils renferment (hypoxanthine ou base méthylée) et une structure spatiale caractéristique, en forme de trèfle (Figure 3, p. 18). Celle-ci est due à la coexistence de zones d'appariement, selon les règles normales de complémentarité, ainsi que de zones appelées "boucles sans appariement", où sont retrouvées les bases inhabituelles. Une boucle contient l'anticodon, formé de trois nucléotides complémentaires du codon correspondant de l'ARNm ; une autre permet la liaison avec le ribosome et la dernière permet la liaison avec une enzyme activatrice : l'aminoacyl-ARNt transférase. L'extrémité 5' des ARNt comporte un groupement phosphate, alors que l'extrémité 3' possède un groupement hydroxyle, avec trois nucléotides caractéristiques (-C-C-A-3'-OH).

Il faut noter que c'est par cette extrémité que sera fixé l'acide aminé véhiculé par l'ARNt. Cette activation, c'est-à-dire la fixation de l'acide aminé, nécessite de l'énergie, sous forme d'ATP (Lee *et al.*, 1996).

Figure 3 : Structure d'un ARNt



Cette structure d'un ARNt montre les différentes zones fonctionnelles ; les nucléotides représentés sont des séquences consensus communes à la plupart des ARNt. A*, G*, U* et C* sont des nucléotides dont les bases sont fréquemment modifiées ; pU est la pseudouridine ; les doubles traits sur la boucle, correspondant au site de fixation de l'amino-acyl-transférase, indiquent qu'il peut y avoir des

I.1.3 - Les ARN messagers (ARNm).

Les ARNm constituent le support essentiel de l'information génétique entre l'ADN et le ribosome où s'effectuera la synthèse protéique. Les ARNm des procaryotes comportent une zone impliquée dans la liaison avec le ribosome, appelée séquence de Shine-Dalgarno. Constituée de 6 à 8 nucléotides (plutôt puriques), elle est située juste avant le codon d'initiation de la traduction : AUG ; une séquence consensus a été établie à ce niveau ; elle est constituée des six nucléotides suivants : AGGAGG (Guiraud, 1993).

I.1.4 - Les petits ARN ("small RNA").

Par ailleurs, ont été décrits chez les procaryotes, comme chez les eucaryotes, de petits ARN non codants ("small RNA" ou RNAs), d'une longueur de 50 à 700 nucléotides. Une cinquantaine de ces petits ARN a été retrouvée, à ce jour, chez *E. coli* (Massé *et al.*, 2003). Leurs fonctions demeurent le plus souvent inconnues, même si de nouveaux éléments semblent plaider pour un rôle important dans la régulation de la transcription et de la traduction.

I.2 - Spécificité des ARNm bactériens.

Contrairement aux eucaryotes, chez lesquels l'ARNm, synthétisé dans le noyau, doit franchir la membrane nucléaire pour être traduit en protéine, chez les procaryotes, l'ARNm transcrit à partir de l'ADN est directement accessible à la machinerie de synthèse protéique, c'est-à-dire aux ribosomes (**Tableau I**).

Tableau I : Comparaison des caractéristiques des ARN, chez les procaryotes et les eucaryotes.

	ARN des eucaryotes	ARN des procaryotes
--	--------------------	---------------------

Nombre de gènes	monocistronique	polycistronique
Présence d'introns et d'exons	oui	non
Présence d'une séquence Shine-Dalgarno	non	oui
Codon Start d'initiation	AUG	AUG ou GUG
Présence d'une coiffe	oui	non
Poly-adénylation	importante	faible
ARNt	non formylés	formylés

Chez les bactéries, de nombreux gènes situés sur des opérons sont transcrits simultanément, en un seul ARNm polycistronique, généralement de courte demi-vie.

En revanche, chez les eucaryotes, les ARNm doivent subir différents phénomènes de maturation avant d'être traduits : épissage, capping et poly-adénylation, et ils présentent donc généralement une demi-vie relativement longue.

Pendant longtemps, ces phénomènes, et notamment la poly-adénylation, ont été considérés comme spécifiques des ARNm eucaryotes et, bien qu'une poly(A)-polymérase ait été décrite, en 1962, chez *E. coli*, il a fallu attendre le milieu des années 70 pour que soient mis en évidence des ARNm présentant une queue polyA, chez les bactéries. Depuis, de nombreuses études ont été réalisées, confirmant l'existence d'une poly-adénylation sur différents ARNm bactériens (Sarkar, 1997).

Le consensus qui se dégage de ces différentes études est le suivant :

- les queues polyA, chez les procaryotes, sont beaucoup plus courtes (14 à 60 nucléotides vs 80 à 200 chez les eucaryotes) ;
- elles sont aussi beaucoup plus rares, ne concernant qu'une petite fraction des ARNm bactériens.

Suivant les études, il est rapporté que 1 à 40% des ARNm bactériens seraient poly-adénylés, alors que cette poly-adénylation est quasiment constante pour les ARNm eucaryotes. Une étude récente a retrouvé, chez *E. coli*, une proportion d'environ 10% d'ARNm poly-adénylés du gène *rpoS* codant pour la protéine ribosomale S15. Cependant, les queues polyA étaient très courtes et ne comportaient que un à quatre résidus A (Le Derout *et al.*, 2003).

Chez les bactéries, l'enzyme responsable de la poly-adénylation est donc une poly(A)-polymérase qui catalyse l'addition séquentielle de résidus adénylate à l'extrémité 3'-OH des

molécules d'ARN. Une protéine de liaison à l'ARN, dénommée Hfq, joue un rôle essentiel de cofacteur dans la poly-adénylation, bien que son rôle ne soit pas définitivement éclairci. En se fixant au niveau des régions polyA, elle pourrait empêcher l'attaque par des ribonucléases (Hajnsdorf et Régnier, 2000). Il a été démontré que l'inactivation du gène *hfq* réduit la taille des queues polyA, à l'extrémité de l'ARNm *rpoS*.

Contrairement aux eucaryotes, chez lesquels la poly-adénylation survient après un signal spécifique : la séquence AAUAAA, l'addition de queue polyA par la poly(A)-polymérase des bactéries semble se faire sans spécificité de séquence (Steege, 2000).

Chez les eucaryotes, malgré des années d'études, le rôle de la poly-adénylation demeure mal compris. De même, chez les procaryotes, sa fonction n'est pas encore bien déterminée. Toutefois, chez les bactéries, il semble que cette queue polyA déstabilise les ARNm, peut-être en constituant un site de fixation pour les exonucléases, enzymes de dégradation de l'ARNm. Elle joue aussi un rôle dans la répllication plasmidique et pourrait intervenir dans la traduction (Xu *et al.*, 2002).

I.3 - Synthèse des ARNm :

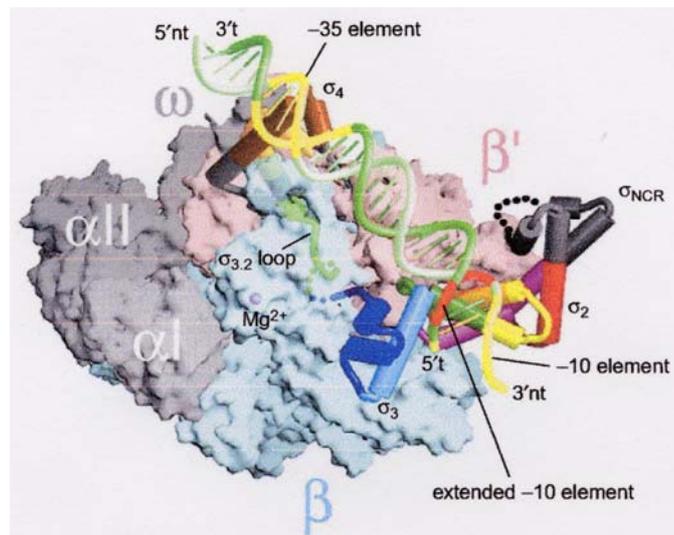
I.3.1 - Fonctionnement de l'ARN-polymérase :

A la différence des eucaryotes qui possèdent plusieurs ARN-polymérases (ARN-polymérases I, II et III) de fonctions différentes (Hartl et Jones, 2003), les procaryotes ne possèdent qu'une seule ARN-polymérase, formée de cinq sous-unités : $\alpha_2\beta\beta'\omega$.

I.3.1.1 - Structure de l'ARN-polymérase.

L'enzyme la mieux connue est celle de *E. coli*. La sous-unité α , sous forme de dimère, de 40 kDa, est codée par le gène *rpoA* (329 acides aminés) ; les sous-unités $\beta\beta'$, de 155 et 165 kDa, codées par les gènes *rpoB* et *rpoC* respectivement (1342 acides aminés pour β et 1407 pour β'), constituent le site catalytique. La petite sous-unité : ω , codée par le gène *rpoZ*, de 91 acides aminés, positionnée en région C-terminale de β' , stabiliserait l'assemblage $\alpha_2\beta$ (Severinov, 2000). Pour la plupart des espèces, la structure semble sinon identique, du moins similaire (Murakami et Darst, 2003, Borukhov et Severinov, 2002) (**Figure 4**).

Figure 4 : Structure du complexe ARN-polymérase et double hélice d'ADN, d'après Murakami et Darst (2003).



Les composants du core de cette holo-enzyme figurent à la surface moléculaire avec les sous-unités αI , αII et ω , de couleur grise, la sous-unité β , de couleur bleue et la sous-unité β' , de couleur rose. Le facteur σ est représenté avec ses hélices α , sous forme de cylindres. La structure en double hélice de l'ADN est représentée en vert foncé pour le brin cible, exceptées les régions promotrices -35 et -10, qui figurent en jaune.

I.3.1.2 - Un co-facteur : le facteur σ .

La sous-unité σ ou facteur σ , codée par le gène *rpoD*, s'associe au core $\alpha_2\beta\beta'\omega$, pour former l'holo-enzyme. Son poids moléculaire varie d'une espèce à l'autre (Guiraud, 1993). Cette sous-unité possède des caractéristiques importantes pour la reconnaissance des promoteurs et l'initiation de la transcription.

Différents facteurs σ peuvent être synthétisés par une même bactérie (*E. coli* en compte 7) et être exprimés de manière alternative, pour s'adapter aux changements environnementaux (Ishihama, 2000). Toutefois, chez *E. coli*, c'est la sous-unité σ^{70} qui est responsable de l'essentiel de l'activité transcriptionnelle.

Il existe deux familles de facteurs σ : les membres de la première participent à l'élaboration d'une holo-enzyme "DNA-dépendent RNA-polymerase" qui reconnaît les promoteurs, avec formation de complexes transcriptionnels compétents, en l'absence d'autres facteurs ou de sources d'énergie (exemple de σ^{70}) ; la seconde famille, à l'inverse, nécessite d'autres facteurs ou sources d'énergie, telles que des molécules d'ATP (exemple de σ^{54}) (Borukhov et Nudler, 2003).

Le facteur σ^{70} , composé de 613 acides aminés, partage 4 régions conservées ($\sigma 1$, $\sigma 2$, $\sigma 3$, $\sigma 4$) avec les autres facteurs σ (Paget et Helmann, 2003). Ce facteur est responsable de la reconnaissance des éléments -35 et -10 du promoteur bactérien (cf. I.3.2).

Un motif hélice-tour-hélice, situé dans la région 4, interagit avec la séquence -35, tandis qu'une hélice simple α , dans le deuxième domaine, interagit avec la Pribnow box (Busby et Ebright, 1994).

I.3.2 - Structure générale des promoteurs bactériens.

De nombreuses études ont été conduites sur la structure générale des promoteurs bactériens. La majorité a été réalisée chez *E. coli*, en raison des connaissances étendues acquises sur cette bactérie et de sa facilité de manipulation (Hawley et McClure, 1983, Harley et Reynolds, 1987). Toutefois, des études similaires ont été réalisées chez d'autres bactéries, telles que *P. aeruginosa*, aboutissant à des résultats comparables (McLean *et al.*, 1997).

Chez les procaryotes, pour qu'un gène soit transcrit, l'ARN-polymérase doit se fixer au niveau du promoteur bactérien, pour permettre la synthèse de l'ARNm correspondant. La vitesse de la première étape de la transcription (fixation de l'ARN-polymérase au promoteur) est fortement influencée par la séquence des hexamères en positions -35 et -10 (Mooney *et al.*, 1998). En effet, l'analyse de nombreux promoteurs de *E. coli* a permis d'identifier deux séquences dites consensus : la région -35 et la région -10 encore appelée Pribnow box (Hawley et McClure, 1983). La séquence consensus -35 est TTGACA et la séquence -10 est TATAAT. Les deux premières bases et la dernière base de la Pribnow box sont très conservées, les trois autres bases de l'hexanucléotide présentent plus fréquemment des variations (Mitchell *et al.*, 2003). Dans la région -35, ce sont les trois premières bases qui sont le plus conservées, les trois dernières présentant un plus grand degré de variabilité. La distance entre les séquences -35 et -10 varie de 15 à 21 paires de bases, mais elle est le plus fréquemment de 16 à 18 paires de bases, la distance optimale étant de 17 paires de bases (Beutel et Record, 1990). Pour la plupart des promoteurs, il existe une bonne corrélation entre la force de celui-ci et le degré d'homologie avec les séquences consensus.

Certains promoteurs bactériens semblent présenter une autre structure, dite box -10 étendue. Il s'agit d'un dinucléotide (5'-TG-3') qui serait retrouvé en positions -15 et -14 chez 20% des promoteurs de *E. coli* ; cette box -10 étendue pourrait jouer un rôle dans la fixation de la sous-unité σ (Mitchell *et al.*, 2003).

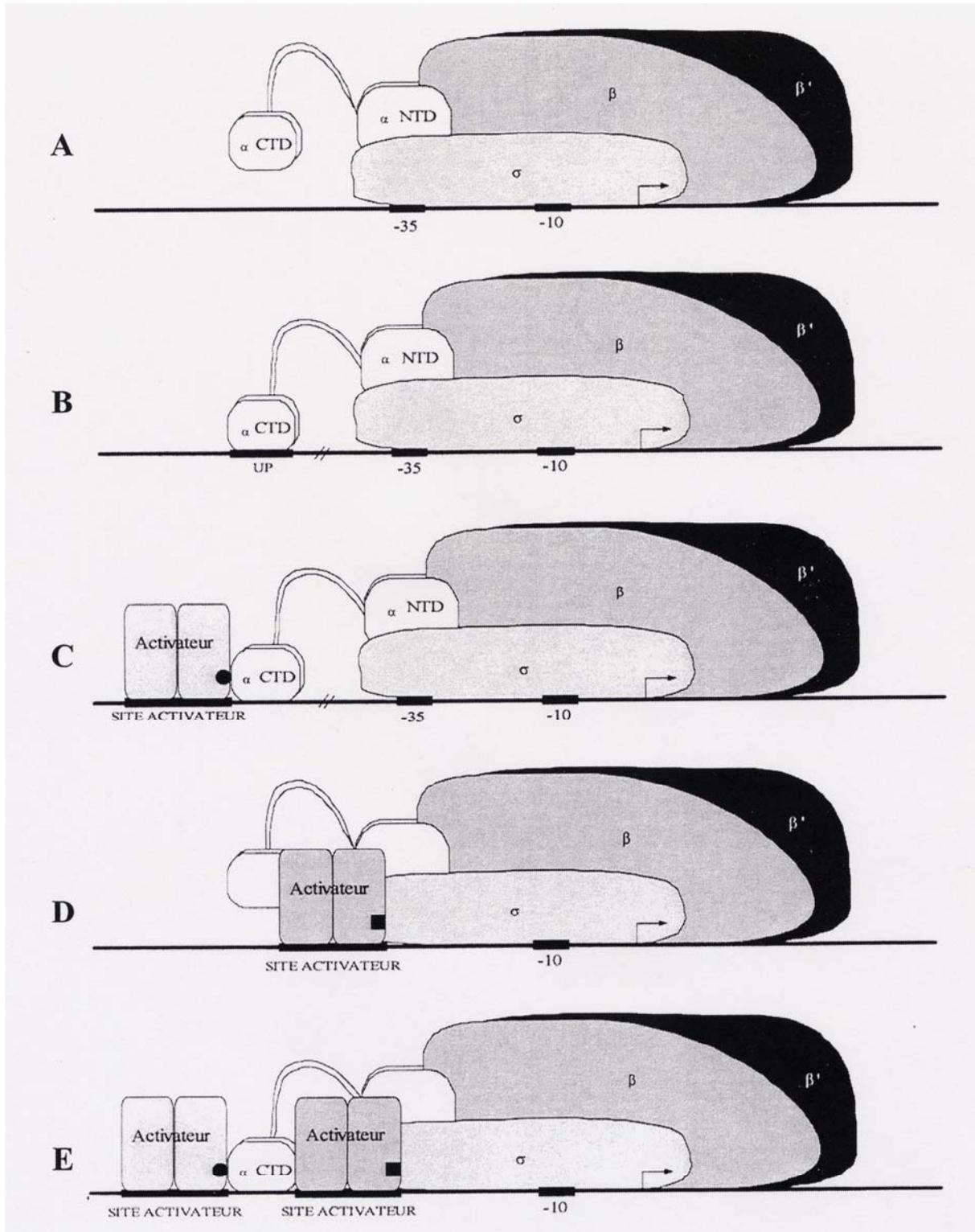
Récemment, il a également été établi qu'un troisième élément, dénommé "UP element", pouvait augmenter la force de certains promoteurs. Il est retrouvé sur les promoteurs des gènes *rrn* codant pour les ARN ribosomiaux qui sont très fortement transcrits : il s'agit d'une séquence riche en AT, d'environ 20 paires de bases, localisée juste en amont de la séquence consensus -35 (Busby et Ebright, 1994). Cet élément stimule la transcription, à partir du promoteur P1 du gène *rrnB*, grâce à une interaction directe avec la partie C-terminale de la sous-unité α de l'ARN-polymérase (Meng *et al.*, 2001, Chen *et al.*, 2003).

Les interactions promoteur-ARN-polymérase sont schématisées dans la **Figure 5**, p. 24.

Par ailleurs, pour certains promoteurs, les sous-unités α et σ^{70} sont aussi des sites de fixation de protéines transactivatrices (Busby et Ebright, 1994). L'activateur transcriptionnel le mieux caractérisé, qui interagit avec la sous-unité α de l'ARN-polymérase, est la protéine CAP (Catabolite Activator Protein), capable d'activer la transcription des gènes soumis à répression catabolique, en se fixant à l'ADN. Il semble que l'activation nécessite un contact direct protéine-

protéine, entre la sous-unité α de l'ARN-polymérase et la protéine CAP. Cette interaction facilite la liaison et la fixation de l'ARN-polymérase au promoteur de la séquence d'ADN, en formant un complexe fermé, avant son isomérisation pour entraîner l'ouverture du complexe (Busby et Ebright, 1999).

Figure 5 : Interactions promoteurs et ARN-polymérase, d'après Busby et Ebright (1994).



αCTD : extrémité C-terminale de la sous-unité α de l'ARN-polymérase.

αNTD : extrémité N-terminale de la sous-unité α de l'ARN-polymérase.

A : promoteur simple.

B : promoteur comportant un "UP élément".

C : intervention d'un activateur transcriptionnel interagissant avec la sous-unité α.

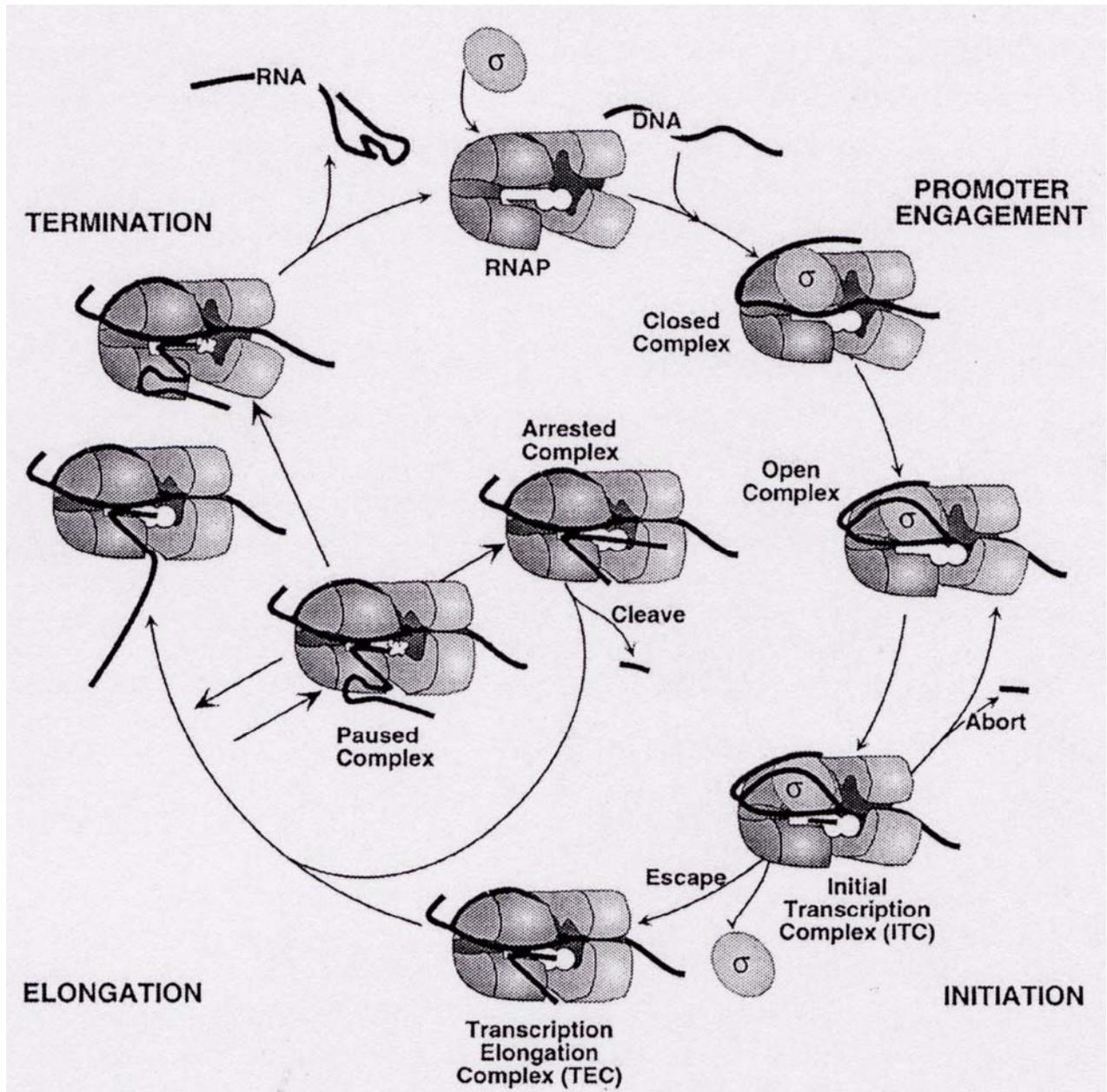
D : intervention d'un activateur transcriptionnel interagissant avec la sous-unité σ.

E : synergie d'action entre deux activateurs transcriptionnels.

I.3.3 - Les différentes étapes de la transcription chez les procaryotes :

La transcription chez les procaryotes constitue un cycle de 4 grandes phases, durant lesquelles interviennent de nombreuses interactions entre l'ARN-polymérase holo-enzyme et les promoteurs bactériens. Après fixation de l'ARN-polymérase sur le promoteur, il y a initiation de la transcription, puis élongation (progression de ce complexe le long de la matrice d'ADN), avant l'ultime étape de terminaison, au niveau de certains sites préférentiels (Figure 6).

Figure 6 : Les différentes étapes de la transcription chez les procaryotes, d'après Mooney *et al.* (1998).



I.3.3.1 - Initiation de la transcription.

La reconnaissance du site en position -35, par la sous-unité σ (région conservée $\sigma 4$) de l'holo-enzyme ARN-polymérase, entraîne l'ouverture de la double hélice, au niveau du site en position -10 et la transcription peut débuter à partir du nucléotide +1 (initiation de la transcription). La position de la séquence promotrice détermine à quel endroit commence la synthèse ; la force de la liaison de l'ARN-polymérase avec les promoteurs varie, expliquant les possibles variations quantitatives d'expression. Le premier nucléotide est en général un nucléotide purique. La fixation de l'ARN-polymérase s'effectue à la suite de la reconnaissance du site par le facteur σ qui sert de fixateur spécifique et réutilisable (Borukhov et Severinov, 2002). Le premier nucléotide de l'ARNm reste sous forme triphosphate et les autres se fixent en 3' du ribose (Guiraud, 1993). Seul un des deux brins d'ADN est utilisé comme matrice, lors de la transcription. Comme l'ARN est synthétisé dans la direction 5'→3', la matrice d'ADN est parcourue dans la direction 3'→5'. Ainsi, par référence à la synthèse des protéines, on appelle le brin codant de l'ADN (sens 5'→3'), le brin non transcrit, tandis que le brin transcrit est dit non codant (sens 3'→5') (Hartl et Jones, 2003).

L'initiation représente donc la formation des premières liaisons nucléotidiques de l'ARN. L'enzyme reste fixée au promoteur pendant la synthèse des 9 premières liaisons nucléotidiques, environ. Récemment, Murakami *et al.* ont rapporté les bases structurales de l'initiation de la transcription, avec la formation du complexe ARN-polymérase/ADN cible (Murakami *et al.*, 2002). Après reconnaissance des sites *via* le facteur σ , il y a formation d'un complexe dit "ouvert", par séparation des deux brins d'ADN sur environ 12 à 15 paires de bases, entre le milieu de la box -10 et les bases situées après le site d'initiation de la transcription (de Haseth *et al.*, 1998). La formation de ce complexe ouvert peut être accompagnée de modifications structurales de l'ARN-polymérase. Il semble que des changements de conformation de l'ADN se produisent, celui-ci se courbant et enveloppant l'ARN-polymérase (Coulombe et Burton, 1999).

I.3.3.2 - Elongation.

Lors de la phase d'élongation, l'enzyme migre le long de l'ADN dont la double hélice se défait et se reforme au fur et à mesure. Les nucléotides sont ajoutés par des liaisons covalentes, à l'extrémité 3' de la chaîne naissante, formant un hybride ADN-ARN dans la région déroulée (Lewin, 1997). La vitesse moyenne d'élongation de l'ARN est de 30 à 60 nucléotides par seconde (Guiraud, 1993). Une modulation de la vitesse d'élongation est liée à la structure de l'ADN ; il existe des sites de ralentissement ou de pause, généralement riches en GC. L'élongation est sous contrôle d'une protéine (NusA) qui est susceptible de s'associer à l'ARN-polymérase ou de s'en dissocier rapidement après déplacement du facteur σ : cette protéine favorise le ralentissement en certains sites et elle est également impliquée dans certains processus de terminaison (Mah *et al.*, 2000).

I.3.3.3 - Terminaison.

La fin de la transcription, ou terminaison, correspond à la reconnaissance de l'endroit à partir duquel aucune base supplémentaire ne doit être ajoutée à la chaîne d'ARN. Pour que la transcription prenne fin, la formation de liaisons phosphodiester doit cesser et le

complexe de transcription doit se détacher. Ainsi, à la fin de ce processus de synthèse, quand l'ARN-polymérase rencontre un signal de terminaison, elle arrête l'addition de nouveaux nucléotides, sépare l'hybride ADN-ARN et libère le transcrit nouvellement synthétisé. La séquence d'ADN nécessaire au déclenchement de ces réactions s'appelle le terminateur. Il existe plusieurs types de signaux de terminaison (Hartl et Jones, 2003) :

- L'autoterminaison est le cas le plus habituel, le noyau de l'enzyme pouvant assurer la terminaison au niveau de sites terminateurs, en l'absence de tout autre facteur. Classiquement, cela résulte de la présence d'une structure en épingle à cheveux, associée avec une séquence poly-U. La boucle est formée par l'appariement de séquences répétées inversées qui forment la tige, séparées par une courte séquence qui forme la boucle elle-même. La longueur de cette boucle en épingles à cheveux est variable et elle contient en général une région riche en GC, près de la base de la tige.
- L'autre mécanisme de terminaison fait intervenir une protéine hexamérique : ρ (rho) qui aide à la reconnaissance du site (Richardson, 2003). Les séquences nécessaires à la terminaison rho-dépendante sont constituées de 50 à 90 bases et se trouvent en amont du terminateur. La caractéristique commune à ces séquences est d'être riches en résidus C et pauvres en G. La règle générale est que l'efficacité d'un terminateur rho-dépendant augmente avec la longueur de la région riche en C et pauvre en G (Lewin, 1997).

I.4 - Dégradation des ARNm :

I.4.1 - Demi-vie des ARNm.

Les ARNm bactériens sont caractérisés par une demi-vie courte, allant de quelques secondes à quelques minutes, suivant les opérons (Selinger *et al.*, 2003). Chez les procaryotes, les ARNm sont dégradés en quelques minutes, à l'inverse des autres molécules d'ARN (Deutscher, 2003, Carpousis *et al.*, 1999). Cette dégradation permet à la machinerie cellulaire de disposer de substrats qui ne sont plus utiles, par un recyclage des nucléotides. Cette courte durée de vie est un élément essentiel de la régulation de l'expression des gènes (Deutscher, 2003). Cette instabilité constitue une propriété importante pour la bactérie. Elle se révèle d'un intérêt stratégique pour répondre rapidement à des modifications des paramètres environnementaux, par reprogrammation des profils de synthèse des protéines, dans le cadre la régulation génétique (Carpoussis, 2002).

La demi-vie des ARN semble donc liée à leur fonction. Ainsi, parmi les ARN de demi-vie très courte (< 5 minutes), on trouve beaucoup de gènes codant pour des enzymes. Au contraire, les gènes codant pour des protéines impliquées dans la machinerie traductionnelle produiraient des transcrits de demi-vie plus longue, en rapport avec la stabilité connue de ces mécanismes de traduction (Grunberg-Manago, 1999).

I.4.2 - Le dégradosome.

L'existence et l'implication, dans la dégradation des ARNm, d'un complexe plurimoléculaire de haut poids moléculaire, appelé dégradosome, ont été démontrées biochimiquement (Grunberg-Manago, 1999). Toutefois, l'exploration de la coopération entre tous les constituants du dégradosome et leurs régulations nécessite encore de nouvelles études (Carpoussis *et al.*, 1999).

Les composants majeurs du dégradosome sont l'endoribonucléase (RNase E) et la polynucléotide phosphorylase (PNPase). Ils sont associés à d'autres enzymes : la DEAD RNA hélicase B (RhlB) (DEAD correspondant à un motif conservé en acides aminés : Asp-Glu-Ala-Asp, trouvé chez cette famille de protéines), une émolase (enzyme glycolytique), une polyphosphate kinase (PPK) et d'autres protéines. Ainsi, chez *E. coli*, des interactions avec une poly(A)-polymérase et la protéine ribosomale S1 ont été décrites. Toutefois, le rôle et les interactions de tous ces éléments restent encore à clarifier (Carpoussis *et al.*, 2002).

L'endoribonucléase (RNase E).

Cette enzyme de 1061 acides aminés, codée par le gène *rne*, serait une des enzymes clés de l'initiation de la dégradation des ARNm.

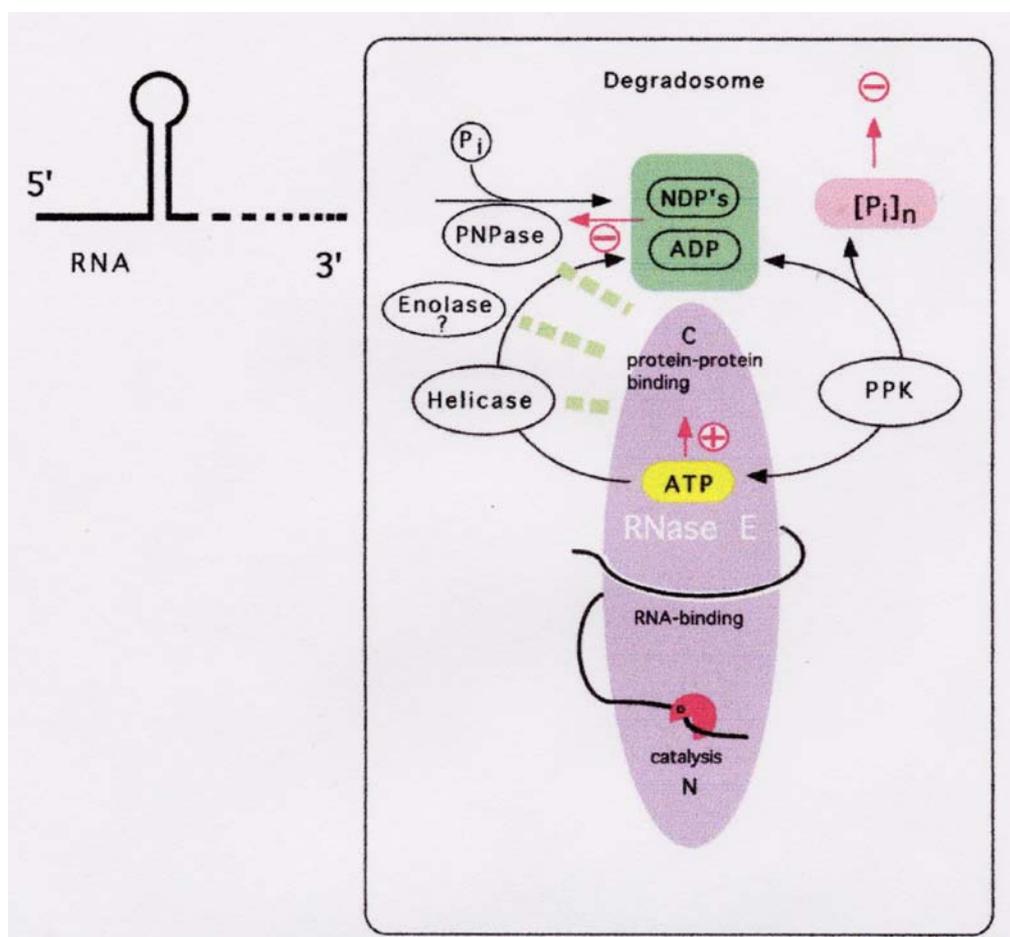
Cette RNase présente un poids moléculaire de 118 kDa. L'extrémité N-terminale de cette protéine constitue le centre catalytique ; sa séquence présente une forte homologie avec le gène codant pour la protéine CafA de *E. coli* (Cytoplasmic Axial Filament Protein) et un domaine de la protéine ribosomale S1. Le gène *rne* subit une autorégulation négative, puisque sa propre synthèse réprime la concentration de transcrits, par une augmentation de sa dégradation.

Sa purification a permis la mise en évidence d'un complexe avec la polynucléotide phosphorylase (PNPase) et d'autres protéines de fonction non encore connue. Cette endonucléase développe son activité hydrolytique à partir de l'extrémité 5' de l'ARN et l'initiation du clivage est beaucoup plus rapide avec une extrémité 5' monophosphate (Carpoussis, 2002). Suite à l'action de cette endoribonucléase, le dégradosome engage de nouvelles enzymes, de manière concomitante, notamment des exoribonucléases, telles que la PNPase.

La polynucléotide phosphorylase (PNPase).

La polynucléotide phosphorylase est généralement décrite sous forme d'homotrimère de 78 kDa. Cette enzyme, codée par le gène *pnp*, est l'une des deux principales exonucléases qui agissent dans le sens 3'→5', après l'initiation de la dégradation, lors de l'intervention en 5' de la RNase E au sein du dégradosome (Figure 7, p.30). La PNPase est une exonucléase processive, phosphate-dépendante, avec également une activité de poly-adénylation (Rauhut et Klug, 1999). L'expression de cette enzyme est auto-contrôlée négativement par ses transcrits, sous l'influence de la RNase E (Grunberg-Manago, 1999).

Figure 7 : Schéma du dégradosome, d'après Rauhut et Klug (1999).



Les réserves de phosphate dans le micro-environnement sont représentées par l'ortho-phosphate (P_i), les poly-phosphates ($[P_i]_n$), les mono-nucléotides di-phosphates (NDP) et l'ATP. Les stimulations ou inhibitions de la dégradation des ARNm sont indiquées par les signes + et -. Les NDP inhibent la poly-nucléotide phosphorylase (PNPase), tandis que les (P_i)_n inhibent probablement l'hélicase.

La polyphosphate kinase (PKK).

La polyphosphate kinase est une des enzymes les plus récemment identifiées. De structure homotétramérique (80 kDa), cette enzyme catalyse la conversion réversible de polyphosphates en ADP ou ATP. En effet, les polyphosphates pourraient avoir un fort effet inhibiteur sur la dégradation des ARN (Rauhut et Klug, 1999). Cette PKK, très présente chez *E. coli*, interagit également avec la RNase E, lors de la dégradation des ARNm.

L'hélicase ATP dépendante DEAD box.

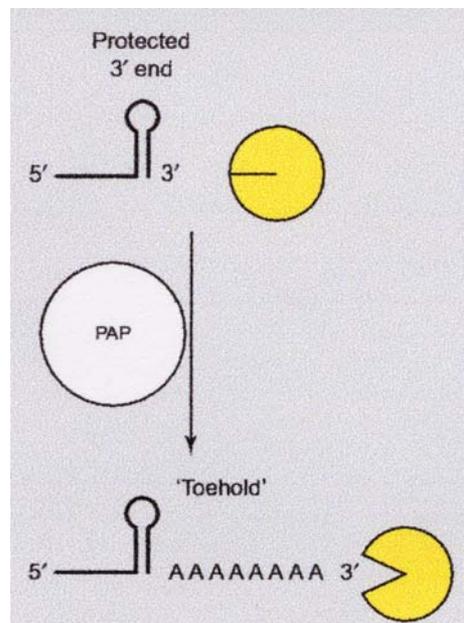
Cette enzyme possède un motif conservé, dit DEAD box, pour Asp-Glu-Ala-Asp. Elle est codée par le gène *rhlB*. Son rôle est de dérouler les hélices des duplexes d'acides nucléiques (Rauhut et Klug, 1999).

Au sein du dégradosome, l'hélicase facilite la dégradation liée à l'action de la PNPase, au cours de réactions nécessitant des molécules d'ATP, lors du déroulement des structures en épingle à cheveux (Carpousis, 2002). Cette enzyme est fortement activée par des interactions avec l'extrémité C-terminale de la RNase E.

I.4.3 - Rôle de la poly-adénylation dans la dégradation des ARNm.

Contrairement aux eucaryotes, chez lesquels l'existence d'une queue polyA semble jouer un rôle stabilisateur, chez les bactéries, de nombreuses données expérimentales montrent que la poly-adénylation stimulerait la dégradation des ARN, en favorisant la dégradation par les exonucléases. Chez les souches polyA déficientes, l'ARN semble stabilisé. En effet, l'extrémité 3' des ARN peut présenter des structures secondaires. L'action de la PNPase ne peut débuter que lors de la fixation à un simple brin. La poly-adénylation de l'extrémité 3' entraîne donc la création d'un site de fixation des exonucléases (Carpousis *et al.*, 1999) (Figure 8).

Figure 8 : Rôle de la poly-adénylation dans la dégradation des ARN, d'après Carpousis *et al.* (1999).

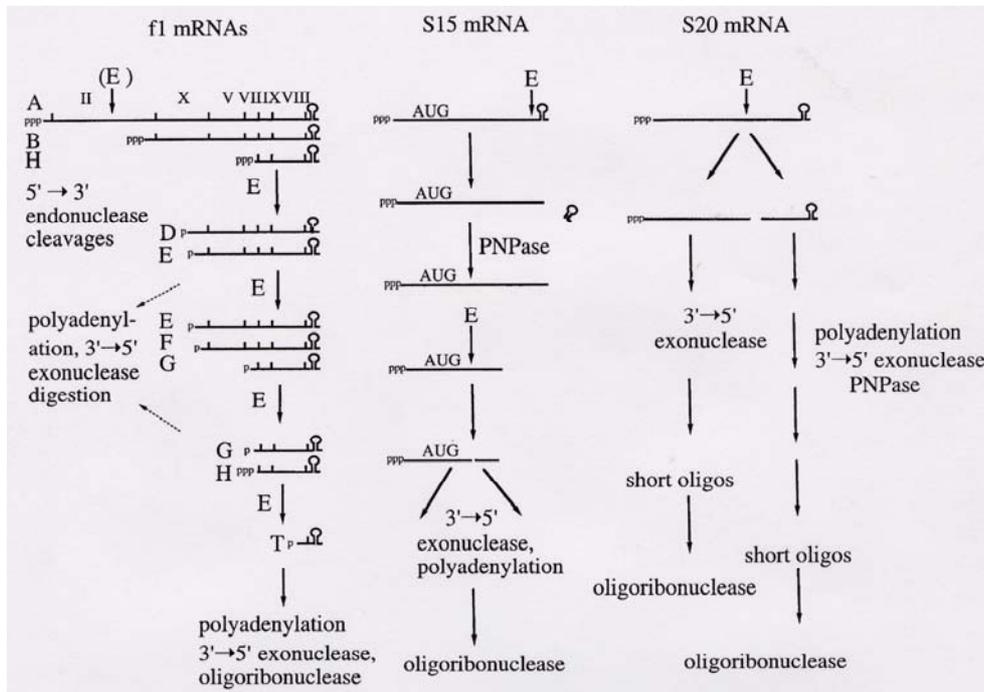


L'exonucléase (couleur jaune) ne peut pas attaquer l'extrémité 3' qui forme une structure double brin. La poly(A)-polymérase ajoute une queue poly(A) formant un site de fixation pour l'exonucléase.

I.4.4 - Différentes voies de dégradation.

Il semble clair qu'il existe différentes voies de dégradation des transcrits par le dégradosome et que celles-ci dépendent essentiellement du site initial de clivage par l'endonucléase. Des exemples de l'action séquentielle des différentes enzymes impliquées sont représentés sur la Figure 9. La voie la plus fréquente de dégradation serait celle décrite pour le phage f1, avec un clivage par la RNase E, dans la région 5'.

Figure 9 : Les différentes voies de dégradation des ARNm, d'après Steege (2000).



Voies établies dans la dégradation des ARNm f1 (Goodrich et Steege, 1999), des ARN des protéines ribosomales S15 (Hajnsdorf et Régnier, 1999) et S20 (Coburn *et al.*, 1999).

I.5 - Régulation transcriptionnelle :

Chez les procaryotes, l'activation ou l'extinction d'un gène est le plus souvent contrôlée lors de la transcription. Quand les conditions environnementales changent, certains gènes doivent être transcrits davantage et d'autres réprimés. La machinerie cellulaire met alors en jeu des interactions protéines-ADN entre des facteurs transcriptionnels (protéines trans-régulatrices) et leur cible sur l'ADN (région cis-régulatrice), en amont des promoteurs. Certaines protéines sont très spécifiques et régulent l'expression d'un seul gène, mais il existe aussi des facteurs transcriptionnels capables de réguler des opérons appartenant à différentes voies métaboliques. Ainsi, 7 protéines régulatrices majeures sont capables de moduler l'expression de 51% des gènes de *E. coli* (Martinez-Antonio et Collado-Vides, 2003). Toutefois, ces facteurs transcriptionnels majeurs agissent presque toujours en synergie avec des protéines régulatrices plus spécifiques.

Cette régulation transcriptionnelle concerne les gènes impliqués dans le métabolisme de la bactérie, qui doivent répondre rapidement aux changements de conditions environnementales, mais aussi particulièrement les gènes de virulence, qui doivent s'exprimer lorsque la bactérie a atteint sa cible.

I.5.1 - Régulations positive et négative.

Le résultat de l'action d'un facteur transcriptionnel se manifeste soit par une induction, soit par une répression de la synthèse de l'enzyme : on parle de répresseur ou d'activateur transcriptionnel.

Dans un système sujet à une régulation négative, l'état par défaut est l'état induit : la transcription a lieu jusqu'à ce que le système soit réprimé. L'exemple le plus classique de régulation négative est celui de l'opéron lactose de *E. coli*.

Dans un système de régulation positive, l'état par défaut est l'état réprimé : la liaison entre l'ADN et une protéine de régulation est nécessaire pour permettre la transcription.

Ces deux types de régulation peuvent être présents sur un même système, afin de répondre aux diverses conditions rencontrées par la cellule.

1.5.2 - Exemple de l'activateur transcriptionnel CAP.

L'un des activateurs transcriptionnels les plus étudiés est la protéine CAP (catabolite activator protein), encore appelé CRP (cAMP receptor protein), connue pour activer au moins une centaine de promoteurs bactériens. Cette protéine agit, en présence d'AMPc, en se liant à des sites spécifiques de l'ADN, à l'intérieur ou à proximité des promoteurs bactériens, pour en stimuler la transcription.

La protéine CAP a une structure dimérique et un poids moléculaire de 45 kDa ; son extrémité N-terminale interagit avec l'AMPc et l'extrémité C-terminale se lie à l'ADN *via* un motif hélice-tour-hélice. Le site de fixation de CAP sur l'ADN est une séquence palindromique de 22 paires de bases (Busby et Ebright, 1999).

Les promoteurs sur lesquels agit l'activateur transcriptionnel CAP peuvent être regroupés en 3 classes :

- La première contient des promoteurs possédant un seul site de reconnaissance pour CAP et ne mettant pas en jeu d'autres activateurs transcriptionnels. Le modèle le plus étudié est celui de l'opéron lactose. Dans ce type de promoteur, le site CAP est centré sur l'ADN en position -93, -83, -72 ou -62.
- La seconde classe est représentée par des promoteurs contenant également un seul site CAP, mais chevauchant le site de fixation de l'ARN-polymérase, remplaçant la box -35. Le mieux caractérisé est le promoteur *galP1* de l'opéron galactose.
- La troisième classe renferme des promoteurs nécessitant l'activation par plusieurs facteurs transcriptionnels, soit plusieurs protéines CAP, soit l'action de CAP combinée à un régulateur spécifique de l'opéron.

1.5.3 - Rôle des séquences d'insertion.

Depuis les premières descriptions d'éléments mobiles d'ADN, l'étendue des phénomènes de transposition moléculaire rapportés ne cesse de s'accroître. Les éléments génétiques regroupés sous le terme de séquences d'insertion (IS) présentent une grande diversité et une distribution variable, chez les procaryotes (Mahillon et Chandler, 1998). Ces petits éléments mobiles contiennent un ou deux cadres de lecture ouverts (type ORF), codant pour l'activité transposase et portent, à leurs extrémités, des séquences inversées répétées de différentes longueurs, responsables du clivage de la séquence cible d'ADN et de la transposition (Mahillon et Chandler, 1998).

Le rôle de ces IS, dans les phénomènes de régulation de l'expression des gènes, a été rapporté à de nombreuses reprises, dans la littérature. Il a été souligné de nombreuses fois que l'interruption des promoteurs ou bien des gènes régulateurs, par ce type d'éléments, entraînait une augmentation de l'expression des gènes.

Dès 1983, Jaurin et Normark avaient rapporté la présence d'une séquence d'insertion IS2, en amont du gène *ampC* de *E. coli*, capable de multiplier par 20 la sécrétion de la céphalosporinase correspondante (Jaurin et Normark, 1983). Récemment, il a été montré que l'intégration de IS1301, en amont de l'opéron *ltx*, stimule la transcription de la leucotoxine chez *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Mitchell *et al.*, 2003). Des séquences d'insertion, telles que IS1, IS2 ou IS5, possèdent ainsi, dans leur région 3', un hexamère réalisant un nouveau promoteur, en fin de séquence. Quand cette IS est insérée, par transposition, à une distance adéquate de la box -10, un nouveau promoteur hybride peut ainsi être créé en amont du gène, avec une distance interboxes parfois optimale (Aubert *et al.*, 2003).

I.5.4 - Surenroulement de l'ADN.

La structure moléculaire en double hélice de l'ADN est soumise à des contraintes topologiques pouvant entraîner son enroulement. Cette configuration se superpose à l'enroulement naturel des deux brins de la double hélice et elle est donc couramment appelée surenroulement. Si la super-hélice tourne dans le même sens que la double hélice, le surenroulement est dit "positif" ; dans le cas contraire, le surenroulement est dit "négatif". Dans les deux cas, cela induit un stress pour la molécule.

A l'état physiologique, l'ADN présente un surenroulement négatif qui favorise les processus impliquant la séparation des brins, lors de l'initiation de la transcription et lors de la réplication (Lim *et al.*, 2003).

Ces phénomènes de surenroulement de l'ADN dans certaines régions du chromosome bactérien peuvent affecter la réalisation du complexe promoteur/ARN-polymérase (Pruss et Drlica., 1989).

Le surenroulement intervient dans le contrôle de l'expression des gènes par modifications de différentes étapes de la transcription : (i) l'ARN-polymérase et les protéines régulatrices pourraient préférer une liaison à l'ADN surenroulé ; (ii) la formation des complexes d'initiation de la transcription au niveau des régions promotrices est privilégiée, grâce au surenroulement négatif ; (iii) une pause de la transcription, lors de l'étape d'élongation, pourrait être favorisée par cette conformation de l'ADN ; (iv) le surenroulement pourrait affecter l'étape de terminaison de transcription (Lim *et al.*, 2003).

La diversité des effets du surenroulement de l'ADN fournit un mécanisme général de modifications de l'expression des gènes, qui peut rapidement et spécifiquement moduler la réponse à des modifications de l'environnement, telles qu'une transition de conditions aérobies à des conditions anaérobies ou des perturbations osmotiques (Sheridan *et al.*, 2001).

I.5.5 - Régulation de la transcription par l'ARN.

La transcription a été longtemps considérée comme quasi-exclusivement régulée par des protéines. Cependant, il semble établi, aujourd'hui, que des ARN peuvent aussi contrôler l'expression de certains gènes et, notamment, de gènes de virulence (Johansson et Cossart, 2003). L'exemple le plus étudié est le RNAIII de *Staphylococcus aureus*, d'une longueur de 512

nucléotides, qui contrôle le locus de virulence *agr*. Sa structure lui permettrait de former 14 "épingles à cheveux". Des domaines spécifiques contrôlent l'expression de différentes cibles. Ainsi, l'extrémité 3' agirait comme répresseur du gène *spa* codant pour la protéine A.

I.6 - Méthodes d'étude des ARNm :

I.6.1 - Techniques d'extraction des ARN totaux.

Différentes méthodes d'extraction des ARNm ont été rapportées dans la littérature. Elles impliquent de rompre les membranes, soit par une lyse mécanique (sonication) soit, le plus souvent, par une lyse enzymatique (avec parfois utilisation de lysozyme et de protéinase K). Cette lyse est généralement réalisée dans des conditions dénaturantes, les agents dénaturants étant, de plus, de puissants inhibiteurs de RNases (Sung *et al.*, 2003). La méthode de référence de Chirgwin utilise une combinaison d'isothiocyanate de guanidine, puissant agent de dénaturation des protéines, et de β -mercaptoéthanol qui rompt les ponts disulfures (Bastard *et al.*, 2002).

Une fois les cellules lysées, les acides nucléiques peuvent être extraits, soit sur gradient de chlorure de Césium, qui sépare les ADN, ARN et protéines, en fonction de leurs densités relatives, soit en fonction de leur solubilité différentielle dans les solvants organiques.

Les inconvénients de ces techniques sont nombreux : elles sont souvent complexes, onéreuses, consommatrices de temps et nécessitent l'utilisation de solvants ou produits toxiques (Rivas *et al.*, 2001). Les techniques plus récentes utilisent des différences d'absorption sur des supports solides, tels que des billes ou des colonnes.

Différentes sociétés ont développé des kits commerciaux d'extraction de ces ARN. Cette technologie est basée sur les propriétés de liaison sélective à une membrane de silicagel, avec une centrifugation rapide. Le kit Qiagen[®] (Qiagen S.A, Courtaboeuf, France) utilise un système de tampon très salé et une lyse (lysozyme) en présence d'un agent dénaturant inactivant les RNases (isothiocyanate de guanidine). L'éthanol ajouté fournit des conditions appropriées de liaison à la membrane permettant, par des lavages, l'élimination de contaminants. L'élution est réalisée avec de l'eau dépourvue de RNases. Une des conditions drastiques à respecter, pour une bonne utilisation de ces colonnes d'extraction, est la standardisation du matériel de départ. Il est classiquement recommandé de travailler avec des cultures bactériennes en phase exponentielle de croissance, présentant une mesure de densité optique à 600 nm de 0,25, afin d'éviter toute saturation des colonnes par un excès de matériel génomique.

Les préparations d'ARN obtenues à partir de cellules procaryotes, par ces différentes méthodes, sont riches en ARNr (> 70 %, 23S et 16S) et en ARNt (15 %). Ces ARN restent d'un intérêt mineur pour les applications de biologie moléculaire. Le pourcentage d'ARNm serait inférieur à 5%, dans ces préparations (Sung *et al.*, 2003).

Chez les eucaryotes, l'existence d'une queue polyA longue et quasi-constante permet d'extraire les ARNm poly-adénylés et non les ARN totaux, en les fixant, par complémentarité, sur des colonnes d'oligodT. Ceci n'est pas possible pour les ARN bactériens.

L'utilisation de ces coffrets est cependant aisée et permet une extraction, en une heure, après avoir standardisé les conditions de culture en phase exponentielle.

De plus, les données moléculaires récemment rapportées, sur la dégradation des ARNm, ont permis à l'industrie du bio-réactif de développer des kits spécifiquement dédiés à l'extraction des ARNm bactériens. L'incorporation d'une nouvelle étape de stabilisation des ARNm a facilité l'obtention de ces acides nucléiques instables.

Récemment, des modifications de protocoles, comme l'extraction au phénol chaud (Oh et So, 2003) ou bien le développement d'une technique simple associant la chaleur, le triton X-100 et l'extraction au chloroforme, ont été rapportés (Sung *et al.*, 2003). Ces deux méthodes réalisent l'extraction des ARNm aussi bien chez les bactéries à Gram positif que chez les bactéries à Gram négatif. De plus, la combinaison de la chaleur, qui entraîne la dégradation des ARNr, évite une étape ultérieure éventuelle de purification des acides nucléiques. Sung *et al.* ont démontré que l'étape qui consiste à faire bouillir les bactéries n'altérerait pas la qualité des ARNm obtenus.

I.6.2 - Contrôle de la qualité et de la quantité des ARN obtenus.

Afin de vérifier la qualité de l'ARN extrait, il est habituel de le faire migrer sur un gel d'agarose à 1,2%, avec visualisation sous lumière ultraviolette (U.V), après coloration au bromure d'éthidium (BET). Les deux bandes d'ARNr doivent être présentes. La présence d'un smear (traînée sur le gel) indique que les ARN ont très probablement été dégradés par des RNases.

Dans la majorité des laboratoires, la quantité d'ARN est mesurée par spectrophotométrie (densité optique à 260 nm), avec l'inconvénient d'intégrer dans le dosage un certain nombre de substances interférentes, telles que des protéines ou des nucléotides libres, non éliminés lors de l'extraction (Bastard *et al.*, 2002). Une meilleure sensibilité peut être obtenue par fluorimétrie, mais nécessite un appareillage spécifique.

I.6.3 - Conservation des ARN.

Après extraction, les ARN purifiés peuvent être conservés à -80°C dans de l'eau "RNase free" ou du tampon TRIS-EDTA (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7), pendant au moins 1 an (Bastard *et al.*, 2002). L'utilisation d'une solution de citrate de sodium améliorerait la stabilité.

Pour un stockage sur une plus longue durée, les ARN peuvent être conservés dans l'éthanol ayant servi à leur précipitation.

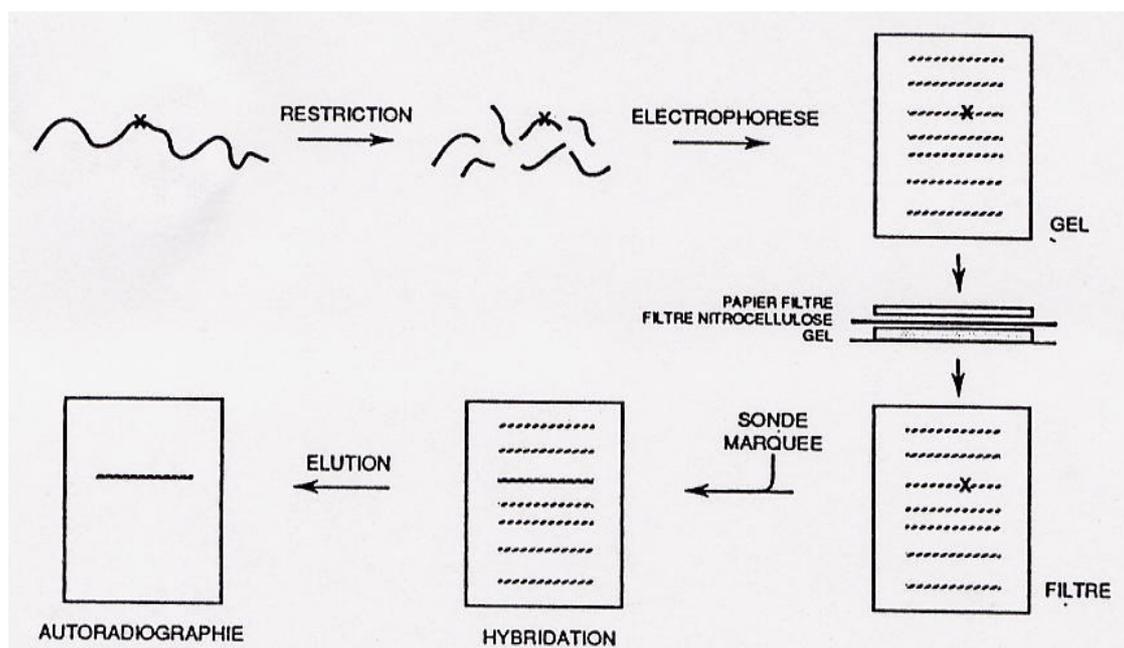
I.6.4 - Principales techniques moléculaires de mise en évidence des ARNm :

I.6.4.1 - Le Northern blot.

Dans cette technique, les ARN sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose, en présence d'agents dénaturants, tels que le formaldéhyde (puisque'il est toujours nécessaire d'abolir la structure secondaire qui gênerait la migration et l'hybridation moléculaire). Ils sont ensuite transférés sur filtre et hybridés avec une sonde marquée (**Figure 10**, p. 39). De plus, l'extrême sensibilité des ARN vis-à-vis des RNases, enzymes très répandues et très stables, implique de travailler avec un très grand soin et dans les conditions les plus stériles possibles.

Sur l'autoradiogramme final, il est possible d'observer une ou plusieurs bandes dont la taille, le nombre et l'intensité sont des indications précieuses. Des mesures semi-quantitatives sont réalisables, par analyse densitométrique des autoradiogrammes. Leur précision est faible et elle ne permet d'apprécier que des variations grossières.

Figure 10 : Principe de la technique du Northern Blot.



Après une étape de digestion, une électrophorèse est réalisée. Les fragments sont alors transférés sur une membrane de nitrocellulose. Cette dernière est incubée en présence d'une sonde marquée spécifique du gène d'intérêt et la révélation est réalisée lors d'une autoradiographie.

I.6.4.2 - La RT-PCR classique.

La technique de RT-PCR, très largement utilisée en Virologie, a été relativement peu développée pour étudier les transcrits bactériens.

Outre les difficultés liées à l'extraction des ARN bactériens, l'absence d'introns dans les gènes bactériens impose un traitement drastique par la DNase, pour éliminer l'ADN contaminant, car rien ne permet de différencier, chez les bactéries, le cDNA obtenu après "reverse-transcription" (RT) de cet éventuel ADN (Rokbi *et al.*, 2001). Il est ensuite nécessaire de contrôler l'efficacité de ce traitement, en réalisant une réaction d'amplification sans RT, à partir des ARN traités. Celle-ci ne doit montrer aucune amplification qui signerait la présence d'ADN contaminant. Toutefois, cette étape implique obligatoirement la perte d'une partie de l'ARN, en raison de l'inactivation nécessaire de la DNase par chauffage (Wiame *et al.*, 2000). C'est pourquoi, certains auteurs ont proposé une nouvelle approche, dénommée EXACT-PCR (exclusive amplification of cDNA template) qui évite l'amplification d'ADN génomique, en incorporant une séquence unique absente de l'ADN génomique, dans le cDNA *via* une amorce hybride, lors de l'étape de RT (Smith *et al.*, 2001, Agüena et Spira, 2003).

La RT-PCR consiste, en effet, en une étape de RT destinée à transformer l'ARN en cDNA, suivie d'une amplification par PCR.

La réaction de RT est particulièrement délicate, les ARN simples brins pouvant former des structures secondaires et diminuer l'efficacité de conversion de l'ARN en ADNc (Persing, 1993). Pour éviter cet écueil, l'ARN est généralement dénaturé à 65 ou 95°C, avant la réaction, puis placé dans la glace. Des agents dénaturants (DMSO : diméthylsulfoxyde, DTT : dithiothréitol, β -mercapto-éthanol) sont ajoutés dans le tampon réactionnel.

Une autre possibilité consiste à réaliser la RT à une température élevée (entre 50°C et 70°C), avec une enzyme thermostable telle que la *Tth* ADN-polymérase.

Une RT-PCR peut être réalisée de plusieurs façons :

- En deux étapes (deux tubes, deux réactions) : les deux réactions se déroulent dans deux tubes différents ; après la RT, une aliquote de l'ADNc synthétisé (en général 2 à 5 μ L) est transférée dans un nouveau tube pour être amplifiée par PCR.
- En deux étapes (un tube, deux réactions) : les deux réactions (RT et PCR) sont réalisées successivement dans le même tube ; après la RT, un mélange réactionnel de PCR est ajouté directement dans le tube, pour amplifier l'ADNc néo-synthétisé.
- En une étape (un tube, une réaction) : dans les systèmes de RT-PCR en une étape, les deux réactions sont réalisées dans les mêmes conditions de mélange réactionnel, sans ouverture des tubes ni modification des conditions d'amplification ; les systèmes en une étape sont avantageux, en raison de leur rapidité (limitation du nombre de manipulations) et par la réduction des risques de contamination ; certains auteurs ont montré, par ailleurs, que leur sensibilité était équivalente, voire même supérieure, à celle des systèmes en deux étapes (Cusi *et al.*, 1994, Kokko *et al.*, 1996).

Qu'elle soit en une ou deux étapes, la RT-PCR aboutit à l'accumulation de nombreuses copies en ADN de la cible de départ. Les produits d'amplification (amplicons) sont généralement visualisés après migration électrophorétique sur gel d'agarose ou d'acrylamide. La visualisation des acides nucléiques, après migration, se fait à l'aide de BET, un agent intercalant : une fois intercalé entre les bases, ce composé présente une fluorescence orangée sous lumière U.V.

Les résultats ainsi obtenus sont toutefois uniquement qualitatifs, alors que l'étude de la régulation de l'expression des gènes impose de pouvoir au moins estimer, sinon quantifier, les transcrits spécifiques de certains gènes.

I.6.4.3 - La RT-PCR quantitative.

L'étape de RT étant sujette à de nombreuses variations, la nécessité d'utiliser des ARN contrôles s'est rapidement imposée. En effet, la "reverse-transcriptase" est une enzyme très sensible aux traces de sels, d'alcool... qui peuvent contaminer les échantillons d'ARN. Les variations d'une expérience à l'autre, et entre les tubes dans une même expérience, peuvent être très importantes.

L'approche la plus utilisée, pour pallier à ce problème, a été la co-amplification d'un standard, soit dans un tube différent, soit dans le même tube (Freeman *et al.*, 1999).

Ainsi, chez les eucaryotes, ont été largement utilisés comme standards les ARNm de la β -actine, de la GAPDH (enzyme clé de la glycolyse), ainsi que les ARN ribosomiaux 18S et 28S. Idéalement, ces contrôles doivent être exprimés de façon constante, dans les différents échantillons.

Chez les procaryotes, sont fréquemment utilisés les ARN ribosomiaux 16S (Martineau *et al.*, 1996). L'ARNm de la GAPDH a également été utilisé comme contrôle d'amplification (Jellen-Ritter et Kern, 2001).

Toutefois, ces standards ont l'inconvénient d'être amplifiés avec des amorces différentes de celles du gène cible, et donc avec un rendement nécessairement différent. C'est pourquoi, de nombreux auteurs ont utilisé, pour la quantification, des standards internes homologues, pouvant être co-amplifiés avec les mêmes amorces que la cible. Il s'agit donc d'ARN synthétiques, obtenus par clonage ou PCR suivi d'une transcription *in vitro*, présentant la même séquence que le gène cible, à l'exception d'une petite délétion ou insertion ou d'une mutation ponctuelle, permettant de les différencier lors de la quantification.

Une fois ce standard construit, deux approches peuvent être utilisées pour la quantification : la RT-PCR compétitive (la plus commune, dans laquelle le standard entre en compétition avec l'ARN cible) et la RT-PCR non compétitive.

I.6.4.4 - La RT-PCR en temps réel.

Les pionniers de la PCR cinétique sont Higuchi et ses collaborateurs (Poitras et Houde, 2002) qui ont construit le premier système capable de détecter les produits de PCR, au fur et à mesure de leur accumulation. Ce système était basé sur l'utilisation de BET, substance intercalante initialement utilisée pour la révélation sur gel de polyacrylamide. Le BET est directement inclus dans les tubes réactionnels placés dans un thermocycleur spécial. Ce dernier, non seulement permet l'irradiation des tubes par une lampe U.V., mais il est également capable de mesurer les intensités de fluorescence émise lors de l'amplification (accumulation de produit de PCR). La mesure se fait *via* une caméra CCD (Charge Coupled Device), contrôlée par un système

informatique. Depuis, des avancées technologiques ont été réalisées et d'autres systèmes de fluorescence, basés essentiellement sur les propriétés de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), ainsi que plusieurs appareils, ont fait leur apparition sur le marché.

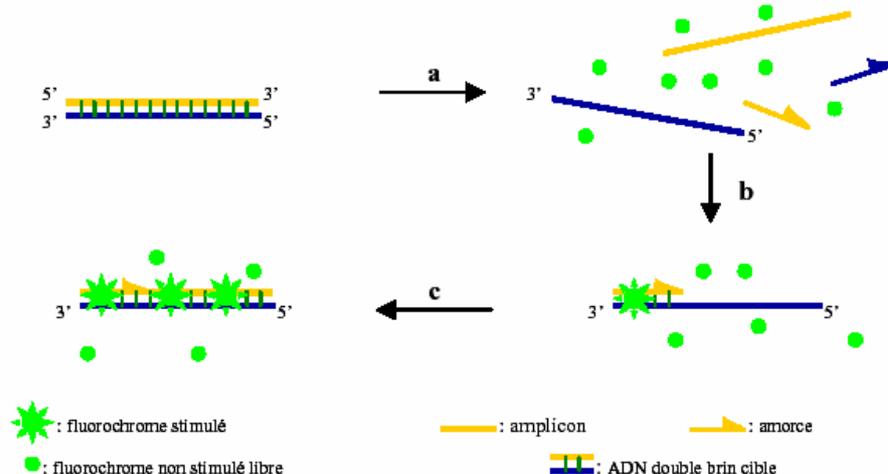
Le développement de la technologie en temps réel, avec combinaison de l'amplification et de la détection des cibles, a permis la mise au point de nombreuses techniques utilisant différents systèmes de marquage (Bustin, 2002, Schweitzer et Kingsmore, 2001).

Deux grands types de systèmes de marquage sont mis en œuvre, en PCR cinétique. Il s'agit, d'une part, des molécules fluorescentes qui s'intercalent entre les bases d'un ADN double brin (BET et SYBR Green) et, d'autre part, des sondes d'acide nucléique couplées à des molécules ayant des propriétés de FRET.

Le SYBR Green.

Le SYBR Green est un agent intercalant qui se lie préférentiellement à l'ADN double brin, en émettant de la fluorescence à 530 nm (Skeidsvoll et Ureland, 1995). Lors d'une réaction d'amplification, le SYBR Green, préalablement titré et ajouté au mélange réactionnel, se lie à l'ADN néo-synthétisé, en émettant une fluorescence directement proportionnelle à la quantité d'amplicons. L'accumulation de produits de PCR est ainsi visualisée, à chaque cycle d'amplification. Il se pose toutefois le problème d'un manque de spécificité, car cet agent s'intercale dans tous les ADN doubles brins présents (amplification non spécifique, dimères d'amorces...) (Figure 11).

Figure 11 : Principe de la RT-PCR avec le SYBR Green, d'après Poitras et Houde (2002).

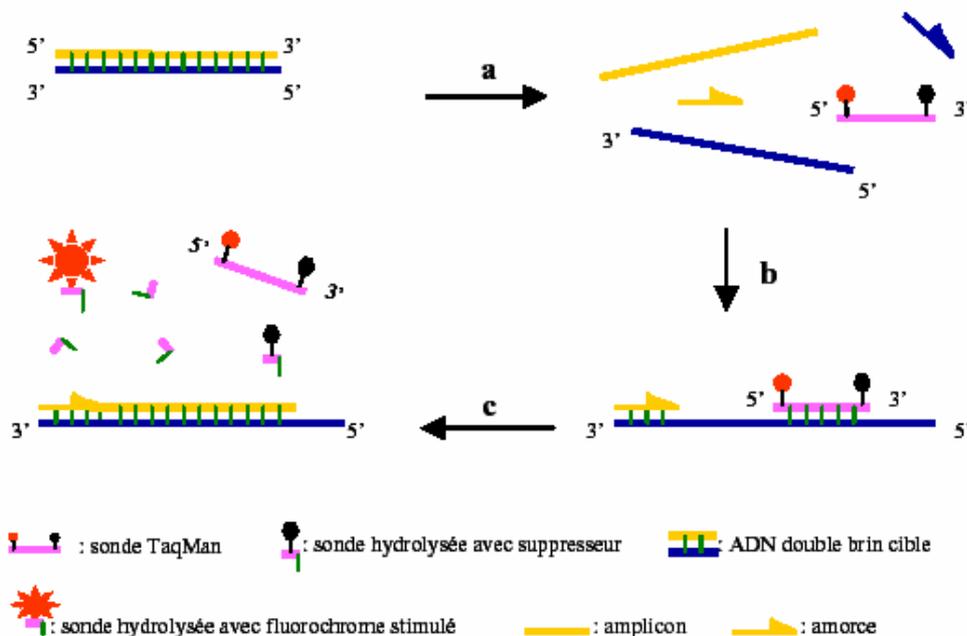


(a) Durant la dénaturation, le SYBR Green I libre produit peu de fluorescence. (b) A la température d'appariement, quelques molécules se lient au double brin d'ADN naissant, provoquant une émission de fluorescence lors de l'excitation. (c) Durant la phase de polymérisation, de plus en plus de molécules se lient au brin naissant et l'accroissement de la fluorescence peut être suivi en temps réel.

Les sondes d'hydrolyse (brevet technologie TaqManTM).

La technologie TaqMan (ou fluorogenic 5' nucléase PCR assay - APPLERA, France) est une technique d'amplification génique innovante, dont le suivi se réalise en temps réel. Le mélange réactionnel contient, en plus des réactifs usuels de PCR, une sonde doublement marquée par un Reporter fluorescent (FAM) et un Quencher (TAMRA) chargé d'absorber toute la fluorescence émise par le Reporter situé à proximité (Livak *et al.*, 1995). La proximité des deux fluorophores Quencher/Reporter, sur la sonde, provoque un transfert d'énergie de résonance (FRET) du Reporter vers le Quencher, réduisant ainsi considérablement l'émission initiale du Reporter à un bruit de fond. L'efficacité du transfert est fonction de la distance entre les deux fluorophores. La sonde correspond à une séquence située entre les deux amorces délimitant la région à amplifier. L'extrémité 3'OH de la sonde étant bloquée, elle ne peut pas servir de point de départ à une élongation. Si la séquence cible d'ADN est présente, la polymérase procède à l'élongation à partir d'une amorce hybridée. Quand elle rencontre la sonde interne hybridée, elle la clive grâce à son activité 5'3' exonucléasique (Holland *et al.*, 1991). Le reporter alors libéré s'éloigne du Quencher et sa fluorescence devient détectable. Ainsi, à chaque cycle d'amplification, une molécule de Reporter est libérée pour chaque molécule d'ADN amplifiée, ce qui entraîne une accumulation en temps réel de signaux de fluorescence (**Figure 12**).

Figure 12 : Principe de la RT-PCR avec une sonde TaqMan, d'après Poitras et Houde (2002).

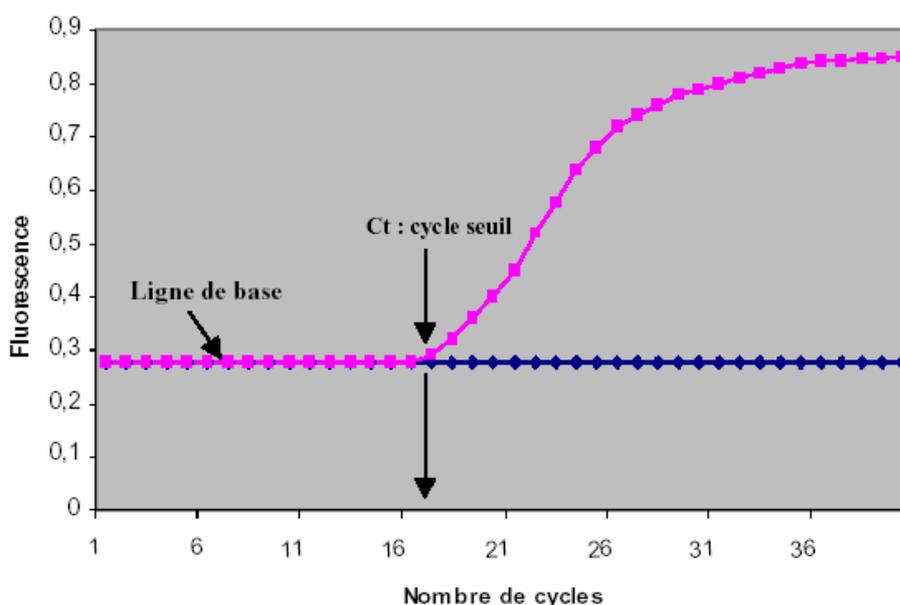


(a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) A la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence ; la polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde ; le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur, permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

Après mise au point, cette technologie permet de réaliser des réactions d'amplification en deux à trois heures, qu'il s'agisse d'une PCR ou d'une RT-PCR. L'acquisition des données de fluorescence se fait en temps réel, mais leur analyse ne peut être réalisée qu'en fin d'amplification. Des adaptations sont possibles, en fonction de l'appareil utilisé, du nombre de longueurs d'onde d'excitation disponibles pour les fluorophores, de la convivialité et de la souplesse du logiciel d'analyse des données de fluorescence couplé.

L'interprétation des données acquises en temps réel fait appel à une nouvelle notion : le cycle seuil (Threshold cycle ou Ct). Le concept du "cycle seuil" est à la base d'une quantification précise et reproductible, pour les techniques fluorescentes en PCR (Poitras et Houde, 2002). Les valeurs de fluorescence sont enregistrées au cours de chaque cycle et représentent la quantité d'amplicons produits, en un point précis dans la réaction (**Figure 13**). Plus il y a de matrices à amplifier au départ de la réaction, moins élevé sera le nombre de cycle requis, pour atteindre un point où le signal d'émission de fluorescence sera statistiquement et significativement plus élevé que le bruit de fond (Gibson *et al.*, 1996). Ce point est défini comme étant le cycle seuil (Ct) et apparaîtra toujours au cours de la phase exponentielle d'amplification. Par conséquent, la quantification n'est pas affectée par l'épuisement d'un des réactifs, comme lors de la phase de plateau, ce qui explique pourquoi le système en temps réel est si reproductible. La valeur du Ct peut être traduite en un résultat quantitatif, en la comparant avec les valeurs du Ct générées avec des matrices de quantification connues (Bustin, 2000).

Figure 13 : Principe de détection de la PCR en temps réel et du cycle seuil ou Ct, d'après Poitras et Houde (2002).



Modèle graphique de la PCR en temps réel, où l'intensité de la fluorescence est exprimée en fonction du nombre de cycles. L'intensité de la fluorescence, à chaque cycle, est proportionnelle

à la concentration d'amplicons ; le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis pour que le signal d'émission de fluorescence soit statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base.

I.6.4.5 - Détection du site d'initiation de la transcription à la nucléase S1.

L'étude de l'expression d'un gène conduit à analyser les régions promotrices situées en amont de ce gène (homologie, par rapport aux séquences consensus). L'exploration peut être complétée par la détection du site d'initiation de la transcription. Ce site peut être déterminé par utilisation d'une exonucléase : la nucléase S1 qui possède la particularité de dégrader les acides nucléiques simples brins ; les molécules d'ADN bicaténaires, ainsi que les hybrides ADN-ARN ne sont pas attaqués par cette enzyme. Cette technique permet la réalisation d'une cartographie des séquences en 5' comportant les régions promotrices d'un gène d'intérêt. L'hybridation de l'ADN à l'ARN correspondant est réalisée dans des conditions définies, avec radiomarquage au phosphore 32.

L'ARNm correspondant au gène s'hybride avec la partie codante de l'ADN, les séquences non codantes de ce même ADN restant sous forme simple brin. La digestion pratiquée à la nucléase S1 ne détruit que les acides nucléiques sous forme simple brin. Le produit de digestion est alors soumis à une électrophorèse en conditions dénaturantes, et la taille du fragment révélée par autoradiographie représente la partie d'ADN protégée par l'ARN. L'analyse de sa séquence permet de déterminer la première base protégée et donc le site d'initiation de la transcription (Kormarec, 2001).

II- Supports et régulation génétiques de la résistance aux β -lactamines

chez les bacilles à Gram négatif :

II.1- Les supports génétiques de la résistance :

Le séquençage, à ce jour, de plus d'une vingtaine de génomes bactériens, a confirmé que le génome des procaryotes n'est pas une structure figée, mais au contraire une structure dynamique. Cette plasticité génomique permet aux bactéries de s'adapter aux conditions environnementales et on sait, aujourd'hui, qu'entre deux souches de *E. coli*, la taille du chromosome bactérien peut varier de 1 mégabase suivant la souche analysée (Bergthorsson et Ochman, 1998). De la même façon, chez *Bacillus cereus*, des souches dont le génome varie entre 2,4 et plus de 6 mégabases ont été identifiées (Carlson et Kolsto, 1994).

Des transferts horizontaux de gènes sont sans doute majoritairement à l'origine de cette dynamique génomique et concernent particulièrement des gènes impliqués dans la virulence (Lawrence et Ochman, 1998).

Dans le domaine de la résistance aux antibiotiques, la mise en évidence de cette plasticité génomique rend largement obsolète la classification en résistance chromosomique et extra-chromosomique, qui prévalait jusqu'alors.

II.1.1- Le chromosome bactérien.

De nombreux gènes de résistance aux antibiotiques sont situés sur le chromosome bactérien.

Ainsi, la résistance naturelle aux β -lactamines, par production d'une β -lactamase codée par un gène chromosomique, est retrouvée chez différentes entérobactéries. Chez *K. pneumoniae* ou *Klebsiella oxytoca*, la résistance est liée à la production constitutive d'une pénicillinase codée par un gène chromosomique, inhibée par les inhibiteurs de β -lactamases : *K. pneumoniae* et *K. oxytoca* produisent respectivement SHV-1 et OXY-1 ou leurs dérivés (Chaves *et al.*, 2001, Fournier *et al.*, 1996). Récemment, la caractérisation génétique et biochimique de deux nouvelles β -lactamases de classe A de Ambler a été rapportée, chez des bactéries antérieurement classées dans le genre *Klebsiella* : *Raoultella planticola* et *Raoultella ornithinolytica* (Walckenaer *et al.*, 2004). Le profil de résistance correspondant est compatible avec la présence d'une pénicillinase codée par un gène chromosomique. Les β -lactamases PLA-1 (*R. planticola*) et ORN-1 (*R. ornithinolytica*), caractérisées par le même point isoélectrique (pI = 7,8), présentent une similitude de séquence de 94 %. Elles entraînent un comportement phénotypique proche de celui des *Klebsiella sp.* dont ces souches sont très proches.

Chez d'autres entérobactéries, ainsi que chez *P. aeruginosa* et *A. baumannii*, la résistance aux β -lactamines est liée à la production d'une céphalosporinase codée par un gène chromosomique : AmpC. Chez les entérobactéries telles que *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia*, *Morganella* ou *Providencia*, cette enzyme est produite sur un mode inductible. Des β -lactames telles que l'acide clavulanique, la céfoxitine ou l'imipénémème en sont d'excellents inducteurs.

Cette résistance, bien que de support chromosomique, n'est pas figée :

- des enzymes AmpC présentant des modifications structurales, par mutations ou délétions de nucléotides, ont été décrites (Barnaud *et al.*, 2004, Mammeri *et al.*, 2004, Barnaud *et al.*, 2001) ;
- ces enzymes peuvent être hyperproduites, par modification de leur régulation (Bagge *et al.*, 2002, Barlow et Hall, 2002) ;
- après transfert, les gènes codant pour ces enzymes ont également été observés sur des plasmides : AmpC "plasmidiques" (Philippon *et al.*, 2002, Odeh *et al.*, 2002).

La résistance non enzymatique est également habituellement codée par des gènes présents sur le chromosome bactérien.

II.1.2- Les supports plasmidiques.

L'élément majeur de l'évolution du patrimoine génétique bactérien relève de la découverte de l'existence de transferts de gènes de bactéries à bactéries. Ce phénomène génétique joue un rôle primordial en Bactériologie médicale, dans la diffusion des gènes de résistance portés par des plasmides, support génétique très fréquent chez de nombreuses espèces bactériennes.

Ces éléments génétiques extra-chromosomiques sont constitués d'ADN double brin, circulaire dans la majorité des cas, de localisation cytoplasmique et de taille variable. Ils ne sont pas indispensables au métabolisme normal ou à la survie de la bactérie, mais ils participent à l'adaptation aux conditions environnementales (souplesse génétique de la bactérie concernée). Les plasmides sont doués d'une répllication autonome, assurant leur propre survie. La transmission d'une cellule à l'autre s'effectue habituellement par conjugaison bactérienne, grâce aux pili sexuels. Ils sont ensuite transmis de façon stable, au cours des divisions cellulaires, expliquant la dissémination importante de certains gènes de résistance au sein d'espèces bactériennes parfois phylogénétiquement éloignées (Stürenburg et Mack, 2003).

Certains plasmides sont dits conjugatifs, c'est-à-dire qu'ils peuvent être transmis d'une bactérie à une autre au cours d'un processus spécifique d'accouplement, appelé conjugaison. Les plasmides conjugatifs présentent la particularité d'être de plus grande taille, puisque les gènes responsables de cet auto-transfert sont relativement nombreux (Guiraud, 1993).

Ces plasmides constituent d'excellents vecteurs de gènes. Ils peuvent véhiculer des gènes codant pour des facteurs de virulence. Ils sont également très fréquemment porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques (β -lactamines, aminosides, tétracyclines ou chloramphénicol) par production d'enzymes inactivatrices, telles que la β -lactamase TEM-1, codée par le gène *bla*_{TEM-1} retrouvé chez de nombreuses entérobactéries, mais aussi chez *Haemophilus influenzae* ou *Neisseria gonorrhoeae* (Stürenburg et Mack, 2003).

Plus récemment, à la fin des années 1990, des gènes de β -lactamases de type AmpC, initialement rencontrés en position chromosomique, ont été retrouvés sur des supports plasmidiques. La première β -lactamase de ce type a été rapportée en 1989 et dénommée MIR-1 (Papanicolaou *et al.*, 1990). Elle dérivait de la β -lactamase d'origine chromosomique de *Enterobacter cloacae*. D'autres enzymes, telles que CMY-1, ACT-1 ou FOX-1, ont ensuite été découvertes, le plus souvent chez *K. pneumoniae*, sur les différents continents (Philippon *et al.*, 2002). Cette diffusion mondiale a conduit à surveiller l'épidémiologie des plasmides conjugatifs impliqués. En 2004, Alvarez *et al.* ont rapporté un pourcentage de 8,5 % de souches de *K. pneumoniae* résistantes à la ceftazidime, en relation avec la présence de ce type de support génétique (Alvarez *et al.*, 2004).

II.1.3- Les transposons.

Ils représentent un autre support génétique de la résistance.

Un transposon est un élément génétique mobile, formé d'une séquence d'ADN sans existence autonome stable. Mais cette séquence est capable de promouvoir sa propre translocation d'un réplicon sur un autre (transposition intermoléculaire) ou sur le même réplicon (transposition intramoléculaire), grâce à la présence d'un gène codant pour une transposase. La transposition survient en l'absence totale d'homologie entre les séquences d'ADN (recombinaison non homologue).

L'intégration d'un transposon est réalisée soit sur un plasmide, soit sur le chromosome bactérien, le plus souvent dans une région riche en AT. La longueur de la séquence cible varie d'un transposon à l'autre (entre 5 et 9 paires de bases).

La transposition peut être conservatrice : dans ce cas, le transposon se déplace d'un site à un autre, en laissant une brèche dans l'ADN donneur. Elle peut être répllicative : le transposon reste en place et il est "recopié" dans une autre région du génome.

Différentes catégories de transposons ont été rapportées (Mahillon, 1998 - **Figure 14**, p. 51).

↳ **Les séquences d'insertion (IS)** : elles constituent les transposons les plus simples (Mahillon et Chandler, 1998). Une véritable explosion du nombre de séquences décrites (plus de 500) révèle leur diversité et la variabilité de leur distribution au sein des diverses espèces bactériennes. Elles ne constituent pas elles-mêmes un support de la résistance aux antibiotiques, mais sont susceptibles d'interférer dans la régulation de certains des mécanismes qui y sont impliqués.

L'organisation génétique de ces structures est toujours la même :

- un gène codant pour une transposase ;
- des séquences inversées répétées (IR) aux deux extrémités, comprises entre 10 et 40 paires de bases, qui interviennent dans la liaison avec la transposase, lors de la transposition ;
- des séquences répétées (DR) caractéristiques de chaque IS, comprises entre 2 et 14 paires de bases, générées au niveau de l'ADN cible ; elles sont la conséquence du phénomène de transposition ;
- un promoteur, le plus souvent faible, situé dans la partie terminale des IR, autorisant leur autorégulation par fixation de la transposase.

La classification des IS est liée à la combinaison de différents critères :

- leur organisation génétique ;
- la nature de la transposase (homologie de certains domaines ou motifs conservés) ;
- le caractère identique des IR ;
- les séquences nucléotidiques des DR, dupliquées lors de la transposition.

Le tableau II, page 50, résume l'ensemble des principales caractéristiques des IS retrouvées chez les procaryotes.

Tableau II : Caractéristiques des principales séquences d'insertion décrites
chez les bactéries, d'après Mahillon et Chandler (1998).

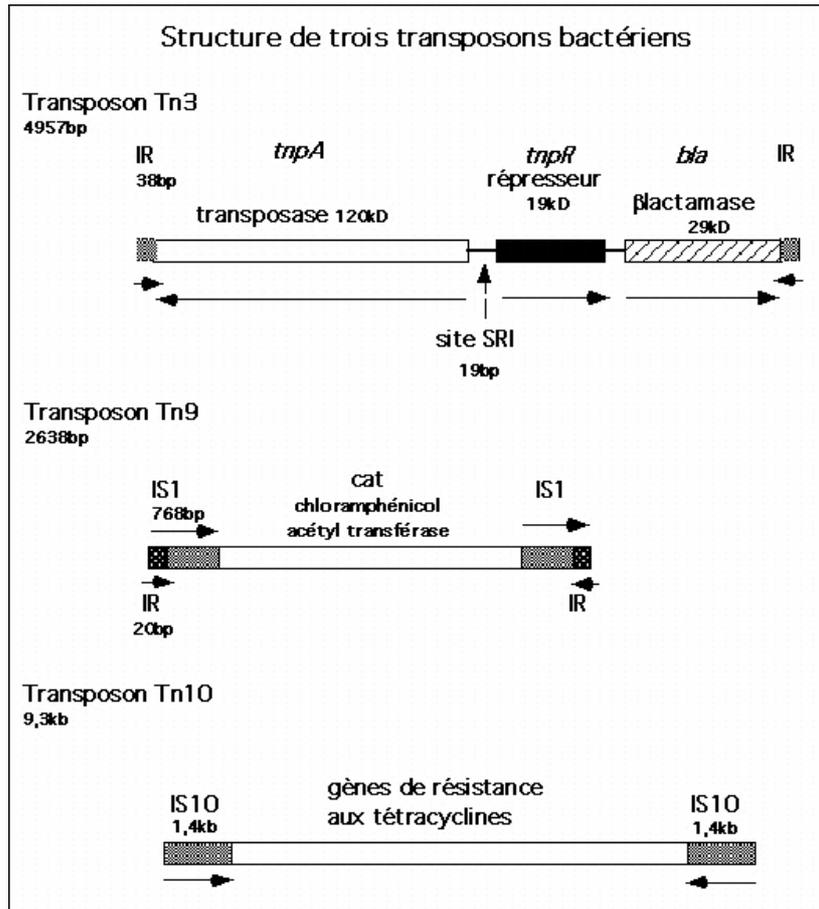
Family	Group(s)	Size range (bp) ^a	DR (bp) ^b	ENDS ^c	IR ^d	No. of ORFs ^e	Comments ^f
IS1		770	9 (8–11)	GGT	Y	2	Phage λ integrase?
IS3	IS2	1,300–1,350	5	TGA	Y	2	DD(35)E
	IS3	1,200–1,300	3 (4)				
	IS51	1,300–1,400	3 (4)				
	IS150	1,400–1,550	3–5				
	IS407	1,200–1,250	4				
IS4		1,300–1,950	9–12	C(A)	Y	1	DDE
IS5	IS5	1,100–1,350	4	GG	Y	1	DDE
	IS427	800–1,000	2–3	Ga/g			
	IS903	1,000–1,100	9	GGC			
	IS1031	850–950	3	GAG			
	ISH1	900–1,150	8				
	ISL2	800–1,100	2–3				
IS6		750–900	8	GG	Y	1	DD(34)E
IS21		1,950–2,500	4 (5, 8)	TG	Y	2	DDE
IS30		1,000–1,250	2–3		Y	1	DD(33)E
IS66		2,500–2,700	8	GTA	Y	>3	
IS91		1,500–1,850	0		N	1	ssDNA Rep
IS110		1,200–1,550	0		N	1	Site-specific recombinase
IS200/IS605		700–2,000	0		N	1 (2)	Complex organization
IS256		1,300–1,500	8–9	Gg/a	Y	1	DDE, eukaryotic relatives
IS630		1,100–1,200	2		Y	1	DDE, eukaryotic relatives
IS982		1,000	ND ^g	AC	Y	1	DDE
IS1380		1,650	4	Cc/g	Y	1	
ISAs1		1,200–1,350	8	C	Y	1	
ISL3		1,300–1,550	8	GG	Y	1	

^a Size range represents the typical range of each group.
^b Length of direct target repeats. Less frequently observed lengths are included in parentheses.
^c Conserved terminal base pairs. Capital letters (and capital letters within parentheses) refer to mostly (and often) conserved bases. Lowercase letters separated by slashes indicate alternative conservation at that position.
^d Presence (Y) or absence (N) of terminal inverted repeats.
^e ORF, open reading frame. Number in parentheses indicates the possible involvement of a second ORF in the transposition process.
^f DDE represents the common acidic triad presumed to be part of the active site of the transposase. ssDNA, single-stranded DNA.
^g ND, not determined.

↳ **Les transposons de la famille TnA** : le modèle en est le transposon Tn3 ; ils sont caractérisés par des séquences inversées répétées aux extrémités, un gène codant pour une transposase et la présence d'un ou plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques, avec une longueur totale variant entre 5 et 10 Kb (Liebert *et al.*, 1999).

↳ **Des transposons plus complexes**, appelés transposons composites, tels que Tn5, Tn9 ou Tn10 : ils possèdent deux séquences d'insertion au lieu d'une seule.

Figure 14 : Organisation des transposons, d'après <http://www.biochimie7.fr>.



II.1.4- Les intégrons.

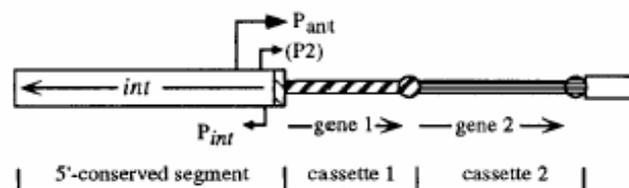
Après la mise en évidence des plasmides et des transposons, au cours des années 1980 ont été rapportés les premiers intégrons qui sont des structures génétiques complexes, susceptibles d'acquérir ou bien de perdre des gènes de résistance aux antibiotiques. Ces structures sont très répandues chez les bactéries à Gram négatif (entérobactéries, *P. aeruginosa* et *A. baumannii*) (Correia *et al.*, 2003, Giakkoupi *et al.*, 2003, Ribera *et al.*, 2004). Récemment, leur présence a également été rapportée chez des bactéries à Gram positif telles que *Corynebacterium glutamicum* (Nesvera *et al.*, 1998).

L'origine des intégrons et des gènes cassettes qu'ils comportent n'est pas encore élucidée entièrement. Toutefois, il semblerait que ces structures proviennent de super-intégrons, récemment décrits sur le chromosome de différentes espèces dont *Vibrio cholerae* (Barlow *et al.*, 2004). Ces super-intégrons comportent près d'une centaine de cassettes, constituant un phénoménal réservoir de gènes de résistance ou de virulence. Ils assurent ainsi à la bactérie une formidable et rapide capacité d'adaptation aux pressions de l'environnement.

En effet, les intégrons constituent un système de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes. Ces dernières sont des éléments mobiles capables de s'intégrer ou de s'exciser par un mécanisme de recombinaison, spécifique de site, lié à l'intégrase. Leur mouvement et leur nombre permettent une mosaïque de combinaisons, responsables de la dissémination de la résistance au sein des bactéries (Toussaint *et al.*, 2002). A la différence des plasmides, les intégrons sont incapables d'autoréplication. Ils sont obligatoirement portés sur un réplicon de nature chromosomique ou plasmidique. De même, ils diffèrent des transposons par l'absence de gène codant pour une recombinase au sein des cassettes, également dépourvues de séquences inversées répétées à leurs extrémités (Rowe-Magnus et Mazel, 2001, Fluit et Schmitz, 1999).

La structure générale des intégrons est toujours identique (**Figure 15**). Ils sont constitués d'une région, en position 5', qui comprend un gène *intI* codant pour une intégrase et un site d'attachement *attI*, ainsi que d'un ou deux promoteurs (Ploy *et al.*, 2000).

Figure 15 : Structure générale des intégrons de classe 1, d'après Sabate et Prats (2002).



Classiquement, les intégrons se subdivisent en trois classes, définies par la nature du gène codant pour l'intégrase (Rowe-Magnus et Mazel, 2001). Les sites *attI* des différentes classes d'intégrons n'ont pas de séquences communes, excepté le motif GTTRRRY (R = purine, Y = pyrimidine). Une quatrième classe correspond désormais aux super-intégrons (Barlow *et al.*, 2004).

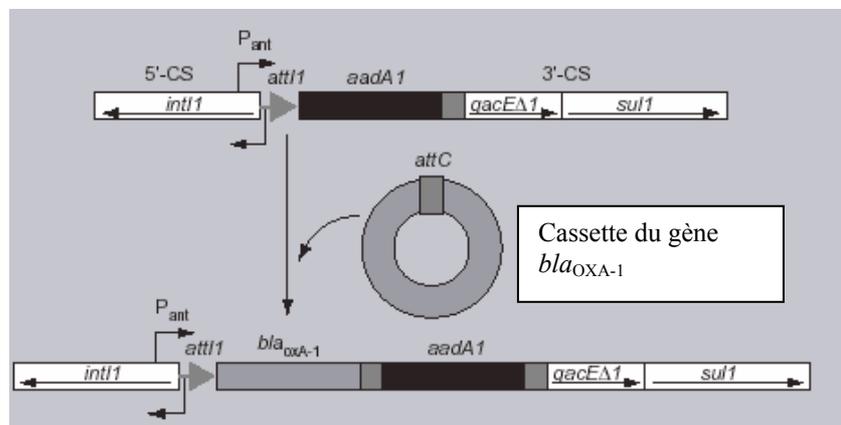
Les intégrons le plus souvent retrouvés chez les bactéries d'intérêt médical sont des intégrons de classe 1. Leur extrémité 3' terminale contient généralement trois cadres de lecture ouverts : le premier est un dérivé du gène *qacE* codant pour la résistance aux ammoniums quaternaires (gène *qacEΔI*) ; le deuxième correspond au gène *sull* qui code pour la résistance aux sulfamides ; enfin, le dernier correspond à un cadre ouvert de lecture ORF5 (Fluit et Schmitz, 1999).

La nature des cassettes impliquées dans la résistance aux antibiotiques est diverse. D'un nombre supérieur à 70, elles touchent toutes les familles d'agents antimicrobiens (les β-lactamines, les aminosides, le chloramphénicol, le triméthoprim, la rifampicine, l'érythromycine et les

ammoniums quaternaires) (Rowe-Magnus and Mazel, 2001). Leur taille et leurs fonctions sont très variables, mais elles possèdent une organisation génétique commune. Elles sont constituées d'un gène adjacent à un site de recombinaison *attC* qui est reconnu par l'intégrase. Ce site possède des séquences relativement conservées, inversées répétées, imparfaites, dont la taille varie de 57 à 141 paires de bases. Les deux séquences inversées répétées, de 7 paires de bases, constamment retrouvées aux deux extrémités de chaque site *attC*, sont désignées sous les termes de core (GTTRRRY) et de core inverse (RYYAAC). Les premiers sites *attC* mis en évidence présentaient 59 paires de bases, d'où la terminologie d'élément 59-pb, désormais obsolète, car il existe une grande variété de sites *attC*.

Les mêmes cassettes peuvent être décrites chez des intégrons de classes différentes. Le mouvement des cassettes est réalisé essentiellement par un système d'insertion/excision sous forme circulaire, par un mécanisme de recombinaison entre deux sites spécifiques, catalysé par l'intégrase. L'événement de "crossing-over" se produit entre le G d'un site core GTTRRRY et le premier T d'un deuxième site core. Les intégrations de cassettes se réalisent de préférence au niveau du site *attI* (Figure 16).

Figure 16 : Schéma de l'intégration d'une cassette dans un intégron de classe 1, d'après Sabate et Prats (2002).



L'expression génétique des cassettes requiert un promoteur. Les cassettes sont toutes insérées dans la même direction et sont généralement dépourvues de promoteur propre. Les gènes pour lesquelles elles codent sont donc co-transcrits au sein de l'intégron, comme sur un opéron, sous la dépendance d'une région promotrice commune, localisée dans la région 5' conservée de l'intégron. Le niveau d'expression est alors fonction de la position par rapport au promoteur, les gènes localisés dans les cassettes éloignées étant plus faiblement exprimés. Ceci implique qu'un intégron ne puisse pas accumuler un nombre trop important de cassettes.

Chez les intégrons de classe 1, deux promoteurs : P1 et P2 ont été caractérisés. P2 n'est présent que chez quelques intégrons, pour lesquels une insertion de 3 résidus guanine a entraîné un espacement de 17 paires de bases entre les séquences -35 et -10. P2 est situé 90 paires de bases en aval de P1. Les deux promoteurs sont fonctionnels et P1 peut se présenter sous différentes versions (Tableau III).

Tableau III : Séquences promotrices des intégrons P1 et P2, distance inter-boxes et force relative des régions promotrices -35 et -10, d'après Fluit et Schmitz (1999).

Promotor	-35 region	-10 region	Spacing (nucleotides)	Strength
P1	TTGACA	TAAACT	17	strong
	TGGACA	TAAGCT	17	weak
	TGGACA	TAAACT	17	hybrid 1
	TTGACA	TAAGCT	17	hybrid 2
P2	TTGTTA	TACAGT	14	inactive
	TTGTTA	TACAGT	17	unknown

II.2- Résistance par production d'enzymes inactivatrices :

II.2.1- Rappel succinct des différentes classes de β -lactamases.

La classification proposée par Ambler distingue quatre classes de β -lactamases : A, B, C et D (Ambler, 1980). Elle est basée sur la séquence en acides aminés des enzymes décrites ; elle en a supplanté une autre, établie par Bush, basée sur les paramètres cinétiques de l'activité des β -lactamases et les conséquences phénotypiques pour les bactéries qui les produisent (Bush *et al.*, 1995).

En 1995, dans une nouvelle revue de la littérature sur les β -lactamases et leur impact en terme de résistance, Livermore a fourni un tableau de correspondance entre ces deux classifications (Tableau IV) : le mode d'action de ces enzymes inactivatrices, les paramètres d'activité enzymatique, leur distribution, leur support génétique et les effets de ces β -lactamases y sont ainsi détaillés (Livermore, 1995).

Tableau IV : Correspondance entre les classifications de Ambler et de Bush, d'après Livermore (1995).

Structural class (Ambler)	Functional group (Bush)	Activity ^b							Inhibition by clavulanate
		Penicillin	Carbenicillin	Oxacillin	Cephaloridine	Cefotaxime	Aztreonam	Imipenem	
Serine β -lactamases									
A	2a	+++	+	-	±	-	-	-	++
	2b	+++	+	+	++	-	-	-	++
	2be	+++	+	+	++	++	++	-	++
	2br	+++	+	+	+	-	-	-	-
	2c	++	+++	+	+	-	-	-	+
	2e	++	++	-	++	++	++	-	++
	2f	++	+	?	+	+	++	++	++
C	1	++	±	Inhibitor	+++	+	Inhibitor	-	-
D	2d	++	+	+++	+	-	-	-	±
Undetermined ^c	4 ^c	++	++	++	V	V	-	-	-
Zinc β -lactamases									
B	3	++	++	++	++	++	-	++	-

^a Data from Ambler's classification (4, 256) and the classification of Bush *et al.* (37). This table includes some simplifications. In particular, (i) group 2d includes molecular class A oxacillinases from *Actinomyces* and *Streptomyces* spp., as well as class D enzymes from gram-negative rods; (ii) hydrolytic activity varies within each group, and (iii) sequences remain to be determined for many enzymes included in Bush's scheme.

^b +++, preferred substrate (highest V_{max}); ++, good substrate; +, hydrolyzed; ±, barely hydrolyzed; -, stable; V, variable within group; ?, uncertain.

^c None of Bush's group 4 enzymes has yet been sequenced; they are assumed to be serine types because they lack carbapenemase activity.

Les enzymes de classe A.

Elles sont définies par la résistance de haut niveau qu'elles confèrent vis-à-vis des pénicillines et par leur sensibilité aux inhibiteurs de β -lactamases. Les chefs de file de cette classe sont les enzymes de type TEM ou SHV et leurs dérivés. Depuis leur découverte, un grand nombre d'enzymes a été décrit, résultant de mutations entraînant une diversité et un élargissement du spectre (Livermore, 1995). La compilation des "variants" de cette classe est actualisée sur le site internet <http://lahey.org/studies/webt.asp>. Parmi ces enzymes, les β -lactamases résistantes aux

inhibiteurs présentent des mutations en positions 67, 241 ou 276 (Stürenburg et Mack, 2003), alors que les premières β -lactamases à spectre étendu (BLSE) issues de TEM sont définies par des mutations en positions 102, 162, 236, 237 ou 261 (numérotation de Sutcliffe).

Depuis le début des années 1990, de nouvelles BLSE ont été isolées (Arlet et Philippon, 2003). Elles se subdivisent en deux sous-groupes :

- La classe des CTX-M qui entraînent une résistance de haut niveau à l'égard du céfotaxime. Ces enzymes, codées par des plasmides transférables, sont répandues sur tous les continents. Leurs progéniteurs sont des gènes chromosomiques d'espèces telles que *Kluyvera ascorbata*, *Kluyvera georgiana* et *Kluyvera cryocescens*. L'environnement génétique de ces gènes est complexe. Différents éléments, incluant *ISEcp1* et *Orf513*, pourraient être impliqués dans leur transfert. Actuellement, cette famille compte plus de 40 représentants, avec des pourcentages d'homologie supérieurs à 94 %, au sein des cinq groupes majeurs phylogénétiquement distincts (Bonnet, 2004).
- Le second nouveau groupe de BLSE se caractérise par un haut niveau de résistance à la ceftazidime et parfois à l'aztréoname ; ces β -lactamases ont notamment été détectées chez *P. aeruginosa* ; on distingue VEB-1, PER-1 ou bien GES-1.

A l'heure actuelle, à la différence des BLSE de classe A, les carbapénémases de classe A restent rares et ne sont isolées que dans certaines régions du globe. On y distingue deux groupes : les enzymes qui entraînent un haut niveau de résistance à l'égard des céphalosporines de 3^{ème} génération, telles que KPC-1 ou GES-2 et celles qui entraînent une résistance à l'aztréoname et une sensibilité seulement diminuée à l'égard des céphalosporines de 3^{ème} génération, telles que SME-1 ou NMC-A (Arlet et Philippon, 2003).

Les enzymes de classe B.

Ce sont des métallo-enzymes dépendantes du zinc (Zn^{2+}). Elles sont chélatées par l'EDTA. Leur particularité est de conférer une résistance aux carbapénèmes aux bactéries qui les produisent. Elles sont apparues au début des années 1990 et leur diffusion est désormais mondiale.

Deux principaux groupes phylogénétiquement distincts constituent cette classe en pleine évolution : les enzymes de type IMP et les enzymes de type VIM. Décrites initialement chez *Serratia marcescens*, en Asie, elles ont été rapportées, depuis, chez de nombreuses espèces d'entérobactéries, ainsi que chez des bactéries opportunistes, souvent responsables d'infections nosocomiales, telles que *P. aeruginosa* et *A. baumannii* (<http://lahey.org/studies/webt.asp>). Une des caractéristiques de ces enzymes est leur support génétique ; en effet, les gènes codant pour ces β -lactamases sont retrouvés sur des cassettes au sein d'intégrons. La mobilisation de ces structures mobiles contribue à la très large diffusion de ce type de résistance (Nordmann et Poirel, 2002).

Les enzymes de classe C.

L'évolution de cette classe a été marquée par l'apparition de céphalosporinases AmpC dont le spectre s'étend aux céphalosporines de 4^{ème} génération, molécules pourtant réputées pour être stables vis-à-vis de ces enzymes (Mammeri *et al.*, 2004, Barnaud *et al.*, 2004).

La seconde évolution de cette classe a été l'apparition, au début des années 1990, de β -lactamases AmpC codées par des gènes plasmidiques. Ces enzymes déterminent un phénotype de résistance comparable à celui des céphalosporinases d'origine chromosomique hyperproduites. Ces β -lactamases ont été isolées de nombreuses espèces bactériennes. L'analyse moléculaire de ces enzymes a conduit à une classification en cinq ou six clusters, traduisant la diversité de ces β -lactamases, telles que CMY-1, MIR-1, ACT-1, FOX ou DHA-1 (Philippon *et al.*, 2002). Les plasmides qui portent ces gènes sont également le support d'autres gènes de résistance aux antibiotiques (aminosides, chloramphénicol ou tétracyclines). Certains d'entre eux ont même pu être mis en évidence en association avec d'autres gènes de β -lactamases.

Les enzymes de classe D.

Cette classe correspond aux oxacillinases. Ces enzymes hydrolysent très fortement l'oxacilline et ses dérivés ; elles sont plus ou moins fortement inhibées en présence de NaCl (Arlet et Philippon, 2003). Elles ont surtout été décrites chez *P. aeruginosa*. Toutefois, l'émergence de nouvelles oxacillinases avec un élargissement de spectre, ainsi que la diffusion importante au sein des

espèces bactériennes, confèrent à ces enzymes un intérêt majeur. Elles présentent, par ailleurs, une grande diversité sur le plan moléculaire. Ces oxacillinases à spectre étendu sont le plus souvent codées par des gènes présents sur des structures génétiques mobiles, telles que des intégrons (Nordmann et Poirel, 2002). Depuis le début des années 1990, de nombreuses enzymes de cette classe, entraînant une résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération voire aux carbapénèmes, ont été décrites chez *P. aeruginosa* ou *A. baumannii*. Toutefois, récemment, une nouvelle oxacillinase : OXA-48, codée par un gène plasmidique, a été isolée d'une souche de *K. pneumoniae* résistante à l'imipénème. Après OXA-23 chez *Proteus mirabilis*, c'est la deuxième oxacillinase hydrolysant les carbapénèmes, retrouvée chez les entérobactéries (Poirel *et al.*, 2004).

II.2.2- Données actuelles sur la régulation de l'expression des gènes codant pour les β -lactamases :

II.2.2.1- Les enzymes constitutives.

Depuis le début des années 1980, la présence de nombreuses mutations au sein des promoteurs des gènes de β -lactamases a été rapportée (Fournier *et al.*, 1999, Caniça *et al.*, 1997). Certaines mutations, touchant les régions -35 et -10, affectent parfois négativement les fonctions du promoteur et sont dénommées "down-mutations". Au contraire, de nombreuses mutations sont capables d'augmenter les interactions promoteur/ARN-polymérase et donc le niveau de transcription du gène (Lartigue *et al.*, 2002) ; elles affectent généralement des promoteurs dont les séquences -35 et -10 étaient initialement assez éloignées des séquences consensus (Jaurin *et al.*, 1982). Soixante-quinze pour cent des mutations retrouvées chez 112 promoteurs bactériens étudiés par Hawley et McClure étaient détectés au niveau des séquences conservées -35 et -10 (Hawley et McClure, 1983) ; toutefois, ces auteurs suggéraient que d'autres bases, situées en dehors des séquences consensus, notamment en position -42, pourraient jouer un rôle dans la force du promoteur. Par ailleurs, l'augmentation ou la diminution de la distance entre les deux séquences conservées, par rapport à la distance optimale de 17 paires de bases, réduit aussi la force du promoteur (Beutel et Record, 1990).

II.2.2.1.1- Les enzymes de type TEM.

L'hyperproduction des enzymes de type TEM a été largement étudiée, car c'est une cause majeure de résistance à l'association amoxicilline + acide clavulanique chez les entérobactéries (Lartigue *et al.*, 2002, Leflon-Guibout *et al.*, 2000).

Quatre promoteurs différents, contrôlant l'expression du gène *bla*_{TEM}, ont été décrits à ce jour :

- le premier promoteur : P3 correspond à celui du gène *bla*_{TEM-1a}, localisé sur le transposon Tn3 et le plasmide pBR322.
- le deuxième promoteur : Pa/Pb, retrouvé en amont du gène *bla*_{TEM-2}, est en réalité composé de deux régions promotrices chevauchantes, les deux nucléotides de la Pribnow box de Pa correspondant aux deux derniers de la région -35 de Pb ; la création de ce nouveau promoteur est due à une mutation ponctuelle C→T, en position -32 (**Figure 17**)

Figure 17 : Séquences des promoteurs Pa et Pb des gènes *bla*_{TEM}.

-35 Pb -10 Pb

TTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCTATTTTTATAGGTTAATGT

-35 Pa -10 Pa

Les régions promotrices de Pa sont en bleues et soulignées. Les régions promotrices de Pb sont en rouge. Les 2 nucléotides en vert correspondent à la région chevauchante de ces deux promoteurs, les deux dernières bases de la région -35 de Pb et les deux premières de la région -10 de Pa.

- le promoteur P4 diffère de P3 par une substitution en position 162 (G→T, numérotation de Sutcliffe), correspondant au premier nucléotide de la région -10 ; cette substitution entraîne une plus forte homologie avec la séquence consensus TATAAT.
- le dernier promoteur, appelé P5, possède la même Pribnow box que le promoteur P3, mais une région -35 qui présente une plus forte homologie avec l'hexamère consensus (TTGACA), en raison d'une nouvelle mutation décrite en position 141.

La force de ces promoteurs et l'impact réel sur la résistance aux β-lactamines a été établie grâce à un système isogénique, sur deux modèles de β-lactamases TEM-1 et IRT-2 (Lartigue *et al.*, 2002). L'analyse de 59 séquences de gènes *bla*_{TEM} codant pour des enzymes TEM-résistantes aux inhibiteurs a permis de montrer une grande variabilité génétique de ces enzymes, associée

avec les différents types de promoteurs (P3, Pa/Pb et P4). Les gènes codant pour ces enzymes sont en général couplés à un promoteur fort.

La très grande majorité de ces études a été réalisée chez *E. coli*. Toutefois, une hyperproduction de la β -lactamase TEM-1, liée à une mutation dans la box -10 (position 162), a également pu être mise en évidence chez *Shigella flexneri* (Siu *et al.*, 1997).

II.2.2.1.2- Les autres enzymes de classe A.

La β -lactamase SHV-1, codée par un gène chromosomique, retrouvée chez *K. pneumoniae*, possède un spectre d'activité hydrolytique proche de celui de l'enzyme TEM-1, avec une importante activité à l'égard de l'amoxicilline (Chaves *et al.*, 2001) ; dans la majorité des cas, des CMI d'amoxicilline comprises entre 8 et 64 mg/L correspondent à la production de cette β -lactamase naturelle.

Dès 1992, chez de rares souches, une diminution de la sensibilité à la ceftazidime était attribuée à l'augmentation de la production de SHV-1 (Petit *et al.*, 1992). L'implication de mutations au sein des régions promotrices (régions -35 et -10), en amont du gène SHV-1, a cependant été moins largement étudiée chez *K. pneumoniae* que chez *E. coli*. Récemment, l'étude moléculaire des hexamères situés en amont du gène SHV-1, chez une souche résistante à la ceftazidime, a permis de détecter une mutation de la deuxième base de la Pribnow box (C→A), suffisant à entraîner une augmentation de la force du promoteur d'un facteur 200 (Rice *et al.*, 2000).

K. oxytoca produit également une β -lactamase similaire, codée par un gène chromosomique. La résistance induite par l'expression de cette pénicillinase est une résistance de bas niveau. L'étude de mutants hyperproducteurs, résistants notamment à l'aztréoname, a permis de détecter des mutations en amont du gène *bla_{oxy}* correspondant. Le mécanisme probable de l'hyperproduction de la β -lactamase est une augmentation de la transcription, par mutation dans la région promotrice. Par analogie avec les études conduites sur d'autres β -lactamases, Fournier *et al.* ont décrit deux types de mutations différentes, à l'intérieur de la box -10 : une transversion G→T pour la première base ou une transition G→A pour la cinquième base (Fournier *et al.*, 1995). Ces deux mutations conduisent à un promoteur plus proche de la séquence consensus décrite pour *E.*

coli : TATAAT. La seconde mutation (G→A) est plus fréquemment retrouvée chez les souches hyperproductrices de OXY-1 (Fournier *et al.*, 1996). Les mutations dans la région -35 sont moins fréquentes ; cependant, elles existent et entraînent également une augmentation de la force du promoteur. La mutation rapportée est une transversion T→A au niveau de la quatrième base (TTGACA) avec, pour conséquence, une augmentation de transcription d'un facteur 22 (Fournier *et al.*, 1996). Des études par technique de gène reporter ont permis d'analyser l'implication de toutes ces mutations.

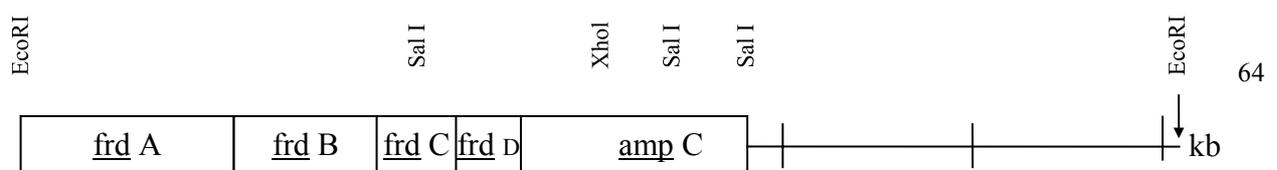
Toutes ces études ont permis de mettre en évidence, d'une part, la plus grande fréquence des mutations au niveau de la Pribnow box et, d'autre part, l'impact de la distance optimale inter-boxes de 17 paires de bases, expliquant notamment le niveau de résistance de ces souches à l'égard de l'aztréoname. De plus, on a démontré la très faible fréquence de l'association de mutations au sein des régions promotrices. Par ailleurs, les mutations en amont de la région -35 ne semblent pas avoir d'impact réel sur la transcription et le niveau de résistance (Fournier *et al.*, 1999).

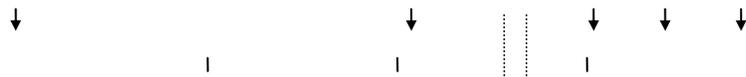
II.2.2.1.3- La β-lactamase AmpC de *E. coli*.

Le promoteur du gène de la céphalosporinase AmpC de *E. coli* obéit à la règle générale précédemment évoquée : il comporte lui aussi des séquences conservées -35 et -10. Dans les promoteurs des souches sauvages qui produisent cette céphalosporinase à très bas niveau, la région -35 comporte la séquence TTGTCA, alors que la région -10 présente la séquence TACAAT, ces deux régions étant séparées par 16 paires de bases (Jaurin *et al.*, 1981).

Par ailleurs, une des particularités de ce promoteur est la présence d'un atténuateur, dit transcriptionnel, probablement en grande partie responsable de la très faible expression du gène *ampC*, expliquant la très faible quantité d'enzyme produite et le niveau de résistance non détectable chez les souches sauvages. Cet atténuateur du gène *ampC* sert de terminateur de transcription pour l'opéron fumarate-réductase, qui contient quatre gènes (*frdA*, *frdB*, *frdC* et *frdD*). Le promoteur du gène *ampC* est localisé dans le dernier gène structural de cet opéron (Cole, 1984). En fait, la séquence codant pour les 12 acides aminés de l'extrémité C-terminale du gène *frdD* et le promoteur du gène *ampC* se chevauchent (Bergström *et al.*, 1983) (**Figure 18**).

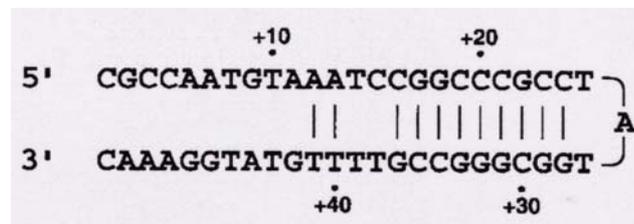
Figure 18 : Structure de l'opéron fumarate-réductase chez *E. coli*, d'après Bergström *et al.* (1983).





Cet atténuateur possède une structure du type "épingle à cheveux" (**Figure 19**, p. 62) (Siu *et al.*, 2003). Il présente une structure tout à fait classique, puisque 85 % des atténuateurs étudiés chez *E. coli* présentent une tige de 7 (+/- 3) paires de bases et une boucle de 4 (+/- 1) paires de bases, suivie d'une région riche en U (Wilson et von Hippel, 1995). L'atténuateur idéal présenterait une tige de 8 ou 9 paires de bases, riche en GC, avec une boucle de 4 à 8 résidus. Une taille trop petite ou trop importante de la tige diminue, voire abolit, l'efficacité de terminaison.

Figure 19 : Séquence de l'atténuateur du gène *ampC* : représentation de la structure dite en épingle à cheveux, d'après Siu *et al.* (2003).



Les mutations décrites dans le promoteur du gène *ampC* de *E. coli* ont pu être observées, d'une part, chez des mutants résistants obtenus *in vitro* (Jaurin *et al.*, 1982) et, d'autre part, à partir de souches cliniques (Siu *et al.*, 2003, Low *et al.*, 2001, Caroff *et al.*, 2000, Caroff *et al.*, 1999, Olsson *et al.*, 1983 et Olsson *et al.*, 1982).

Ainsi, par sélection sur des milieux contenant de l'ampicilline, il a été possible d'isoler des mutants hyperproducteurs de céphalosporinase AmpC. Trois types différents ont pu être obtenus : des mutants en position -32 (box -35), des mutants en position -11 (Pribnow box) et des mutants ampP15G16, présentant une insertion d'une paire de base, augmentant la distance intergénique entre les séquences conservées (Jaurin *et al.*, 1982).

Au début des années 1980, Olsson *et al.* ont séquencé la région promotrice du gène de six β -lactamases AmpC provenant de souches cliniques présentant des concentrations minimales inhibitrices à l'égard de l'ampicilline comprises entre 38 et 190 mg/L. L'analyse de ces séquences a permis de mettre en évidence différentes mutations situées en positions -88, -82, -42, -32, -18, -1 et +58. Plus récemment, Caroff *et al.* ont retrouvé, chez des souches cliniques, les mêmes mutations en positions -88, -82, -42, -32, -18, -1 et +58, mais également des mutations dans l'atténuateur, en positions +24 et +31.

La mutation en position -42 constitue, semble-t-il, l'événement génétique le plus fréquent, suivi par la mutation en position -32. Ces deux mutations n'ont cependant jamais pu être mises en évidence au sein d'un même promoteur, alors que chacune d'entre elle a pu être identifiée en association avec d'autres mutations, y compris au sein de l'atténuateur.

Par la suite, le développement des méthodologies de gène reporter et de mutagenèse dirigée a permis d'affirmer l'impact réel de ces mutations ponctuelles sur la régulation transcriptionnelle. Ainsi, la présence de certaines mutations entraîne une hyperproduction majeure de la céphalosporinase AmpC, avec une extension de la résistance à certaines céphalosporines de troisième génération.

Par ailleurs, Low *et al.* ont rapporté l'isolement de mutants en cours de traitement par le céfotaxime, avec apparition de mutations dans l'atténuateur, associées ou non à une mutation dans la région promotrice du gène (Low *et al.*, 2001). Siu *et al.* ont décrit, chez deux patients, un échec de traitement par oxyimino-céphalosporines, consécutif à l'émergence d'une souche hyperproductrice de β -lactamase AmpC, en relation avec des mutations et insertions de nucléotides entre les boxes -35 et -10 (Siu *et al.*, 2003).

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le surenroulement de l'ADN dans certaines parties du chromosome bactérien peut aussi affecter la capacité de fixation de l'ARN-polymérase au promoteur bactérien et, en conséquence, le niveau de production de la céphalosporinase AmpC, comme il a été rapporté par Shimamoto *et al.*, en 1994 (Shimamoto *et al.*, 1994).

Enfin, la répétition du gène *ampC* sur le chromosome bactérien peut également intervenir sur le niveau d'expression de l'enzyme correspondante, mais elle a été surtout retrouvée chez des mutants de laboratoire (Edlund *et al.*, 1979).

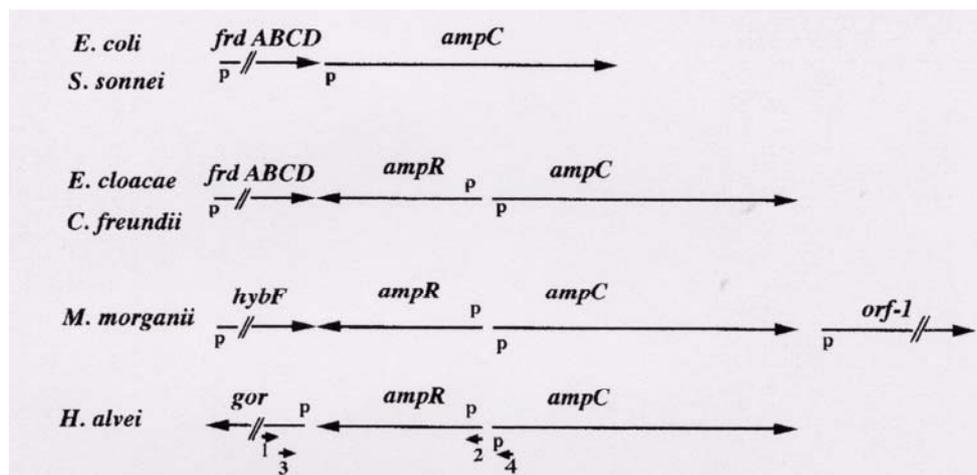
II.2.2.2- Les enzymes inductibles.

La majorité des enzymes de classe C sont dites inductibles ; elles sont synthétisées en grande quantité, uniquement en présence de composés inducteurs (Bennett et Chopra, 1993). Les principaux exemples sont les β -lactamases de *Enterobacter aerogenes* (Preston *et al.*, 2000), *Citrobacter freundii* (Barlow et Hall, 2002), *Serratia marcescens* (Mahlen *et al.*, 2003), *Morganella morganii* (Barnaud *et al.*, 1997), *Hafnia alvei* (Girlich *et al.*, 2000). Les molécules inductrices peuvent être des antibiotiques eux-mêmes. Trois β -lactamines ou apparentés sont d'excellents inducteurs : la céfoxitine, l'imipénème et l'acide clavulanique.

Chez ces bactéries, l'environnement génétique du gène *ampC* est caractérisé par l'association de différents gènes sur le chromosome bactérien (**Figure 20**, p. 64) :

- le gène *ampR* code pour une protéine appartenant à la famille des régulateurs transcriptionnels LysR (Lindberg *et al.*, 1985) ;
- le gène *ampD* code pour une amidase ;
- le gène *ampG* code pour une perméase.

Figure 20 : Environnement génétique de différentes β -lactamases AmpC, d'après Girlich *et al.* (2000).



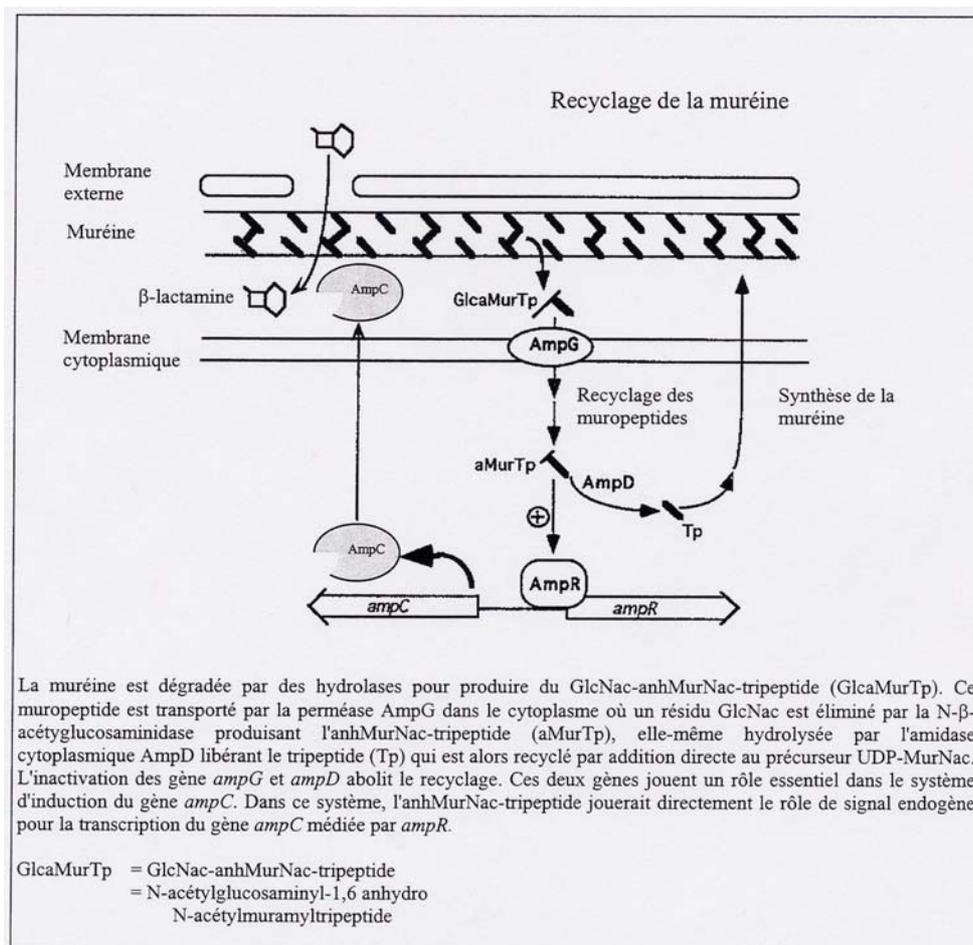
La similitude de l'organisation génétique de l'ensemble de ces gènes suggère un mode de régulation identique, concernant l'expression de la résistance chez ces entérobactéries.

Les mécanismes à la base de l'induction sont maintenant bien connus. En présence d'antibiotique inducteur, le produit du gène *ampR* joue le rôle d'un activateur transcriptionnel, alors qu'en l'absence d'inducteur, il joue le rôle de répresseur (Bennett et Chopra, 1993).

Ces mécanismes de régulation de l'expression des β -lactamases de type AmpC ont été étudiés surtout chez *E. cloacae* et *C. freundii*. La régulation transcriptionnelle du gène *ampC* est assurée par le gène *ampR* adjacent. L'élucidation du rôle précis joué par les deux autres gènes : *ampD* et *ampG*, dans les mécanismes de l'induction et l'interaction entre mécanismes d'induction et recyclage de la muréine, est de découverte plus récente (Jacobs *et al.*, 1997) (**Figure 21**, p. 65).

L'activité régulatrice du gène *ampR* est fortement liée au recyclage du peptidoglycane. Les muropeptides anhydres, libérés à partir du peptidoglycane, sont transportés dans le cytoplasme *via* la perméase transmembranaire AmpG. Dans le cytoplasme, ces derniers agissent comme un signal sur le gène *ampR*, ce qui entraîne une augmentation de la transcription, l'amidase cytosolique AmpD jouant alors un rôle essentiel dans le recyclage des muropeptides (Bagge *et al.*, 2002). Ainsi, le gène *ampD* entraîne une régulation négative de l'expression de la β -lactamase.

Figure 21 : Interconnexion entre le recyclage de la muréine et l'induction des β -lactamases AmpC, d'après Jacobs *et al.* (1997).



Des mutations dans le gène régulateur *ampD* peuvent aussi entraîner une augmentation très importante du niveau d'expression du gène *ampC* chez *C. freundii* ou *E. cloacae* (Kopp *et al.*,

1993, Korfmann et Sanders, 1989), conférant alors une résistance étendue aux céphalosporines de troisième génération (Poirel *et al.*, 1999).

Chez *P. aeruginosa*, une séquence d'insertion IS1669 a été mise en évidence dans le gène *ampD*, conduisant également à une très forte hyperproduction de AmpC, par une perte totale de l'activité de AmpD (Bagge *et al.*, 2002). Toutefois, chez certaines souches de *P. aeruginosa* hyperproductrices de AmpC, aucune modification génétique n'a été retrouvée. Les études moléculaires de la région inter-génique *ampC-ampR* n'ont pas permis de retrouver de mutations. Il semble que certaines souches hyperproduisant leur β -lactamase AmpC présentent alors des mutations dans le gène *ampR*.

Ce type de mutation est rarement retrouvé chez *P. aeruginosa*, bien qu'elle entraîne une augmentation considérable de la production de l'enzyme (Bagge *et al.*, 2002). Chez *E. cloacae*, ces mutations ont été rapportées dans une région très conservée du gène *ampR* (acides aminés 128 à 135). AmpR devient alors un régulateur positif de AmpC avec, chez *E. cloacae*, une activité de la β -lactamase augmentée d'un facteur 450 (Kuga *et al.*, 2000).

Par ailleurs, les régulations du gène *ampD* et de la perméase AmpG ne sont pas bien connues, alors que les deux enzymes interviennent dans le recyclage des mucopeptides. Des modifications dans l'expression transcriptionnelle de ces gènes pourraient aussi affecter la concentration en mucopeptides et donc l'activité de AmpR (Bagge *et al.*, 2002).

Récemment, une étude conduite sur la régulation de l'expression de la β -lactamase AmpC de *S. marcescens* a révélé la présence, dans la partie 5' non codante du gène *ampC*, d'une structure en épingle de 126 nucléotides, qui jouerait un rôle sur l'expression de ce gène. Cette régulation ne serait pas d'ordre transcriptionnel, mais interviendrait sur la demi-vie des ARNm, sur l'efficacité de la traduction et la stabilité de la protéine (Mahlen *et al.*, 2003).

Enfin, si les mécanismes de régulation des β -lactamases AmpC codées par des gènes chromosomiques commencent à être bien connus, il apparaît de plus en plus que la régulation des enzymes AmpC codées par des gènes plasmidiques s'avère différente. D'autres facteurs, tels que le nombre de copies du gène, l'environnement génétique et l'absence de gène *ampR*, pourraient influencer l'expression de ces β -lactamases (Reisbig *et al.*, 2003).

II.3- Autres mécanismes de résistance :

II.3.1- Modification des porines :

II.3.1.1- Rôle physiologique et structure des porines.

La paroi bactérienne des bactéries à Gram négatif est formée de deux membranes qui constituent une barrière contre les agressions physico-chimiques provenant du milieu extérieur. La survie et la croissance des bactéries sont assurées par le transport d'éléments indispensables, tels que les ions, les sels et les sucres. Les bactéries ont la capacité de se développer dans des conditions environnementales différentes, impliquant une gestion contrôlée de la perméabilité membranaire, notamment par la mise en place de systèmes de diffusion passive assurant l'entrée des nutriments. Les porines constituent une famille de protéines formant des canaux permettant la diffusion de nombreuses substances nutritives à travers la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Elles sont caractérisées par leur taille, leur nombre, leur spécificité de substrat (Pagès et Garnotel, 2003).

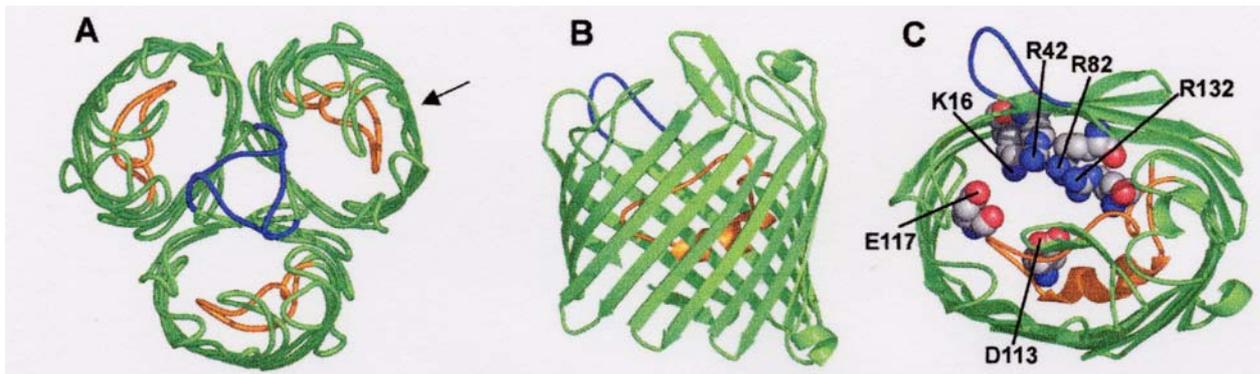
Les porines les plus étudiées sont les porines OmpF et OmpC de *E. coli*.

La famille des porines se subdivise en trois groupes :

- 1- les porines non spécifiques, avec comme représentant OmpF (porine la plus efficace, constituant les pores de plus grand diamètre chez *E. coli*), mais aussi OmpC, OmpD ou OmpK36 chez *K. pneumoniae* (Doménech-Sanchez *et al.*, 2003, Hernandez-Allés *et al.*, 1999) ;
- 2- les porines plus sélectives, impliquées dans la diffusion de sucres, comme LamB pour le saccharose (Nikaido, 2003) ;
- 3- les protéines qui forment des canaux pour l'entrée ou la sortie de diverses molécules, telles que TolC pour les antibiotiques (Nikaido et Zgurskaya, 2001).

OmpF présente une structure trimérique, représentée sur la figure 22. Elle est constituée de feuilletts β antiparallèles, insérés dans la membrane externe, ménageant un canal hydrophile avec une région de restriction située à mi-hauteur. Cette constriction organise un champ électrostatique avec deux croissants, l'un de charge négative (boucle L3) et l'autre de charge positive (acides aminés de la paroi). Cette structure en canal définit la sélectivité et la conductance de la porine (Nikaido, 2003).

Figure 22 : Structure de la porine OmpF de *Escherichia coli*, d'après Nikaido (2003).



A = représentation du trimère, vue du dessus, en bleu figure la boucle L2 qui joue un rôle dans les interactions entre les différentes sous-unités, en orange, les boucles L3,
B = représentation d'un monomère, vu du côté de la flèche noire,
C = représentation d'un monomère, vue de dessus montrant la constriction avec les acides aminés impliqués de la boucle L3 et de la paroi opposée.

II.3.1.2- Implication dans la résistance aux antibiotiques.

Chez les bactéries à Gram négatif, les exemples sont nombreux où des modifications de perméabilité agissent en synergie avec la production d'enzymes inactivatrices, pour augmenter le niveau de résistance aux β -lactamines (Dé *et al.*, 2001).

La réduction de la synthèse des porines est liée à des modifications dans les gènes de structures : délétions, mutations, présence de séquences d'insertions ; toutefois, le plus souvent, on observe une perte complète de la protéine elle-même.

La résistance de haut niveau aux carbapénèmes, souvent décrite chez *A. baumannii*, notamment dans des contextes d'épidémies nosocomiales, a pu être corrélée à une modification de porines. Ainsi, lors d'une épidémie en Espagne, où la seule présence d'une β -lactamase ne pouvait expliquer le niveau de résistance observé, l'étude conduite sur les protéines de membrane externe a permis de mettre en évidence la réduction de l'expression de deux porines, sans cependant en explorer le mécanisme moléculaire (Bou *et al.*, 2000). Plus récemment, la perte d'une porine de 23 ou 29 kDa, qui a été observée, a permis de confirmer la diversité des mécanismes impliqués dans la résistance aux carbapénèmes chez cette bactérie (Fernandez-Cuenca *et al.*, 2003, Limansky *et al.*, 2002).

De même, chez *P. aeruginosa*, la résistance isolée à l'imipénème est due à une modification de la porine OprD2, relativement spécifique de la pénétration de l'imipénème (Hancock et

Brinkman, 2002, Livermore, 2001). L'observation de mutants est fréquente, notamment lors de l'utilisation de ce carbapénème en monothérapie. La séquence de cette protéine présente des boucles caractéristiques, comme celle des porines OmpF et OmpC de *E. coli*. Il semble que des mutations au sein de ces structures affectent négativement la perméabilité du canal formé. Des délétions dans les boucles 2 et 3 produisent une protéine dont le canal ne facilite plus la diffusion de l'imipénème (Nikaido, 2003). Par ailleurs, il a été récemment démontré que l'élution de zinc, à partir des biomatériaux constituant les sondes urinaires siliconées, entraînerait une diminution de l'expression de la porine Opr D2 (Conejo *et al.*, 2003).

Chez *K. pneumoniae*, la modification ou la perte des porines OmpK35-OmpK36 entraîne une imperméabilité facilement détectée par l'étude du comportement à l'égard de la céfoxitine (Doménech-Sanchez *et al.*, 2003). Des séquences d'insertions telles que IS1, IS26, IS5 ou IS903 ont été localisées dans différents sites du gène *ompK36*. Ces IS ont été retrouvées chez des mutants obtenus *in vitro*, ainsi que chez des souches isolées de patients (Hernandez-Allés *et al.*, 1999). Cette observation rappelle le rôle de ces éléments mobiles dans l'interruption de gènes ou leur expression. Par ailleurs, les mêmes auteurs ont rapporté la possibilité de détecter des mutations ponctuelles, des petites délétions ou des délétions plus importantes dans les gènes de porines. Ainsi, les souches ayant des modifications concernant les deux porines majeures de *K. pneumoniae* montrent une augmentation modérée des CMI à l'égard des β -lactamines (Hernandez-Allés *et al.*, 2000). Une résistance associée aux fluoroquinolones, de faible niveau, peut également résulter de la perte de OmpK36.

Récemment, chez un patient colonisé par *E. aerogenes*, soumis à un traitement par imipénème, on a montré une disparition d'une porine, responsable d'une résistance par imperméabilité. A l'arrêt du traitement, une réapparition de la porine a pu être observée chez des bactéries redevenues sensibles (Bornet *et al.*, 2000).

II.3.1.3- Régulation de la synthèse des porines.

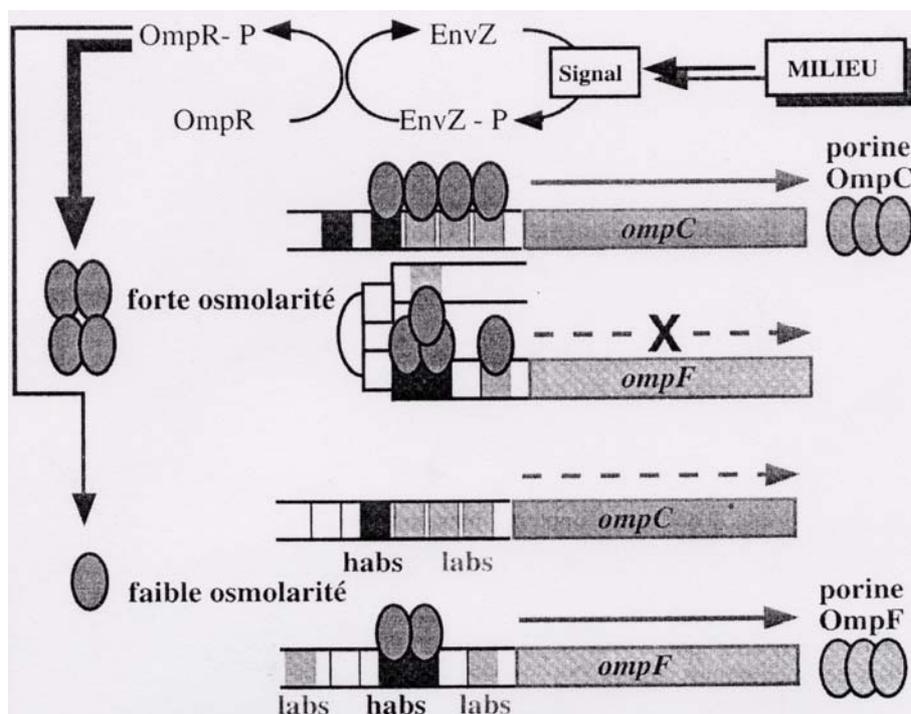
L'existence de plusieurs porines chez une même bactérie rend difficile la compréhension des mécanismes régulant leur expression. Si l'une des porines est inactivée, cette multiplicité permet à d'autres d'être surexprimées, pour compenser les effets de l'inactivation.

Ainsi, chez *E. coli*, OmpF est la porine la plus efficace, constituant les pores de plus grand diamètre. Elle est donc la plus apte à assurer l'approvisionnement de la bactérie, lors de conditions de carence (Nikaido, 2003). A l'inverse, OmpC possède un canal plus étroit qui

favorise une diffusion lente et restrictive. Dans les conditions de son habitat intestinal naturel (pression osmotique importante et forte température), OmpC est favorisée et l'expression de OmpF est réprimée.

Le premier système régulateur correspond au système d'osmorégulation à deux composants EnvZ-OmpR, qui intervient au niveau de la transcription, pour gouverner l'expression des porines. EnvZ est une protéine détectant les variations de l'osmolarité. Lors d'un signal de l'environnement extérieur, cette protéine transmet l'information, par phosphorylation du régulateur OmpR, qui présente une affinité élevée vis-à-vis de sites situés en amont de la région promotrice des gènes de porines (**Figure 23**, p. 70). A faible osmolarité, la faible proportion de OmpR phosphorylée active la transcription de OmpF. Si la phosphorylation est importante, la fixation de ces molécules augmente la transcription de OmpC et réprime OmpF (Nikaido, 2003).

Figure 23 : Régulation de l'expression des porines OmpF et OmpC chez *Escherichia coli* par osmorégulation, d'après Pagès J.M (2000).



Un autre facteur de l'environnement semble agir grâce à ce système EnvZ-OmpR : le pH du milieu. A pH acide, proche de 5, la production de OmpF est réprimée au profit de l'augmentation de l'expression de OmpC (Nikaido, 2003).

De même, la température semble avoir un impact, par le biais du gène *micF*. Ce dernier code pour un petit ARNm anti-sens, localisé en amont du gène OmpC et transcrit dans la direction opposée. Ce petit ARN se lie à la région 5' des ARNm de OmpF et inhibe sa traduction, par déstabilisation (Nikaido, 2003).

Enfin, dans le tractus digestif, les conditions d'anaérobiose modifient l'osmorégulation des porines OmpF et OmpC. Chez *E. coli*, dans ces conditions, OmpC est exprimée à un plus haut niveau que OmpF. D'autres protéines, comme OmpX, interagissent au niveau de la transcription, en bloquant la synthèse des ARNm de OmpF.

Toutes ces voies de régulation, grâce à de nombreux signaux, se superposent et assurent un contrôle efficace de l'expression génétique des porines.

II.3.2- Systèmes d'efflux actif :

II.3.2.1- Structure et fonctionnement.

Les systèmes d'efflux actif sont des mécanismes de transport membranaire très répandus chez les organismes procaryotes. Physiologiquement, ils ont un rôle de détoxification du milieu intracellulaire, en exportant différentes substances nocives hors de la cellule bactérienne, telles que les antibiotiques (Li *et al.*, 1994), les inhibiteurs d'acides gras (Schweizer, 1998) et les solvants organiques (Li *et al.*, 1998). Le rôle de l'efflux dans les phénomènes de communication inter-bactéries, dénommés « quorum sensing », via l'exportation d'homosérine-lactone, a également été souligné (Pearson *et al.*, 1999).

Les différents systèmes d'efflux retrouvés chez les bactéries se distinguent les uns des autres par la spécificité des substances transportées, par leur structure, par le type d'énergie nécessaire à leur fonctionnement et, enfin, par leur expression génétique, de type constitutif ou inductible.

Ces caractéristiques différentes assurent une grande diversité des systèmes et donc leur possibilité d'intervention dans de nombreux processus physiologiques.

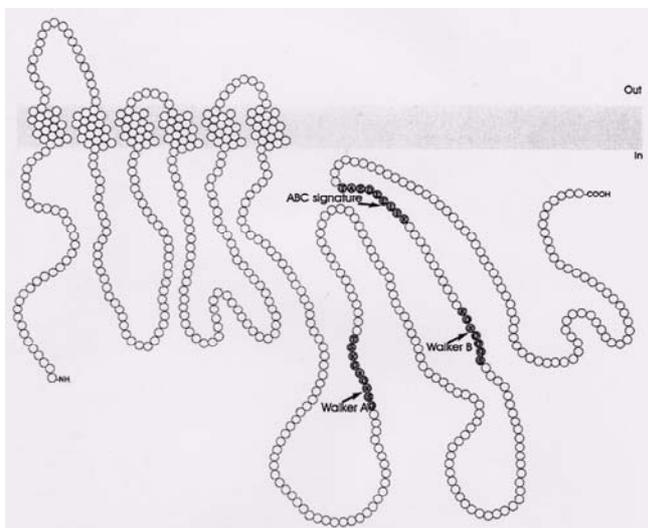
L'analyse des constituants de chaque système a permis de les regrouper en cinq grandes familles : les ABC transporteurs (ATP Binding Cassette - Saier, 1998), les RND (Resistance Nodulation cell Division - Saier *et al.*, 1994), les MFS (Major Facilitator Superfamily - Pao *et al.*, 1998), les SMR (Small Multidrug Resistance - Paulsen *et al.*, 1996) et les MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion family, Brown *et al.*, 1999).

Les ABC transporteurs :

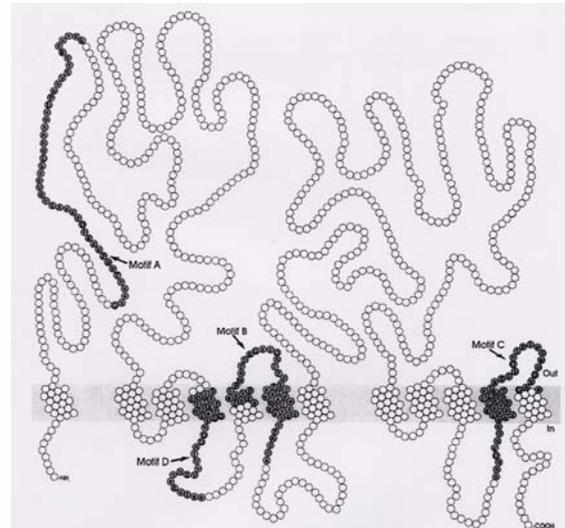
Toutes les protéines d'efflux ATP-dépendantes sont des membres de la superfamille des ABC transporteurs. En général, quatre domaines distincts définissent cette classe : deux domaines membranaires très hydrophobes, constitués de six hélices α trans-membranaires et deux domaines hydrophiles de liaison, comprenant les motifs "walkers" A et B, ainsi que la signature ABC (**Figure 24**, p. 72). La majorité des ABC transporteurs bactériens est responsable de l'extrusion d'antibiotiques. Le premier système a été décrit chez *Lactococcus lactis* (Putman *et al.*, 2000).

Figure 24 : Modèle de structure des différentes familles de systèmes d'efflux, d'après Putman *et al.* (2000). Les parties en gras sont conservées.

Structure des ABC transporteurs :
(ATP Binding Cassette transporteurs).

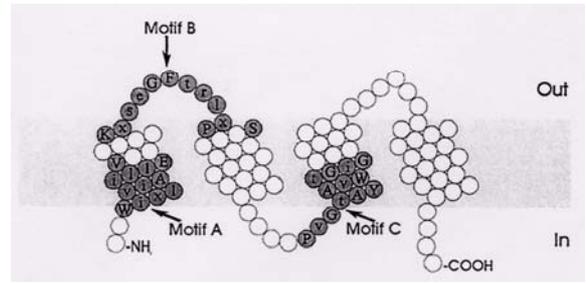
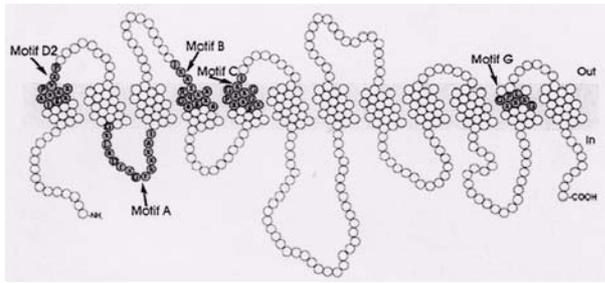


Structure des RND :
(Resistance Nodulation cell Division).



Structure des MFS :
(Major Facilitator Superfamily).

Structure des SMR :
(Small Multidrug Resistance).

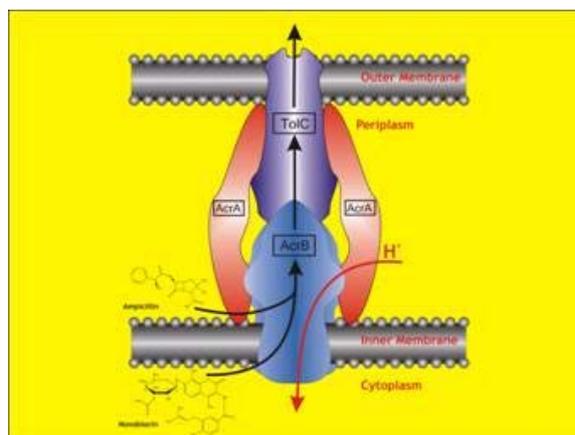


Les RND :

Les transporteurs multidrogues de la famille des RND interagissent avec une protéine de fusion membranaire et une porine, pour le transport des antibiotiques à travers les membranes externe et interne des bacilles à Gram négatif (**Figure 24**, p. 72). Le système AcrB de *E. coli* appartient à cette famille. Combinée à la protéine de fusion AcrA, la protéine AcrB exporte des antibiotiques et, notamment, des β -lactamines *via* le canal membranaire TolC (**Figure 25**) (Nishino *et al.*, 2003).

A ce jour, cinq systèmes d'efflux utilisant un transporteur de la famille RND ont été mis en évidence chez *P. aeruginosa* : MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM et MexJK-OprM.

Figure 25 : Système d'efflux AcrAB-TolC chez *Escherichia coli*, d'après Nikaido et Zgurskaya (2001).



Les MFS :

La "Major Facilitator Superfamily" est subdivisée en deux sous-groupes, en fonction du nombre de segments trans-membranaires impliqués : 12 ou 14 (**Figure 24**, p.72). L'efflux NorA, spécifique de *Staphylococcus aureus*, est un des représentants de ces systèmes de transport multidrogues ; il appartient au groupe possédant 12 segments trans-membranaires ; il confère une résistance à des composés hydrophiles tels que la norfloxacine (Kaatz *et al.*, 1993).

Les SMR :

Les transporteurs multidrogues de la famille "Small Multidrug Resistance" constituent la plus petite structure de protéines d'efflux (**Figure 24**, p.72). Les gènes de résistance aux antiseptiques : *qacE* et son dérivé tronqué *qacEΔ1*, sont deux représentants de cette famille. Ils sont le plus souvent portés par des intégrons de classe 1. Cette particularité explique leur diffusion chez de nombreuses bactéries à Gram négatif.

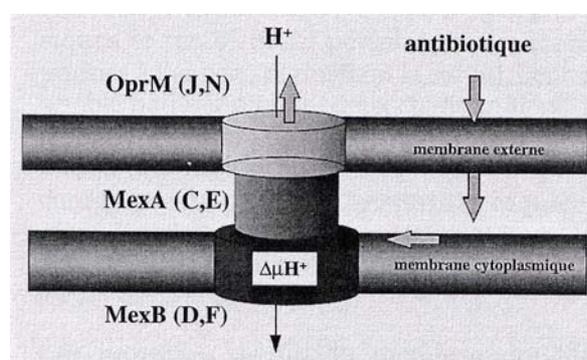
Ces systèmes d'efflux à trois composants protéiques ont été très étudiés chez *E. coli* et *P. aeruginosa*. Les deux entités les mieux connues sont les systèmes MexAB-OprM chez *P. aeruginosa* et AcrAB-TolC chez *E. coli*. Toutefois, des systèmes proches ont été décrits chez d'autres espèces bactériennes, où ils peuvent assurer l'extrusion de différentes classes d'antibiotiques (Nikaido, 1996).

- le premier élément est une protéine localisée dans la membrane cytoplasmique, qui constitue la pompe proprement dite ou transporteur, avec différents segments peptidiques hydrophobes trans-membranaires, reliés entre eux par des boucles hydrophiles extra-membranaires ;
- le second élément est une lipoprotéine, dite "de fusion membranaire", située dans l'espace périplasmique, capable de mettre la pompe en contact avec le troisième élément ;
- le dernier élément est une protéine tubulaire, enchâssée dans la membrane externe ; elle est reliée aux deux autres et forme un canal par lequel les antibiotiques sont rejetés dans le milieu extérieur (Nikaido, 1996, Wong *et al.*, 2001).

Ces structures génétiques requièrent de l'énergie pour fonctionner. Le processus d'efflux actif implique deux éléments principaux : l'énergie d'expulsion et le canal trans-membranaire qui oriente l'extrusion des antibiotiques. Par conséquent, la pompe tire son énergie du gradient électrochimique régnant de part et d'autre de la membrane cytoplasmique, et l'export d'une molécule d'antibiotique est couplé à l'entrée d'un proton dans le cytoplasme (Figure 26, Plésiat *et al.*, 1998).

Classiquement, la pompe AcrB ou MexB va fournir l'énergie de capture de l'antibiotique et transmettre cette molécule, *via* AcrA ou MexA, au canal formé par TolC ou OprM, qui réalise l'expulsion à l'extérieur de la cellule bactérienne.

Figure 26 : Structure générale des systèmes d'efflux de *Pseudomonas aeruginosa*, d'après Plésiat *et al.* (1998).



II.3.2.2- Organisation et régulation génétiques.

Pour la plupart, les systèmes d'efflux actif des bactéries à Gram négatif sont codés par des gènes chromosomiques. Le premier système décrit fut le système Tet, responsable de la résistance aux tétracyclines, fréquemment retrouvé chez les bactéries à Gram négatif (Speer *et al.*, 1992). Cependant, le support génétique peut également être un intégron de classe 1 qui possède souvent, en position 3', une cassette codant pour les gènes *qac* (*qacE* ou *qacEΔ1*), à l'origine de la résistance aux ammoniums quaternaires par efflux actif, ainsi qu'une cassette codant pour le gène *sul*, à l'origine de la résistance aux sulfamides (Paulsen *et al.*, 1993).

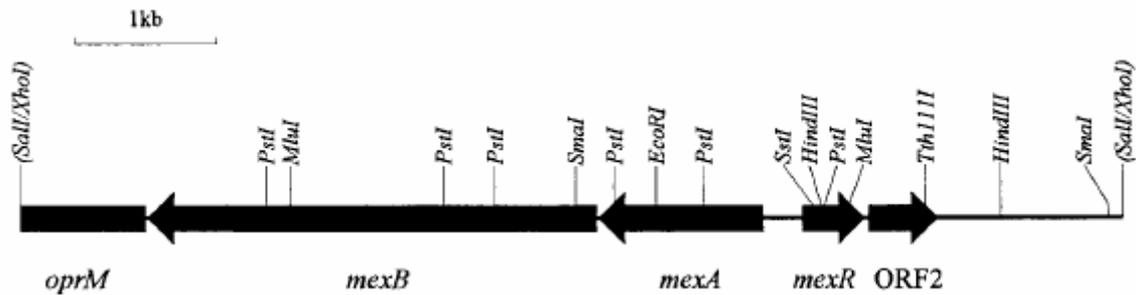
Chez les bactéries, la résistance multi-drogues, communément appelé "Mdr" (Multi drug resistance), est consécutive à l'efflux actif des antibiotiques. Ces gènes sont le plus souvent regroupés au sein d'opérons ou de régulons (George, 1996).

Chez *E. coli*, le système Acr comprend trois opérons non liés : *acrAB*, *acrEF* et *orfAB*, ainsi qu'un gène seul *acrD*, participant à l'efflux des aminoglycosides (Rosenberg *et al.*, 2000). L'opéron *acrAB* comprend un gène (> 100 kDa) codant pour une protéine AcrB composée de 12 hélices α trans-membranaires, assurant l'insertion dans la membrane cytoplasmique, un gène plus petit (40 kDa) codant pour la lipoprotéine AcrA, localisée dans l'espace périplasmique qui, couplée à une protéine de membrane externe : TolC, codée par un gène n'appartenant pas à l'opéron, assure l'efflux des antibiotiques comme les fluoroquinolones (Nishino *et al.*, 2003, Poole, 2000). Le dernier gène est le gène répresseur *acrR*.

Chez *P. aeruginosa*, les systèmes d'efflux sont codés par des gènes chromosomiques isolés ou bien rassemblés en opérons de trois éléments, constituant l'ensemble du système d'efflux (**Figure 27**, p. 76). Sur le plan génétique, le premier gène code pour la protéine de "fusion membranaire" : MexA, MexC, MexE, MexJ ou MexX, le deuxième code pour le transporteur : MexB, MexD, MexF, MexK ou MexY, le troisième code pour une protéine de membrane externe : OprM, OprN ou OprJ.

Le système le plus connu est celui qui est physiologiquement exprimé à bas niveau : MexAB-OprM. Il entraîne une résistance à l'égard des carboxypénicillines et des monobactames ; cependant, cette résistance ne se limite pas aux β -lactamines, mais concerne aussi les fluoroquinolones, le triméthoprime, les tétracyclines et le chloramphénicol. A l'inverse, MexCD-OprJ serait plus spécifique des céphalosporines de quatrième génération, MexEF-OprN entraînerait une résistance à l'égard des carbapénèmes et MexXY-OprM interviendrait dans la résistance aux aminosides. Bien évidemment, ces systèmes participent à l'extrusion d'autres familles d'antibiotiques.

Figure 27 : Cartographie des sites de restriction de l'opéron *mexA-mexB-oprM* et du gène régulateur *mexR* chez *Pseudomonas aeruginosa*, d'après Srikumar *et al.* (2000).



Chez différentes entérobactéries, comme *E. coli* ou *K. pneumoniae*, le système d'efflux AcrAB-TolC est régulé par un répresseur AcrR. Différentes mutations et petites délétions (11 ou 15 nucléotides) ont été décrites dans le gène *acrR*, responsables d'une hyperexpression de ce système d'efflux, chez *K. pneumoniae* (Scheiders *et al.*, 2003). Ces délétions dans des régions conservées du gène, ou bien l'accumulation de plusieurs substitutions, entraînent une résistance de bas niveau aux fluoroquinolones. La présence de mutations dans le gène *acrR* est responsable d'une hyperexpression de *acrAB* et, par conséquent, d'une augmentation de la multi-résistance aux antibiotiques (Okusu *et al.*, 1996, Nikaido, 1996).

De même, des conditions de stress pour la bactérie augmentent la transcription de AcrAB (George, 1996).

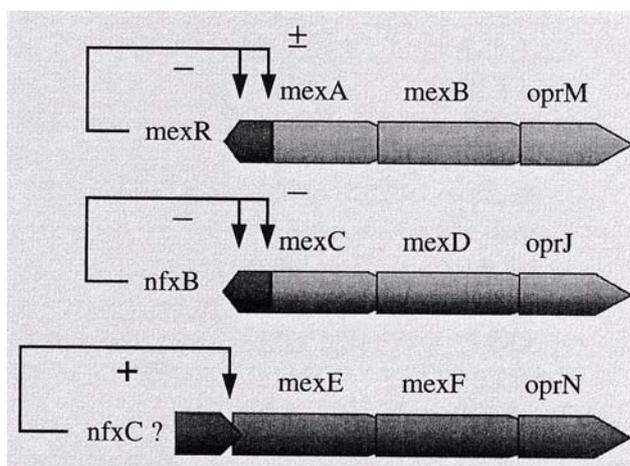
Par ailleurs, l'expression de ce système d'efflux est également augmentée chez les mutants Mar (Multiple antibiotic resistance) (Alekhshun et Levy, 1997). Le régulon impliqué, constitué de trois gènes transcrits dans le même sens (*marR*, *A*, *B*) et d'un quatrième transcrit en sens opposé (*marC*), participe à la régulation transcriptionnelle des systèmes d'efflux, mais aussi à celle des porines OmpF, par l'intermédiaire du gène *micF* (Alekhshun et Levy, 1997, George, 1996).

Ainsi, l'enchaînement de ces nombreuses cascades de régulation coordonne la mise en place des réponses au stress chez les bactéries.

De la même façon, chez *P. aeruginosa*, le système MexAB OprM est régulé négativement par le répresseur MexR (Adewoye *et al.*, 2002). Des souches présentant des mutations dans ce gène sont connues sous le nom de mutants *nalB* (Saito *et al.*, 1999). Le gène *mexR* est situé en amont de l'opéron et orienté en sens opposé (Figure 28, p. 77).

En revanche, le système MexEF-OprN est régulé positivement par l'activateur transcriptionnel MexT. Ce système est surexprimé chez les mutants *nfxC* qui sont résistants aux carbapénèmes (Köhler *et al.*, 1997).

Figure 28 : Schéma de l'organisation génétique et de la régulation des systèmes d'efflux de *Pseudomonas aeruginosa*, d'après Plésiat *et al.* (1998).



Le plus souvent, l'émergence de mutants d'efflux est favorisée par une exposition à différents antibiotiques et, en particulier, aux fluoroquinolones (Köhler *et al.*, 1997). La conséquence de la surexpression d'un système d'efflux est l'acquisition d'un phénotype de multirésistance, diminuant la sensibilité de la bactérie à différentes familles d'antibiotiques (Tableau V, p.78).

D'une façon générale, les augmentations de CMI associées à ces mutations dans les systèmes d'efflux restent modestes. Ainsi, chez *K. pneumoniae*, il a été montré que des souches présentant des mutations dans leur gène *acrR*, secondairement complétées par un gène *acrR* normal, voyaient leurs CMI aux fluoroquinolones réduites d'un facteur 2 à 4 seulement (Schneiders *et al.*, 2003) Plusieurs familles d'antibiotiques, sont cependant touchées, entraînant un phénotype de multirésistance. D'autre part, ces mutations agissent en synergie avec d'autres mécanismes et, notamment, des mécanismes enzymatiques, pour augmenter le niveau de résistance à certaines molécules.

d'efflux de *Pseudomonas aeruginosa*, d'après P. Plésiat (2002).

Systèmes d'efflux	Antibiotiques substrats
MexAB-OprM	FQ, Nal, Tet, Cmp, BL, Tmp
MexCD-OprJ	FQ, Tet, Cmp, Ery, BL
MexEF-OprN	FQ, Cmp, Tmp, BL
MexJK-OprM	Tet, Ery
MexXY-OprM	FQ, Tet, Ery, BL, AG

FQ : fluoroquinolones, **Nal** : acide nalidixique, **Tet** : tétracyclines, **Cmp** : chloramphénicol, **Ery** : érythromycine,

BL : β -lactamines, **Tmp** : triméthoprime, **AG**: aminosides.

PARTIE EXPERIMENTALE

Nature et objectifs des recherches

Nos travaux de recherche, réalisés au cours des trois dernières années, ont essentiellement concerné l'étude de la régulation génétique de la production de différentes β -lactamases. Nous nous sommes intéressés à plusieurs enzymes couramment impliquées dans les phénomènes de résistance aux β -lactamines, quotidiennement observés en Bactériologie médicale. Ces enzymes avaient en commun d'être toutes produites sur un mode constitutif, mais les méthodes mises au point pourraient également être utilisées pour étudier des enzymes inductibles, ainsi que d'autres mécanismes de résistance. D'ailleurs, nos travaux principaux concernant la résistance par inactivation enzymatique ont été complétés par une application à l'étude de la régulation d'un mécanisme d'efflux chez *P. aeruginosa*, également rapportée ici.

Ces travaux se sont inscrits dans la continuité d'études antérieures réalisées dans l'équipe de Recherche où nous avons été accueilli, afin d'analyser la régulation transcriptionnelle de la

céphalosporinase AmpC de *E. coli*. Lors de notre DEA, l'investigation d'un large échantillonnage de souches cliniques de *E. coli* hyperproductrices de céphalosporinase nous avait permis de mettre en évidence une mutation dans la Pribnow box en amont du gène *ampC*, qui n'avait été précédemment décrite que chez des mutants sélectionnés *in vitro*. Notre travail de Thèse a donc débuté par l'étude de l'impact de cette mutation, par application d'une technique de gène reporter, précédemment développée au laboratoire. Ce travail est présenté dans l'**article n°1**.

Toutefois, les techniques de gènes reporter s'avèrent longues et fastidieuses, nécessitant notamment plusieurs étapes de clonage. De plus, il s'agit d'un système totalement artificiel, qui permet, certes, de comparer la force de différents promoteurs, mais ne préjuge pas précisément de la régulation *in vivo*, dans un environnement génétique complexe.

C'est pourquoi, afin de conforter les résultats obtenus avec le système de gène reporter et de confronter le génotype et le phénotype observés, nous nous sommes alors orientés vers l'évaluation des ARNm spécifiques du gène *ampC* de *E. coli*, par mise au point d'une technique de RT-PCR. Après avoir testé différentes conditions d'extraction des ARN bactériens, nous avons donc initialement développé une RT-PCR classique avec standard externe puis, grâce à de nouvelles possibilités techniques, nous avons confirmé les résultats obtenus, par RT-PCR en temps réel. Ces travaux sont présentés dans l'**article n°2**.

Les moyens techniques développés et les connaissances acquises dans l'étude de la céphalosporinase AmpC de *E. coli* nous ont alors conduit à nous intéresser à la régulation de l'expression d'une autre β -lactamase, apparemment proche, également produite sur un mode constitutif : la céphalosporinase AmpC de *A. baumannii*, bactérie opportuniste responsable d'infections nosocomiales, dans le traitement desquelles les β -lactamines jouent un rôle important. Aucune donnée sur la régulation génétique de cette enzyme n'était alors disponible dans la littérature ; seule la séquence du gène *ampC* d'une souche multi-résistante, responsable d'une épidémie en Espagne, avait été récemment publiée (Bou *et al.*, 2000). L'apport de la technique de RT-PCR nous a permis d'observer des différences de niveaux d'expression de cette

céphalosporinase, en corrélation avec les phénotypes de résistance observés à l'égard des β -lactamines. Le séquençage de la région 5' non codante, en amont du gène *ampC*, a mis en évidence, non pas des mutations ponctuelles comme chez *E. coli*, mais la présence, chez les souches hyperproductrices de l'enzyme, d'une séquence d'insertion en amont du gène codant pour la β -lactamase. Cette séquence d'insertion semble jouer un rôle majeur en apportant un promoteur fort. Ce travail est présenté dans l'**article n°3**.

Afin d'élargir nos investigations à un autre type de β -lactamase constitutive, codée par un gène chromosomique, il nous est ensuite apparu intéressant d'étudier la régulation de la production de la β -lactamase SHV-1 de *K. pneumoniae*, autre bacille à Gram négatif d'isolement fréquent en Bactériologie médicale.

Nous avons alors sélectionné un échantillonnage de souches présentant un phénotype de résistance aux β -lactamines différent du phénotype sauvage déterminé par la production naturelle de SHV-1, afin d'y rechercher d'éventuelles souches hyperproductrices de β -lactamase par perturbation des mécanismes de régulation habituels. Nous avons donc séquençé la région promotrice du gène *SHV-1*. Les résultats obtenus sont présentés dans l'**article n°4** (article soumis au *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*). Cette étude a révélé l'implication d'autres mécanismes de résistance et, notamment, le rôle des modifications de porines pour expliquer les phénotypes observés.

En complément de travaux antérieurement réalisés au sein de l'équipe de Recherche, la méthodologie que nous avons développée, pour analyser la régulation génétique de diverses β -lactamases, nous a enfin permis d'élucider un phénomène de résistance non enzymatique aux β -lactamines. L'analyse des transcrits spécifiques a permis d'établir une relation directe entre le phénotype observé et le génotype décrit pour une souche de *P. aeruginosa* résistante à bas niveau aux β -lactamines, par un mécanisme d'efflux actif. Cette souche présentait une séquence d'insertion IS21 dans le gène répresseur *mexR* de l'opéron *mexAB-oprM* (**article n°5**).

Les articles publiés dans la littérature (ou soumis pour publication), à partir de ces travaux, seront introduits par une présentation succincte et suivis de quelques commentaires complémentaires sur la méthodologie choisie et les résultats obtenus.

I- Etude du promoteur du gène *ampC* chez une souche de *Escherichia coli* hyperproductrice de céphalosporinase : rôle d'une nouvelle mutation dans la Pribnow box.

I.1- Présentation :

Les β -lactamases de classe C sont synthétisées exclusivement par les bacilles à Gram négatif (Barlow *et al.*, 2002, Lindberg et Normark, 1986). La régulation génétique de leur synthèse a conduit à une subdivision en deux sous-classes : d'une part, les enzymes dites inductibles, regroupant la majorité d'entre elles telles que les β -lactamases de *C. freundii*, *S. marcescens*, *E. cloacae* ou *M. morgani*, ainsi que celle produite par *P. aeruginosa* et, d'autre part, les enzymes constitutives avec, comme représentant principal, la céphalosporinase AmpC de *E. coli* chez qui le gène répresseur *ampR* est absent.

L'absence de ce gène régulateur, associée à la présence d'une particularité structurale constituée par la présence d'un atténuateur (structure en "épingle à cheveux" inhibant la transcription), explique l'absence de résistance cliniquement décelable chez les souches sauvages, malgré la présence d'un gène *ampC* sur le chromosome (Wilson et von Hippel, 1995, Jaurin *et al.*, 1981). Toutefois, un certain nombre de souches cliniques peuvent devenir résistantes aux β -lactamines, par hyperproduction de la céphalosporinase AmpC, en raison de la présence de mutations dans le promoteur du gène *ampC*. Le rôle de deux mutations, en positions -32 et -42, a ainsi été antérieurement confirmé (Caroff *et al.*, 2000).

Au cours de notre DEA, le comportement de 33 souches de *E. coli*, présentant un phénotype à l'égard des β -lactamines compatible avec une hyperproduction de céphalosporinase, a été analysé. Par des méthodes rapides (restriction enzymatique, hybridation différentielle), les mutations les plus fréquentes ont été préalablement détectées (Caroff *et al.*, 1999). Par la suite, la région promotrice du gène *ampC* a été séquencé pour 8 souches chez lesquelles les mutations habituelles n'avaient pas été détectées, afin de rechercher d'éventuelles autres mutations ponctuelles, responsables du phénotype observé. Nous présentons ici l'étude du promoteur du gène *ampC* d'une souche comportant une nouvelle mutation dans la box -10 (ou Pribnow box), responsable d'une parfaite homologie avec la séquence consensus TATAAT.

I.2- Matériel et méthodes - Résultats :

Article 1 : **-11 mutation in the *ampC* promoter increasing resistance to β -lactams in a clinical *Escherichia coli* strain.**

Stéphane Corvec, Nathalie Caroff, Eric Espaze, Julie Marraillac, Alain Reynaud. (2002)
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **46**:3265-3267.

–11 Mutation in the *ampC* Promoter Increasing Resistance to β -Lactams in a Clinical *Escherichia coli* Strain

S. Corvec,^{1*} N. Caroff,² E. Espaze,¹ J. Marraillac,¹ and A. Reynaud²

Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Hygiène hospitalière, CHU,¹ and Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Faculté de Pharmacie, Université de Nantes,² Nantes, France

Received 25 January 2002/Returned for modification 6 May 2002/Accepted 19 July 2002

A mutation was discovered in the Pribnow box of the *ampC* promoter in a clinical *Escherichia coli* strain. This –11 C-to-T transition created a perfect homology with the –10 consensus sequence. The new promoter was cloned upstream of the *cat* gene of pKK232-8 and induced a sixfold increase in promoter strength.

The production of the AmpC β -lactamase in *Escherichia coli* is not inducible, as are most class C cephalosporinases, but is constitutive because of the absence of the *ampR* regulator gene. Consequently, in *E. coli* the level of transcription of the *ampC* gene depends mostly on the strength of the *ampC* promoter (8, 10).

E. coli promoters harbor two hexamers of conserved sequences, the –35 region and the –10 one, called the Pribnow box, which play an important role in the level of gene transcription (6). The –35 consensus sequence TTGACA and the –10 consensus sequence TATAAT have been defined. The closer to the consensus the sequences are, the stronger the promoter. The interbox distance also plays an important role in the transcription rate. Ideally, it is 17 bp long. In *E. coli* K-12, the *ampC* promoter differs from the consensus by one base in each box (–35 box, TTGTCA; –10 box, TACAAT) and the interbox distance is only 16 bp long. On the other hand, *ampC* promoter specificity is determined by the presence of an attenuator, which is a transcription terminator for the *frd* operon with a hairpin structure and which decreases the efficiency of the RNA polymerase and leads to low-level production of the enzyme (1, 4).

Clinical *E. coli* strains overproducing AmpC cephalosporinase have been described. Most of them presented a –42 mutation that created a new stronger and relocated upstream –35 box. –32 mutations creating a consensus –35 box have also been described (3).

In this paper, we report a clinical *E. coli* strain presenting a mutation in the Pribnow box, leading to the –10 consensus sequence.

(This study was presented at the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, Ill., 16 to 19 December 2001.)

E. coli strain 99004202 was isolated from a blood culture. MICs for various β -lactams (Table 1) were determined by the E-test method (AES Laboratory, Combourg, France). The presence of a TEM-type β -lactamase was detected in this strain using TEM-specific primers TEM A (5'GACTGGAT

GGAGGCGGAT3') and TEM B (5'CAATGCTTAATCAGTGAGGC3'), amplifying a 239-bp fragment. Cephalosporinase activity was measured using cephalothin as a substrate in a Beckman DU 7500 spectrophotometer and showed a fivefold increase for strain 99004202 compared with *E. coli* strain ATCC 25922.

Primers AB1 (5'GATCGTTCTGCCGCTGTG3') and AmpC2 (5'GGCAGCAAATGTGGAGCAA3') were used to amplify a 271-bp fragment from the *E. coli ampC* promoter containing the –35 box, the –10 box, and the attenuator (3). PCR amplification was performed using a Perkin-Elmer 480 DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Cergy-Pontoise, France) in a final volume of 50 μ l containing 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 200 μ M (each) nucleotides, 0.5 μ M (each) primer, 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Promega, Charbonnières, France), and 10 ng of target DNA. After 90 s of denaturation at 94°C, 30 PCR cycles were performed, each consisting of 30 s of denaturation at 94°C, 30 s of annealing at 57°C, and 60 s of extension at 72°C, followed by a final extension step of 7 min at 72°C. The PCR fragment was purified and sequenced with the ABI PRISM dye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Perkin-Elmer). Sequence analysis was performed on an ABI377 DNA sequencer (Perkin-Elmer).

The sequence of the promoter from strain 99004202 is presented in Fig. 1 and compared with the *E. coli* K-12 *ampC* promoter (7) and the promoter of a previously synthesized mutant, 96010266M (3), which only differs by the –11 mutation from the promoter of strain 99004202. This mutation can easily be detected by *Mae*III digestion. The restriction was performed at 55°C for 1 h in a final volume of 25 μ l containing 1 U of *Mae*III (Roche, Meylan, France) in 40 mM Tris-HCl–550 mM NaCl–12 mM MgCl₂–14 mM 2-mercaptoethanol (pH 8.2). Indeed, the –11 transition abolished one of the two restriction sites present in the PCR fragment and the variation in fragment size was detected on an 8% acrylamide gel (Fig. 2).

In order to study the role of the –11 mutation, both promoters were then compared in a gene reporter study. The 271-bp fragments of the *ampC* promoter from strains 99004202 and 96010266M were cloned in the post-PCR cloning vector pGEM-T easy (Promega). The plasmid DNA was digested with *Eco*RI and the fragment containing the *ampC* promoter was recovered from a low-melting-point agarose gel (Pro-

* Corresponding author. Mailing address: Service de Bactériologie-Virologie-Hygiène hospitalière, CHU de Nantes, 9 quai Moncousu, 44093 Nantes Cedex 01, France. Phone: 33.2.40.08.39.86. Fax: 33.2.40.08.38.29. E-mail: stephane.corvec@chu-nantes.fr.

TABLE 1. MICs of several β -lactams for *E. coli* strain 99004202

Antibiotic	MIC (mg/liter)
Amoxicillin	>256
Amoxicillin-clavulanic acid ^a	64
Ticarcillin	>256
Ticarcillin-clavulanic acid ^a	64
Piperacillin	32
Piperacillin-tazobactam ^b	2
Cephalothin	64
Cefuroxime	32
Cefoxitin	4
Cefotaxime	0.12
Ceftazidime	0.5
Imipenem	0.06

^a Clavulanic acid was added at 2 mg/liter.

^b Tazobactam was added at 4 mg/liter.

mega), blunt-ended with the Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase I (Promega), and ligated into the *Sma*I restriction site of pKK232-8 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) previously treated with calf intestinal phosphatase (Promega). The pKK232-8 reporter plasmid carrying the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene was used to clone the different *ampC* promoters of *E. coli* upstream of this CAT gene in order to study their strength. After overnight incubation at 16°C, the ligation products were used to transform JM109 highly competent cells (Promega). The sequence of the inserted fragment was verified using two primers from pKK232-8 (pKK1 [5'TGCGAAGCAACGGCCCG3'] and pKK2 [5'AAGCTTGGCTGCAGGTCGA3']), amplifying a 389-bp fragment containing the 271 bp from the *ampC* gene.

The chloramphenicol MIC from JM109 bacteria transformed with both constructions was determined by serial two-fold dilutions in Mueller-Hinton agar (Difco Laboratories, Detroit, Mich.). Inocula of 10⁴ CFU/spot from an 18-h culture in Mueller-Hinton broth were applied with a Steers multiple-inoculum replicator. After 18 h of incubation at 37°C, the chloramphenicol MIC was defined as the lowest concentration preventing bacterial growth on the plate.

CAT concentration from the different constructions was assayed in crude bacterial extracts prepared by sonication using a Branson sonifier 250 (Branson Ultrasonics, Danbury, Conn.) (intermittent exposure five times for 30 s each). Total protein concentration was determined by a pyrogallol red-molybdate

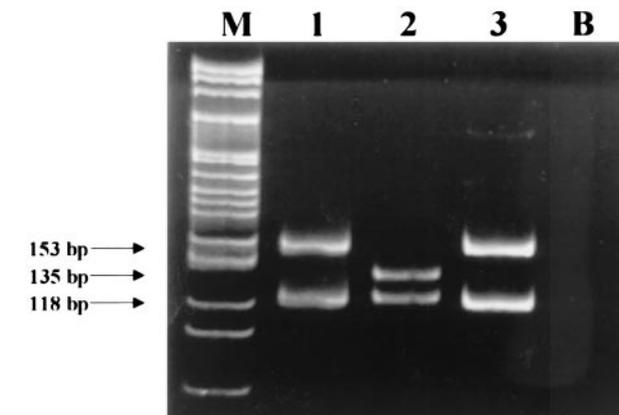


FIG. 2. Detection of the -11 mutation in the *ampC* gene promoter of *E. coli* by *Mae*III digestion. Lanes: M, molecular size marker; 1 and 3, *E. coli* strain 99004202 promoter; 2, strain ATCC 25922 promoter; B, blank.

method (Roche) (11). CAT enzyme was measured by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay test (Roche). Each measure was performed in triplicate. Untransformed JM109 bacteria and JM109 containing pKK232-8 without insert were used as controls.

The results of chloramphenicol MIC and CAT determinations are presented in Table 2. A 16-fold increase in chloramphenicol MIC and a 6-fold increase in CAT concentration were observed when the -11 mutation was present.

The sequence of the -35 and -10 hexamers and the inter-box distance are crucial for efficient binding of RNA polymerase, influencing the level of transcription of the gene. Furthermore, an interbox distance of 16 bp and the presence of a hairpin attenuator structure contribute to low-level transcription of the gene. Mutations have already been detected that create a -35 consensus sequence, TTGTCA. The new *ampC* promoter we described showed a mutation in the Pribnow box, leading to the -10 consensus sequence. Mutations in the Pribnow box have also been described in the promoters of other β -lactamase genes. In *Shigella flexneri*, the mechanism of hyperproduction of TEM-1 β -lactamase was found to be related to a point mutation in the Pribnow box (2). The same phenomenon was observed for the chromosomal β -lactamase of *Klebsiella oxytoca* (5). Recently, Rice et al. demonstrated by

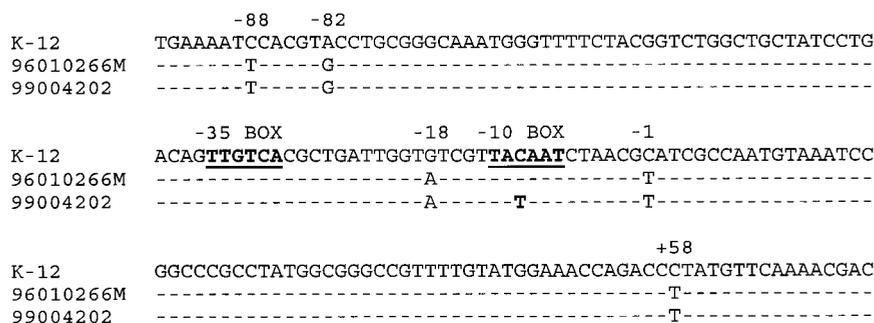


FIG. 1. *ampC* promoter sequence of *E. coli* K-12 (7), mutant strain 96010266M (3), and clinical isolate 99004202, a moderate-level AmpC producer.

TABLE 2. Comparison of the strength of the -11 mutated *ampC* promoter from *E. coli* strain 99004202 with that of the *ampC* promoter from strain ATCC 25922 and that from the mutant 96010266M (3)

Plasmid used to transform JM109 cells	Chloramphenicol MIC (mg/liter)	CAT level (pg/ μ g) ^a
None	8	4 \pm 0.5
pKK232-8 ^b	8	4 \pm 0.5
pKK232-8 (ATCC 25922) ^c	32	120 \pm 32
pKK232-8 (99004202) ^d	512	761 \pm 41
pKK232-8 (96010266M) ^e	32	95 \pm 8

^a Mean \pm standard deviation of three determinations of CAT concentration.

^b pKK232-8 without any insert.

^c pKK232-8 containing the *ampC* promoter from strain ATCC 25922 (low-level AmpC producer).

^d pKK232-8 containing the *ampC* promoter from strain 99004202 (moderate-level AmpC producer).

^e pKK232-8 containing the *ampC* promoter from the mutant 96010266M (3).

site-directed mutagenesis that a single base pair change in the Pribnow box resulted in a substantial increase in the ampicillin MIC of *Klebsiella pneumoniae* overproducing SHV-1 (12).

However, numerous *ampC* promoters have already been sequenced, and the -11 mutation in AmpC overproducers seems to be relatively rare compared to the -42 one. We demonstrated that a -11 substitution induced only a moderate increase of the promoter strength (6 \times), leading to a moderate increase in β -lactam MICs. These results confirmed those obtained in 1981 by Jaurin and Grundström with selected in vitro strains showing only a 7-fold increase in MICs with this mutation compared to a 21-fold increase with the -32 one (7). Low et al., studying the evolution of *E. coli* strains from multiple infected liver cysts, detected highly resistant strains (MIC for ceftazidime = 32 mg/liter) that also presented the -11 mutation in the *ampC* promoter, but it was always associated with one or two mutations in the attenuator loop and the exact effect of each one could not be determined (9).

Note that in the promoter of strain 99004202 the -11 mutation was associated with different sequence polymorphisms

previously detected in the -42 and -32 mutated *ampC* promoters, at the -88 , -82 , -18 , -1 , and $+58$ positions. It seems that *ampC* promoter mutations increasing the transcription rate occur on a specific genetic framework.

However, a great variability can be observed in the *ampC* promoters from enzyme overproducers, and, particularly, the role of mutations described in the attenuator hairpin and insertions increasing the interbox distance need to be studied in detail.

REFERENCES

1. Bergström, S., F. P. Lindberg, O. Olsson, and S. Normark. 1983. Comparison of the overlapping *fd* and *ampC* operons of *Escherichia coli* with the corresponding DNA sequences in other gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **155**:1297–1305.
2. Caniça, M. M., C. Y. Lu, R. Krihnamoorthy, and G. C. Paul. 1997. Molecular diversity and evolution of *bla*_{TEM} genes encoding β -lactamases resistant to clavulanic acid in clinical *E. coli*. *J. Mol. Evol.* **44**:57–65.
3. Caroff, N., E. Espaze, D. Gautreau, H. Richet, and A. Reynaud. 2000. Analysis of the effects of -42 and -32 *ampC* promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing AmpC. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:783–788.
4. Cole, S. T. 1984. Molecular and genetic aspects of the fumarate reductase of *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.* **12**:237–238.
5. Fournier, B., A. Gravel, D. C. Hooper, and P. H. Roy. 1999. Strength and regulation of the different promoters for chromosomal *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:850–855.
6. Hawley, D., and W. R. McClure. 1983. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **11**:2237–2255.
7. Jaurin, B., and T. Grundström. 1981. *ampC* cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of β -lactamases of the penicillinase type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:4897–4901.
8. Jaurin, B., T. Grundström, and S. Normark. 1982. Sequence elements determining *ampC* promoter strength in *E. coli*. *EMBO J.* **1**:875–881.
9. Low, A. S., F. M. McKenzie, I. M. Gould, and I. R. Booth. 2001. Protected environments allow parallel evolution of a bacterial pathogen in a patient subjected to long-term antibiotic therapy. *Mol. Microbiol.* **42**:619–630.
10. Nelson, E. C., and B. G. Elisha. 1999. Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:957–959.
11. Orsonneau, J. L., P. Douet, C. Massoube, P. Lustenberger, and S. Bernard. 1989. An improved pyrogallol red-molybdate method for determining total urinary protein. *Clin. Chem.* **35**:2233–2236.
12. Rice, L. B., L. L. Carias, A. M. Hujer, M. Bonafede, R. Hutton, C. Høyen, and R. A. Bonomo. 2000. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 β -lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:362–367.

I.3- Commentaires :

Il est important de noter qu'entre le début des années 1980, date du séquençage du gène *ampC* de *E. coli* par Jaurin et Grundström (Jaurin et Grundström, 1981), et la fin des années 1990, on ne trouve, dans la littérature, quasiment aucun article sur le promoteur de ce gène et sa régulation, ni sur les promoteurs des autres β -lactamases AmpC.

Les séquences des 2 hexamères en positions -35 et -10, ainsi que la distance qui les sépare, sont cruciales dans l'efficacité de l'activité de l'ARN-polymérase, par leur influence majeure sur le niveau de transcription du gène. Quand nous avons débuté nos travaux, deux mutations principales avaient déjà été étudiées dans le promoteur du gène *ampC* de souches de *E. coli* isolées dans notre laboratoire : la mutation en position -32 (T→A), permettant une homologie parfaite avec la séquence consensus -35 (TTGACA), ainsi que la mutation en position -42 (C→T), entraînant la création d'une nouvelle box -35 d'homologie parfaite avec la séquence consensus.

C'est au cours d'un dépistage, réalisé pendant notre année de DEA, sur un grand nombre de souches cliniques hyperproductrices de céphalosporinase, que nous avons détecté 3 souches présentant une mutation (C→T) en position -11 au sein de la Pribnow box (TATAAT), dans le promoteur du gène *ampC*. Cette mutation avait été rapportée, au début des années 1980, par Jaurin *et al.*, mais uniquement chez des mutants obtenus *in vitro* au laboratoire (Jaurin *et al.*, 1982).

Depuis quelques années, l'analyse régulière de la séquence promotrice de la céphalosporinase AmpC n'a pas permis d'identifier de manière fréquente cette substitution. Les deux mutations majeures demeurent celles qui sont retrouvées en positions -32 et -42. Elles entraînent d'ailleurs un niveau de résistance beaucoup plus important, puisque les souches correspondantes présentent une sensibilité diminuée, voire une résistance, à l'égard des céphalosporines de 3^{ème} génération (Caroff *et al.*, 2000), alors que la seule mutation -11 induit un niveau de résistance plus modéré (CMI à l'égard de la ceftazidime de 32 et 0,5 mg/L, respectivement).

Ces mutations ponctuelles représentent un gain pour la bactérie, en terme de survie en présence d'agents antimicrobiens, mais certaines d'entre elles ou leurs combinaisons pourraient être délétères pour un opéron métabolique. En effet, il faut rappeler que la

séquence promotrice du gène *ampC* est aussi la séquence terminale de l'opéron fumarate-réductase. Ainsi, après analyse d'un nombre important de séquences dans notre laboratoire, ou par d'autres équipes, il n'a jamais été mis en évidence d'association de ces différentes mutations. Le chevauchement de cet opéron métabolique avec la région promotrice de la β -lactamase pourrait expliquer que l'association des mutations en positions -32 et -11 n'ait jamais été observée. Elle entraînerait pourtant, chez la bactérie, l'apparition d'une homologie parfaite avec les deux séquences consensus et, par conséquent, une probable hyperproduction majeure de la céphalosporinase AmpC, avec résistance aux céphalosporines de 3^{ème} génération.

L'importance de la mutation -11 que nous avons étudiée *in vitro* a été révélée, *in vivo*, par d'autres auteurs, lors de l'isolement de mutants résistants, chez un patient souffrant de kystes infectés au niveau hépatique, dans des conditions de fort inoculum bactérien, propices à ce type d'événement génétique ; les souches isolées présentaient cependant aussi des mutations dans l'atténuateur en position +18, +23 ou +37, ce qui rend difficile l'étude de l'impact respectif de ces différentes mutations (Low *et al.*, 2001).

Par ailleurs, alors qu'il existe un polymorphisme bien établi des β -lactamases AmpC (3 séquences différentes, au moins, pour la céphalosporinase AmpC de *E. cloacae*), il faut souligner que les mutations responsables d'une hyperproduction de cette céphalosporinase (comme c'était le cas pour les souches que nous avons étudiées) surviennent très fréquemment sur une trame génétique identique, présentant des mutations en positions -88, -82, -18, +1 et +58. Or, si l'importance du polymorphisme en position -18 est compréhensible, par son influence sur la création d'un nouveau promoteur, en association avec la mutation en position -42 (Caroff *et al.*, 2000), *a priori*, il ne joue aucun rôle en association avec la mutation -11.

Pour les études de gènes reporter, un vecteur portant le gène CAT (plasmide pKK232-8, **Figure 29**, p. 90) avait été préféré à des systèmes utilisant la luciférase ou la β -galactosidase, en raison de la détermination aisée, pour un laboratoire de Bactériologie, de la CMI de chloramphénicol pour le screening des clones.

Toutefois, ces méthodes permettant de tester la force des promoteurs demeurent assez lourdes, avec deux étapes de clonage dans la méthodologie que nous avons utilisé et une nécessité de

vérification sur gel à chaque étape (**Figure 30**, p. 90). En outre, cela représente un système artificiel, assez éloigné de l'environnement enzymatique présent dans la cellule bactérienne. Ceci nous a conduit à mettre au point, à la suite de ce travail, une méthode d'extraction des ARN bactériens et une technique de RT-PCR, afin de disposer d'un nouvel outil pour étudier la régulation génétique *in vivo*.

Figure 29 : Structure du vecteur d'expression pKK232-8 du gène de la chloramphicol-acétyl-transférase, utilisé pour l'étude de la force des promoteurs.

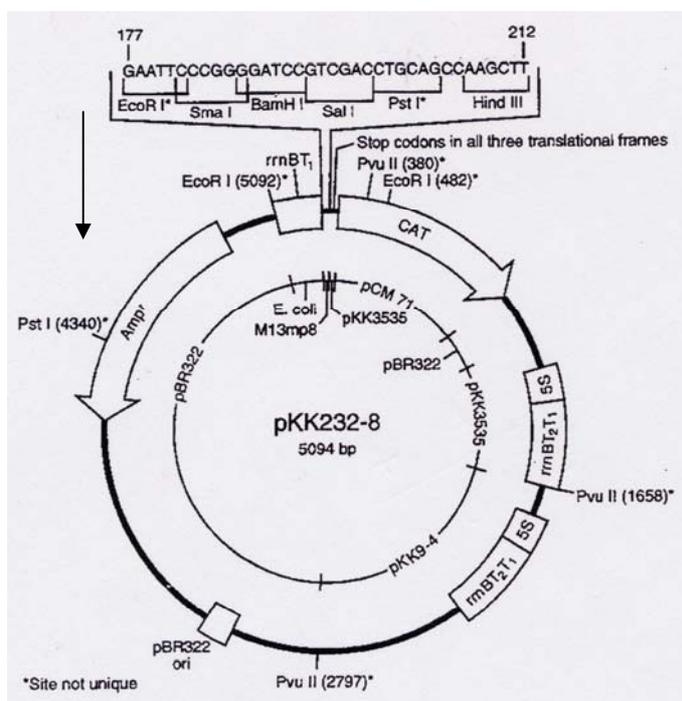
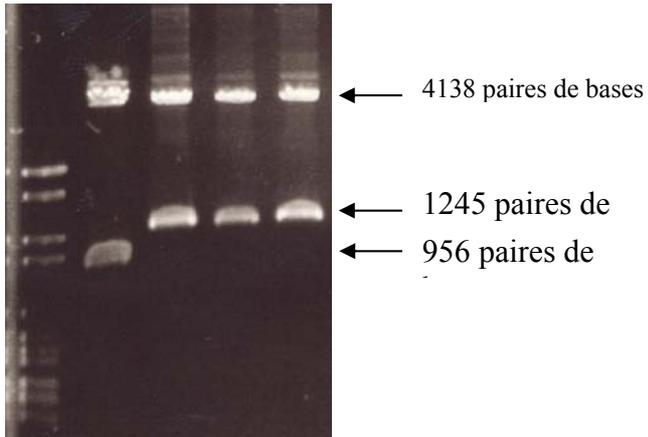


Figure 30 : Photographie du gel d'agarose après migration du plasmide, clonage de l'insert dans pKK232-8 et digestion par *Pst*I.



M : marqueur de taille.

1 : plasmide pKK232-8 sans insert.

2, 3 et 4 : plasmide pKK232-8 ayant intégré le fragment du promoteur du gène *ampC*.

II- Mise au point d'une technique d'évaluation quantitative de l'expression génétique

**des ARNm bactériens par RT-PCR, chez *Escherichia coli* :
comparaison des techniques de RT-PCR conventionnelle et de RT-PCR en temps réel.**

II.1- Présentation :

En raison des limitations des techniques de gènes reporter envisagées précédemment, nous avons besoin d'une méthode d'application plus aisée, nous permettant d'étudier la régulation de l'expression des gènes de β -lactamase, chez des souches cliniques. Deux possibilités ont paru envisageables : l'utilisation du Northern Blot et la RT-PCR. L'approche par RT-PCR nous a semblé plus adaptée, pour sa plus grande facilité de mise en œuvre et sa plus grande rapidité, du fait qu'elle ne nécessite pas d'étape d'hybridation. En outre, cette technique, bien que peu développée en Bactériologie, était déjà largement utilisée dans le domaine voisin de la Virologie, susceptible d'apporter des informations utiles. Le développement concomitant des appareillages de PCR en temps réel, permettant d'obtenir un résultat encore plus rapide, avec un risque réduit de contamination, nous a conforté dans notre approche.

Après avoir évalué différentes conditions d'extraction des ARN bactériens, nous avons donc mis au point, successivement, une technique de RT-PCR classique, puis une technique de RT-PCR en temps réel utilisant du SYBR Green I.

Nous avons initialement appliqué ces développements technologiques au modèle de la céphalosporinase AmpC, pour lequel nous disposions de références, après analyse de la force relative de différents promoteurs par étude en gène reporter.

Notre objectif était d'évaluer la corrélation entre la présence des mutations les plus fréquemment décrites dans le promoteur du gène *ampC* de souches cliniques de *E. coli* (-42, -32 et -11), la quantité de transcrits spécifiques retrouvés et le niveau de résistance aux β -lactamines de ces différentes souches.

II.2- Matériel et méthodes - Résultats :

Article 2 : Comparison of two RT-PCR methods for quantifying *ampC* specific transcripts in *Escherichia coli* strains.

Stéphane Corvec, Nathalie Caroff, Eric Espaze, Julie Marraillac, Henri Drugeon, Alain Reynaud. (2003) *FEMS Microbiology Letters*, **228**:187-191.

Comparison of two RT-PCR methods for quantifying *ampC* specific transcripts in *Escherichia coli* strains

Stéphane Corvec ^{a,*}, Nathalie Caroff ^b, Eric Espaze ^a, Julie Marraillac ^a,
Henri Drugeon ^a, Alain Reynaud ^b

^a Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène Hospitalière, Institut de Biologie des Hôpitaux de Nantes, 9 quai Moncoussu, 44093 Nantes Cedex 01, France

^b Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Faculté de Pharmacie, Université de Nantes, Nantes, France

Received 26 June 2003; received in revised form 8 August 2003; accepted 22 September 2003

First published online 23 October 2003

Abstract

In *Escherichia coli*, β -lactam resistance usually depends on β -lactamase production. AmpC chromosomal cephalosporinase hyperproduction is generally due to mutations in the *ampC* gene promoter. In order to study *ampC* expression in *E. coli* clinical strains, we have compared two methods: conventional and real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). With both methods, *ampC* mRNA was found to be greatly increased in strains presenting -42 or -32 mutations in the *ampC* promoter, and moderately increased when a -11 mutation was present in the Pribnow box. Real-time RT-PCR represents a powerful tool combining amplification, fluorescent detection and analysis.

© 2003 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *ampC* gene; Expression; Regulation; Reverse transcription-polymerase chain reaction

1. Introduction

Even though plasmidic cephalosporinases are sporadically described in *Escherichia coli* [1], the resistance due to class C enzymes is still often caused by overexpression of the chromosomal AmpC enzyme [2–4]. Gene amplification has been described in laboratory strains overexpressing AmpC [5]. However, in clinical isolates, it seems that the overexpression of this constitutive enzyme is largely linked to *ampC* promoter mutations [6–8].

The main mutations are located in strategic regions of the promoter to enhance the transcription of the gene, particularly in the well-characterized -35 and -10 boxes [9].

In order to determine the effect of the different mutations on the strength of the promoter, gene reporter studies have been previously developed [4] and they have confirmed the crucial role of -32 , -42 or -11 mutation [6–8].

However, these studies were carried out with laboratory plasmids using either chloramphenicol acetyltransferase [6,8] or luciferase [4] as a reporter gene.

Conventional reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technology has been widely used in virology for years, but in bacteriology, applications have been much more limited due to technical limitations caused by mRNA structure in prokaryotes. However, the method has been shown to be sensitive enough to detect bacterial mRNA [10,11]. RT-PCR seems to be a useful approach and a powerful tool to analyze expression of β -lactam resistance genes. Recently, real-time RT-PCR was introduced to quantify bacterial specific mRNA transcripts [12,13]. With this method, an increase in fluorescence emission during PCR was generated and detected proportionally to the initial copy number of the target gene. Fluorescence emission was detected for each PCR cycle.

The aim of this work was to correlate the mutations found in the *ampC* promoter of clinical *E. coli* strains with the level of mRNA specific transcripts and the level of β -lactam resistance of the strains. In this study, we used two different methods to quantify mRNA specific transcripts of the *ampC* gene from different clinical strains.

* Corresponding author. Tel.: +33 (2) 40.08.39.55;
Fax: +33 (2) 40.40.08.38.29.

E-mail address: stephane.corvec@chu-nantes.fr (S. Corvec).

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

E. coli AmpC overproducing strains were isolated at Nantes University Hospital. *E. coli* ATCC 25922 was used as a low level AmpC producer control. The *ampC* promoters were sequenced for this study or in previous ones. The mutations and the susceptibility to various β -lactams are summarized in Table 1.

2.2. Growth conditions and mRNA preparation

Isolates were cultured overnight in trypticase-soy agar (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). A suspension of 10^8 bacteria ml^{-1} was diluted 1:1000 in fresh Luria broth medium to obtain a bacterial density of approximately 10^5 bacteria ml^{-1} . The cultures were grown to mid-exponential phase at 37°C, until they reached an optical density of 0.25 measured at 600 nm.

After a 5-min centrifugation ($5000 \times g$) at 4°C, cells were harvested and total mRNA was extracted using Qiagen RNeasy Protect Bacteria Mini Kits (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's recommendations.

2.3. RT-PCR conditions

2.3.1. Conventional RT-PCR

DNase treatment was performed for 15 min at 25°C in a final volume of 16 μl containing 2 U of RQ1 RNase-free DNase (Promega, Charbonnières, France) in the presence of 80 U of RNasin[®] ribonuclease inhibitor (Promega). EDTA was added to a final concentration of 2.5 mM and the DNase was inactivated by a 10-min incubation at 65°C.

Five microliters of DNase treated RNA was reverse-transcribed in a final volume of 25 μl containing 50 mM of Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 10 mM dithiothreitol, 400 μM of each nucleotide, 2 μM of the reverse primer (NC4 and GapA2, see below) and 200 U of M-MLV reverse transcriptase (Promega). The reaction

mixture was incubated for 1 h at 42°C, followed by a 5-min incubation at 95°C.

Ten microliters of the cDNA was used for amplification of specific *ampC* mRNA [3] using primers NC3 (5'-GTGAAGCCGTCTGGTTTGAGT-3') and NC4 (5'-TTATTGTCACCTGCCGTTAAT-3') corresponding to nucleotides 594–614 and 957–980 respectively, and 10 μl was used for amplification of *gap* [14] (encoding D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, used as an external control) using primers GapA1 (5'-ATCAACGGTTTTGGCCGTAT-3') and GapA2 (5'-GTTGATAACTTTAGC-CAGCGG-3') corresponding to nucleotides 19–38 and 469–489 respectively, in the same conditions: 5 min initial denaturation at 94°C, followed by 35 cycles of 30 s denaturation at 94°C, 30 s annealing at 55°C and 1 min extension at 72°C, and a final extension step of 7 min at 72°C. Both PCR products were detected on a 6% acrylamide gel. Each RT-PCR was performed in triplicate.

2.3.2. Real time RT-PCR

For this study, real-time RT-PCR with SYBR Green I was performed, using the qPCR[™] Core Kit for SYBR[™] Green I (Eurogentec, Seraing, Belgium). Rotor-Gene RT-PCR was carried out following the manufacturer's instructions, using the primers for *gap* and *ampC* genes.

After RT for 1 h at 42°C, 5 min at 94°C, the RNA/DNA complex was used as target. The 25- μl reaction mix contained 1 \times qPCR[™] Core Kit for SYBR[™] Green I, 5 mM MgCl_2 , a 120 nM concentration of each primer, and 2.5 μl of the template. The following temperature profile was used for amplification: denaturation for one cycle at 95°C for 5 min and 45 cycles at 94°C for 20 s, 63°C for 30 s and 72°C for 30 s (temperature transition, 20°C s^{-1}) with fluorescence acquisition at 63°C for 1 s. For acquisition of the fluorescence signal, channel CH1 was used and the gain of CH1 was set at 9. Each RT-PCR was performed in triplicate.

PCR cycling was followed by melting curve analysis of 70–99°C (temperature transition rate of 1°C s^{-1}) with stepwise fluorescence acquisition. The specificity of the PCR reaction was verified by ethidium bromide staining on 6% acrylamide gels.

Table 1

Minimum inhibitory concentrations (mg l^{-1}) of various β -lactams and the corresponding *ampC* promoter mutations for clinical isolates and *E. coli* strain ATCC 25922

Strain	AMX	AMC	TIC	CF	CTX	CAZ	IPM	Mutations ^a
ATCC 25922	2	<2	<8	8	0.06	0.06	0.06	–73
16	>256	64	>256	64	0.12	0.5	0.06	–88, –82, –18, –11, –1, +58
7	>256	256	>256	128	0.25	0.5	0.06	–32
32	>256	>256	>256	>256	16	128	0.12	–88, –82, –42, –18, –1, +31, +58
38	>256	>256	>256	>256	16	32	0.12	–88, –82, –42, –18, –1, +23, +58

AMX: amoxicillin, AMC: amoxicillin + clavulanate, TIC: ticarcillin, CF: cefalotin, CTX: cefotaxime, CAZ: ceftazidime, IPM: imipenem

^aMutations detected in comparison with the *ampC* sequence of *E. coli* K-12 published by Jaurin and Grundström [3].

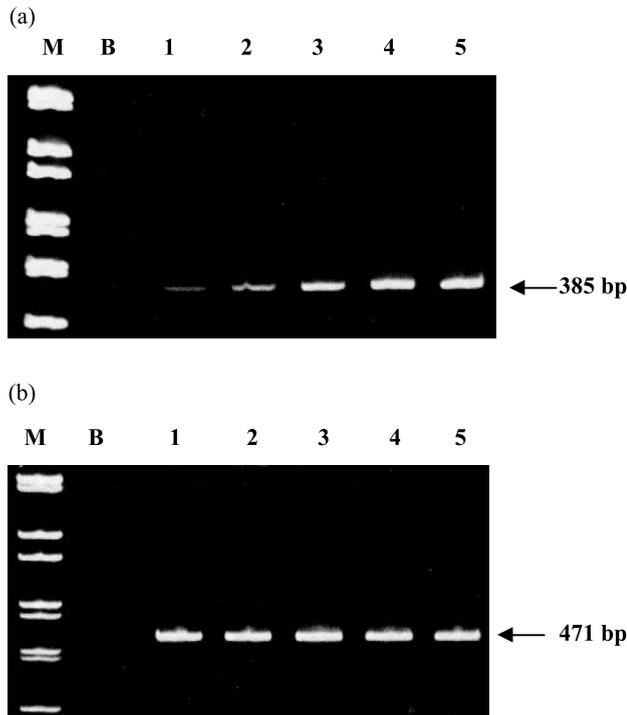


Fig. 1. Detection of the *ampC* gene (a) and the *gap* gene (b) by RT-PCR on a 6% acrylamide gel. Molecular mass marker VI (Roche, Meylan, France; lane M), blank (lane B), *E. coli* strain ATCC 25922 (lane 1), strain 16 (lane 2), strain 7 (lane 3), strain 32 (lane 4) and strain 38 (lane 5).

3. Results and discussion

3.1. RT-PCR *ampC* mRNA expression

RT-PCR results are shown in Fig. 1. The constitutively expressed *gap* gene, encoding D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, highly conserved in both bacteria and eukaryotes [14,15], was used as an external control in RT-PCR experiments [16]. The mRNA transcripts for *gap* gave similar signals for all strains, although very different signals were obtained for *ampC* specific transcripts. *E. coli* strain ATCC 25922 gave a very low signal. The strongest signal was obtained with the mRNA from strains presenting the –32 or –42 mutation in their promoter (strains 7, 32 and 38). The –11 mutated strain (strain 16) gave an intermediate signal.

Densitometric quantification of the bands after ethidium bromide staining was used to evaluate quantitatively the expression level of these two genes [17]. Each band was quantified by using 1 D Image Analysis Software (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA). Large and similar amounts of the *gap* gene were obtained for all strains, whereas different levels of the *ampC* gene were detected. Ratios are presented in Table 2.

These results were largely confirmed by real-time RT-PCR. Curves are presented in Fig. 2. For each assay, the threshold cycle value (Ct) must be determined. This is defined as the PCR cycle where the fluorescence signal increases above the background threshold [18]. PCR and fluorescence detection can be performed in a combined thermocycler and fluorimeter, like Rotor-Gene (Ozyme, Saint-Quentin Yvelines, France). When SYBR Green I is used, the increase in fluorescence emission is due to binding to dsDNA. The identification of the PCR product was performed by determining the melting temperature of the amplicon after PCR.

For the housekeeping gene *gap*, the Ct was found to be identical for all strains. For the *ampC* gene mRNA, clinical strains presented a decrease of the Ct proportional to their antibiotic resistance pattern: strains with the most frequent mutation in the *ampC* promoter (–42) showed the earlier Ct (strains 32 and 38), while *E. coli* strain ATCC 25922 presented the latest one. These results are in total correlation with the resistance pattern. Ct and ratios are shown in Table 2.

3.2. RT-PCR technical step

Conventional RT-PCR has been used to detect bacterial pathogens in food [13,19,20], to study glycopeptide resistance in enterococci [21] and enhanced expression of the multidrug efflux pump AcrAB in *E. coli* mutants selected with a fluoroquinolone [16] or the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa* [22]. mRNA quantification can also be used to evaluate the expression of most virulence factors [12,23]. In bacteria, mRNA is synthesized only by viable cells and can be used as a marker of cell viability [11,19,24]. Using RT-PCR in bacteriology presents specific challenges because different problems have to be solved [18,25].

Table 2

Comparison of the results of conventional and real-time RT-PCR for the *gap* and *ampC* genes

Strain	Conventional RT-PCR <i>gap</i> and <i>ampC</i> OD ^a measurements			Real-time RT-PCR <i>gap</i> and <i>ampC</i> Ct ^b		
	<i>ampC</i>	<i>gap</i>	Ratio	<i>ampC</i> Ct	<i>gap</i> Ct	Ratio
ATCC 25922	27 112	499 172	<0.1	24.10	12.48	2.0
Strain 16	273 589	463 439	0.6	23.15	12.40	1.9
Strain 7	582 596	498 439	1.2	21.19	12.01	1.8
Strain 32	806 313	452 328	1.8	18.96	12.42	1.5
Strain 38	859 105	440 165	2.0	17.93	12.69	1.4

^aOD measurements: optical densitometric measurements.

^bCt: threshold cycle, value defined as the PCR cycle where the fluorescence signal increases above the background threshold.

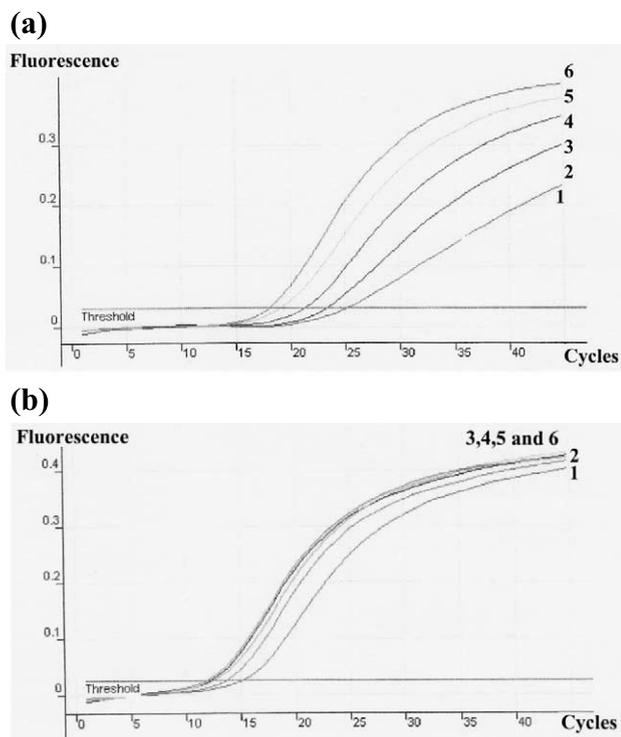


Fig. 2. Curves obtained for *ampC* gene (a) and *gap* gene (b) detection by real-time RT-PCR on Rotor-Gene. Blank (curve 1), *E. coli* strain ATCC 25922 (curve 2), strain 16 (curve 3), strain 7 (curve 4), strain 32 (curve 5) and strain 38 (curve 6).

DNase treatment is always necessary to eliminate residual DNA. The control for absence of residual DNA was realized by conventional PCR on DNase treated mRNA. For each assay, templates without RT showed no detectable amplification, indicating the absence of contaminating genomic DNA [11,26].

Because of the short half-life and instability of bacterial mRNA [24,27], it is particularly important to use precise standardization of bacterial growth, in order to obtain mid-exponential cultures to yield mRNA of high purity [11,25]. Then, careful conditions of sample preparation are necessary, because RNA degradation is a serious problem that can lead to variable results for the same template. For example, to avoid mRNA secondary structures that affect the ability of the RNA dependent DNA polymerase to generate specific transcripts, a cycle at 65°C during 10 min is necessary for each template to linearize mRNA and then freeze them on ice.

The interaction between the physical or chemical components of the reaction must be analyzed and considered carefully for each technical step, in order to optimize the specificity, sensitivity and reproducibility of the reaction [18,25].

For both techniques used in this study, the RT step is crucial and the main variable is the percentage of mRNA transcribed into cDNA: the efficiency can fluctuate for the same extraction mRNA targets [18,25].

3.3. Comparison between conventional and real-time RT-PCR

Classical RT-PCR results were evaluated by visual or densitometric quantification of the bands after ethidium bromide staining. The visual evaluation of band intensity is largely subject to variabilities caused by individual perception [23]. In contrast, the real-time RT-PCR Rotor-Gene system uses integrated software for quantification.

The advantage of real-time RT-PCR is the fluorescent detection. Thus, real-time RT-PCR avoids contamination problems, is less time consuming and results in short turnaround times for data acquisition and analysis [23], especially if we could develop a one-step method.

This approach of RT-PCR methodology with SYBR Green seems to be sensitive enough to detect mRNA resistance genes and to characterize gene expression transcripts in several *E. coli* strains presenting different resistance patterns. Moreover, as described previously by Hein and al. [13] in *Staphylococcus aureus* cells, TaqMan probe technology is more strictly specific but more expensive and more time consuming to develop [13,18,25]. Nevertheless, this configuration allows a better quantification for samples with low copies and represents, in virology, the most appropriate method for accurate quantification in the copy number evolution in chronic infections.

3.4. Contribution of RT-PCR and *ampC* expression

In this work, we have used the RT-PCR technology to study *ampC* gene expression, presenting a simple non-inducible regulation, in *E. coli*. Numerous mutations have been previously described in *E. coli ampC* gene promoters of clinical strains hyperproducing their chromosomal constitutive cephalosporinase. However, it is often difficult to correlate the presence of these mutations with a resistance phenotype, particularly if they are located outside the well-known -10 and -35 boxes. In clinical strains, other mechanisms such as decrease in permeability, efflux or presence of additional β -lactamase can be associated. In this study, we have proved that the amount of *ampC* specific mRNA is directly linked to the strength of the promoters studied in an artificial reporter gene system. Moreover, between the resistant clinical strains, we can notice a difference in the level of expression of *ampC* gene resistance.

Gene reporter studies are tedious and time consuming. RT-PCR could be a simple way to detect AmpC overproducers and to study gene expression. In many cases, the detection of differences in expression levels of specific mRNAs can provide useful information on the resistance pattern and contribute to a study of the regulation of resistance gene expression.

References

- [1] Odeh, R., Kelkar, S., Hujer, A.M., Bonomo, R.A., Schreckenberger, P.C. and Quinn, J.P. (2002) Broad resistance due to plasmid-mediated AmpC β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli*. Clin. Infect. Dis. 35, 140–145.
- [2] Jaurin, B., Grundström, T. and Normark, S. (1982) Sequence elements determining *ampC* promoter strength in *E. coli*. EMBO J. 1, 875–881.
- [3] Jaurin, B. and Grundström, T. (1981) *ampC* cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of β -lactamases of the penicillinase type. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4897–4901.
- [4] Nelson, E.C. and Elisha, B.G. (1999) Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 43, 957–959.
- [5] Edlund, T., Grundström, T. and Normark, S. (1979) Isolation and characterization of DNA repetitions carrying the chromosomal beta-lactamase gene of *Escherichia coli* K-12. Mol. Gen. Genet. 173, 115–125.
- [6] Caroff, N., Espaze, E., Gautreau, D., Richet, H. and Reynaud, A. (2000) Analysis of the effects of -42 and -32 *ampC* promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing AmpC. J. Antimicrob. Chemother. 45, 783–788.
- [7] Caroff, N., Espaze, E., Bérard, I., Richet, H. and Reynaud, A. (1999) Mutations in the *ampC* promoter of *Escherichia coli* isolates to oxyiminocephalosporins without extended spectrum β -lactamase production. FEMS Microbiol. Lett. 173, 459–465.
- [8] Corvec, S., Caroff, N., Espaze, E., Marraillac, J. and Reynaud, A. (2002) -11 mutation in the *ampC* promoter increasing resistance to β -lactams in a clinical *Escherichia coli* strain. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 3265–3267.
- [9] Hawley, D. and McClure, W.R. (1983) Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. Nucleic Acids Res. 11, 2237–2255.
- [10] McGrath, S., Dooley, J.S.G. and Haylock, R.W. (2000) Quantification of *Clostridium botulinum* toxin gene expression by competitive reverse transcription-PCR. Appl. Environ. Microbiol. 66, 1423–1428.
- [11] Sheridan, G.E.C., Masters, C.I., Shallcross, J.A. and Mackey, B.M. (1998) Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. Appl. Environ. Microbiol. 64, 1313–1318.
- [12] Goerke, C., Campana, S., Bayer, M.G., Döring, G., Botzenhart, K. and Wolz, C. (2000) Direct quantitative transcript analysis of the *agr* regulon of *Staphylococcus aureus* during human infection in comparison to the expression profile in vitro. Infect. Immun. 68, 1304–1311.
- [13] Hein, I., Lehner, A., Rieck, P., Klein, K., Brandl, E. and Wagner, M. (2001) Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. Appl. Environ. Microbiol. 67, 3122–3126.
- [14] Branlant, G. and Branlant, C. (1985) Nucleotide sequence of the *Escherichia coli gap* gene. Different evolutionary behavior of the NAD⁺-binding domain and of the catalytic domain of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Eur. J. Biochem. 150, 61–66.
- [15] Nelson, K., Whittam, S.T. and Selander, R.K. (1991) Nucleotide polymorphism and evolution in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*gapA*) in natural populations of *Salmonella* and *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 6667–6671.
- [16] Jellen-Ritter, A.S. and Kern, W.V. (2001) Enhanced expression of the multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in *Escherichia coli* mutants selected with a fluoroquinolone. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 1467–1472.
- [17] Kwon, D.H., Osato, M.S., Graham, D.Y. and El-Zatari, F.A.K. (2000) Quantitative RT-PCR analysis of multiple genes encoding putative metronidazole nitroreductases from *Helicobacter pylori*. Int. J. Antimicrob. Agents 15, 31–36.
- [18] Bustin, S.A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J. Mol. Endocrinol. 25, 169–193.
- [19] Klein, P.G. and Juneja, V.K. (1997) Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. Appl. Environ. Microbiol. 63, 4441–4448.
- [20] Szabo, E.A. and Mackey, B.M. (1999) Detection of *Salmonella enteritidis* by reverse transcription-polymerase chain reaction (PCR). Int. J. Food Microbiol. 51, 113–122.
- [21] Privitera, O., Sisto, F., Giuffrida, V., Puntorieri, M., Cascone, C., Di Silvestro, I., Rappazzo, G. and Stefani, S. (1999) Reverse transcription polymerase chain reaction method for the detection of glycopeptide resistance in enterococci. J. Microbiol. Methods 35, 95–100.
- [22] Evans, K., Adewoye, L. and Poole, K. (2001) MexR repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of MexR binding sites in the *mexA-mexR* intergenic region. J. Bacteriol. 183, 807–812.
- [23] Goerke, C., Bayer, M.G. and Wolz, C. (2001) Quantification of bacterial transcripts during infection using competitive reverse transcription-PCR (RT-PCR) and lightcycler RT-PCR. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8, 279–282.
- [24] Hellyer, T.J., Desjardin, L.E., Hehman, G.L., Cave, M.D. and Eisenach, K.D. (1999) Quantitative analysis of mRNA as a marker for viability of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Microbiol. 37, 290–295.
- [25] Freeman, W.M., Walker, S.J. and Vrana, K.E. (1999) Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. BioTechniques 26, 112–125.
- [26] Rokbi, B., Seguin, D., Guy, B., Mazarin, V., Vidor, E., Mion, F., Cadoz, M. and Quentin-Millet, M.-J. (2001) Assessment of *Helicobacter pylori* gene expression within mouse and human gastric mucosae by real-time reverse transcriptase PCR. Infect. Immun. 69, 4759–4766.
- [27] Sails, A.D., Bolton, F.J., Fox, A.J., Wareing, D.R.A. and Greenway, D.L.A. (1998) A reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for the detection of thermophilic *Campylobacter* spp. Mol. Cell. Probes 12, 317–322.

II.3- Commentaires :

Cette étude a permis, d'une part, la mise au point d'une méthode d'extraction des ARNm totaux et, d'autre part, la comparaison de deux techniques de quantification des transcrits spécifiques du gène codant pour la β -lactamase AmpC, par RT-PCR conventionnelle ou en temps réel.

A l'heure actuelle, le développement de techniques d'étude des ARN des procaryotes est principalement appliqué à l'étude de la viabilité cellulaire dans le secteur de la Microbiologie agro-alimentaire et apparaît en plein essor, pour analyser le niveau d'expression des gènes et leur régulation (Sheridan *et al.*, 1998, Klein *et al.*, 1997). L'arrivée récente de kits commerciaux spécifiques pour les bactéries a permis d'optimiser l'extraction des ARNm totaux.

Dans les protocoles de quantification des ARNm, l'importance de la qualité de la préparation des échantillons est toujours soulignée avec insistance (McGrath *et al.*, 2000). Cela résulte des conséquences éventuelles liées à la caractéristique majeure des ARNm bactériens, qui est leur faible demi-vie et donc leur instabilité (Carpousis, 2002, Sheridan *et al.*, 1998, Alifano *et al.*, 1994).

Le suivi des recommandations techniques des fournisseurs est donc particulièrement important ; cependant, des adaptations doivent parfois être apportées pour tenir compte de la constitution pariétale des bactéries étudiées. Malgré diverses phases de mise au point, nous avons observé un degré de variabilité persistant dans la qualité de l'extraction, imputable à quatre critères :

- l'état physiologique des cellules bactériennes elles-mêmes ;
- les conditions de culture ;
- les conditions d'extraction ;
- les conditions de conservation.

L'étape de culture bactérienne apparaît tout à fait fondamentale pour l'étude des ARN. Nous avons donc travaillé à partir d'un inoculum de départ rigoureusement standardisé à 10^5 bactéries/mL, tout en suivant la cinétique de croissance bactérienne : en effet, l'extraction des ARN doit être réalisée sur des bactéries en phase de croissance exponentielle. La durée optimale de croissance retenue pour les souches de *E. coli* a été de 4 à 5 heures, en bouillon Luria (Becton-Dickinson, Etats-Unis) incubé à 37°C avec agitation (120 rpm). Ces conditions

permettaient l'obtention d'une densité optique correspondant à celle recommandée pour l'utilisation des colonnes d'extraction, à savoir 0,2 à 0,25 à 600 nm.

En effet, une trop grande quantité de matériel de départ entraînerait une surcharge des colonnes échangeuses d'ions et donc une mauvaise reproductibilité de l'extraction.

Les gènes bactériens étant dépourvus d'introns, la taille du fragment amplifié par RT-PCR, à partir d'ARN, sera identique à celle du fragment obtenu par PCR à partir d'un éventuel ADN contaminant et ce, quelles que soient les amorces choisies. Ceci impose donc de réaliser un traitement des extraits d'ARN à la DNase I "RNase-free". Après l'extraction, les ARN totaux ont donc été incubés en présence d'une DNase et d'une concentration variable de MgCl₂, pendant 30 minutes à une heure, en fonction des protocoles ; l'addition d'EDTA au milieu réactionnel et un traitement à la chaleur (dix minutes à 65°C) ont ensuite permis l'inactivation de l'enzyme. Le nombre d'unités de DNase incorporées aux extraits était adapté en fonction des protocoles suivis et des bactéries (Sails *et al.*, 1998). Pour l'avenir, certains auteurs ont proposé de coupler cette étape supplémentaire à l'extraction, lors de l'utilisation des extracteurs d'acides nucléiques ; cette phase serait alors associée aux étapes de lavages (Bustin, 2002).

Une fois ce pré-traitement réalisé, il s'est avéré nécessaire de vérifier l'absence d'ADN contaminant dans les extraits d'ARN. La réalisation d'une PCR sur les ARN non traités, avec vérification sur gel d'agarose, a permis d'affirmer que le signal obtenu provenait bien des ARNm extraits et non de l'ADN génomique contaminant co-extrait, qui pouvait lui-même être amplifié lors de la phase de PCR (**Figure 31**).

Figure 31 : Visualisation, sur gel, des ARNr 16S de 4 souches de *E. coli*, après RT-PCR précédée d'une étape de pré-traitement des échantillons à la DNase, par rapport au résultat obtenu après PCR réalisée dans les mêmes conditions préalables.



M : marqueur de taille, B : blanc
1, 2, 3 et 4 : RT-PCR sur 4 extraits d'ARN après traitement à la DNase.

Par ailleurs, la fragilité des ARNm, après extraction, rend indispensable leur conservation à -80°C. Leur sensibilité aux cycles de congélation/décongélation a nécessité un stockage sous

de petites quantités. Il pourrait être opportun, lors de la réalisation des aliquotes, d'ajouter une faible quantité d'inhibiteur de RNases tel que le RNasin®.

Classiquement, une technique de PCR est validée par des témoins positif et négatif, ainsi que par la recherche d'inhibiteurs. Lors de la mise au point d'une technique de quantification par RT-PCR, il paraît donc indispensable d'associer un témoin interne ou externe, d'autant plus que les soucis de reproductibilité observés sont majorés, lors de la détection d'un nombre restreint de cibles (Bustin, 2002). L'absence de tels témoins dans diverses études, rend d'ailleurs certaines interprétations sujettes à discussion (Kwon *et al.*, 2000).

Lorsque nous avons initié ce travail, la stratégie choisie, en raison de l'expérience acquise dans le domaine de la Virologie, a été la mise en œuvre d'un standard interne, dans le cadre d'une RT-PCR compétitive sur gel. Sa réalisation nécessitait l'amplification d'un fragment du gène cible, dans des conditions de basse stringence, avec une amorce présentant une délétion de 7 paires de bases, par rapport à l'amorce utilisée pour le gène cible lui-même (**Figure 32**). Le produit de PCR délété de 7 paires de bases a été séquencé avant clonage, pour s'assurer de la délétion obtenue. L'obtention d'un ARN synthétique, par clonage suivi d'une transcription *in vitro*, a permis l'obtention d'une gamme de standard (**Figure 33**, p. 100). Cependant, la quantification des ARNm du gène *ampC*, par RT-PCR compétitive, n'a pas été satisfaisante lors de tous les essais menés. Le pouvoir de résolution des gels d'acrylamide, la trop grande taille du fragment cible (385 paires de bases) et la trop faible différence de taille entre gène cible et témoin interne sont les principales difficultés auxquelles nous nous sommes heurtés.

Figure 32 : Visualisation de la différence de taille entre le gène cible *ampC* et le standard interne construit à l'aide d'une amorce délétée de 7 paires de bases : mise en évidence par migration en gel d'acrylamide 6 % (2h30 à 120 volts).

M 1 2 3 4 5 6

M : marqueur de taille Pbr322
1 : Produit de PCR 5 µL.
2 : Produit de PCR délété de 7 paires de bases 2 µL.
3 : Produit de PCR 2 µL.
4 : Produit de PCR délété de 7 paires de bases 1 µL.

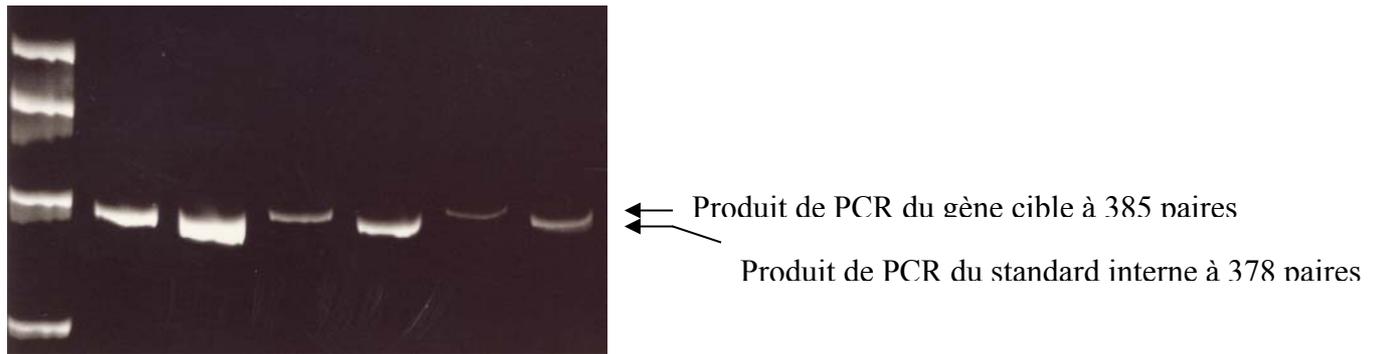
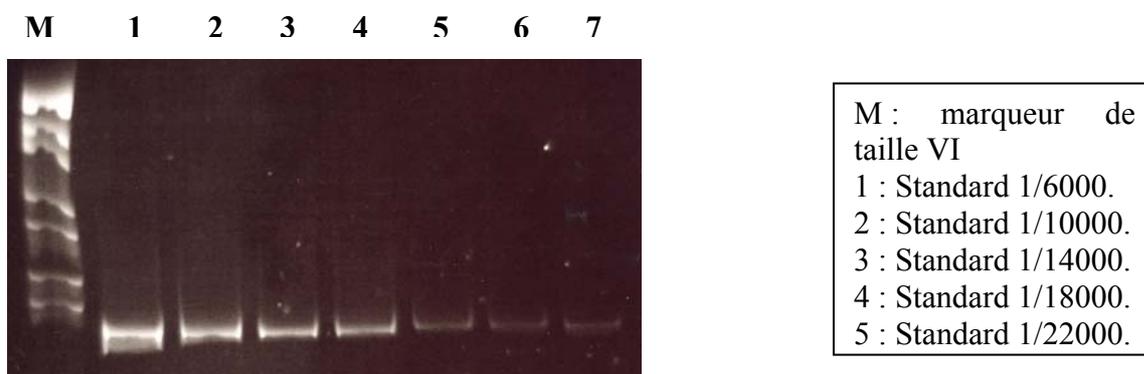


Figure 33 : Gamme de standard interne délété de 7 paires de bases, utilisé en RT-PCR compétitive, après migration en gel d'acrylamide à 6 % (2h15 à 110 volts).



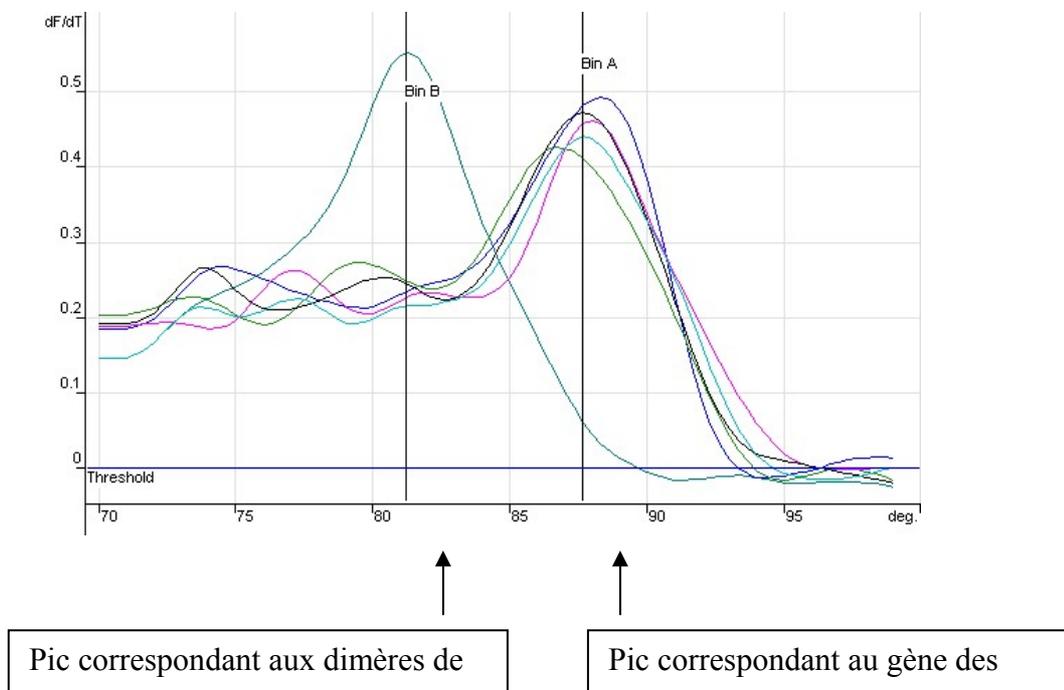
L'arrivée de la technologie de PCR en temps réel, après l'échec d'une seconde tentative d'utilisation d'un standard interne porteur d'une délétion de 12 paires de bases, nous a incité à utiliser secondairement un standard externe d'amplification. Nous avons réalisé différents essais d'amplification des gènes codant pour les ARNr 16S ou bien pour la D glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase et c'est finalement ce dernier témoin qui a été retenu.

Il est bien évident que la méthodologie utilisée n'apporte qu'une évaluation semi-quantitative, permettant de comparer le comportement de différentes souches, et non une quantification précise du nombre exact de transcrits, qui nécessiterait une mise au point plus précise des conditions de quantification.

Les conditions de réalisation de la RT en font une étape cruciale pour la détection des ARNm, puisque la quantité d'ADNc dépendra de la quantité d'ARNm total extrait. A l'époque, le choix d'une mise au point en deux étapes, une phase de RT et une phase d'amplification, avait été préférée. Aujourd'hui, il nous apparaît préférable d'envisager une modification du protocole, avec une technique en un temps, semble-t-il plus sensible (Battaglia *et al.*, 1998), mais surtout moins consommatrice de temps et réduisant les risques de contamination. Cette

adaptation contribuera au développement des techniques combinant l'amplification et la détection des acides nucléiques avec l'avènement de la PCR en temps réel. Cette technologie de suivi en temps réel constitue une approche différente, par rapport à l'analyse réalisée auparavant sur gel après migration. Pour s'assurer de la spécificité de la réaction, il a été indispensable de réaliser une courbe de fusion en fin de cycle, pour vérifier l'absence de pic parasite et donc d'un excès de fluorescence (**Figure 34**, p. 101).

Figure 34 : Courbe de fusion des témoins ARN 16S, avec pics cibles et dimères de primers.



L'essor de ce nouvel outil moléculaire est évident, avec la constante publication de nombreuses applications, que ce soit en terme de détection des microorganismes dans les prélèvements pathologiques (O'Mahony *et al.*, 2002) ou bien de détection de la résistance chez des bactéries à croissance difficile ou lente, comme *Helicobacter pylori*.

III- Etude bactériologique et épidémiologique de souches de *Acinetobacter baumannii* : rôle d'une séquence d'insertion en amont du gène *ampC*, chez les souches hyperproductrices de céphalosporinase, résistantes à la ceftazidime.

III.1 - Présentation :

A. baumannii, pathogène opportuniste, est fréquemment retrouvé comme agent d'infections nosocomiales, particulièrement dans les unités de soins intensifs de réanimation (Corbella *et al.*, 2000, Bergogne-Bérézin et Towner, 1996). Après colonisation, il peut être responsable d'infections engageant le pronostic vital, notamment chez les personnes immunodéprimées ou bien lors de maladies intercurrentes sévères. L'isolement et la caractérisation d'une telle bactérie sont donc importants, en raison des risques de diffusion de clones multirésistants aux antibiotiques. De nombreux mécanismes de résistance ont été rapportés dans la littérature. Néanmoins, comme pour tous les bacilles à Gram négatif, la production d'une ou de plusieurs β -lactamases est apparue comme le mécanisme prépondérant de la résistance aux β -lactamines, qui peut aussi résulter de l'altération des protéines liant les pénicillines (Fernandez-Cuenca *et al.*, 2003) ou de modification et/ou perte de porines (Clark, 1996). L'hyperproduction de la céphalosporinase AmpC est un des mécanismes principaux de résistance aux β -lactamines. Récemment, le gène codant pour cette enzyme a été cloné et séquencé à partir d'une souche clinique multirésistante de *A. baumannii*, isolée lors d'une épidémie en Espagne (Ab RYC52763/97, numéro d'accèsion gene bank : AJ009979) (Bou *et al.*, 2000).

Lors de ce travail, nous avons étudié, de manière rétrospective, un panel de souches de *A. baumannii* isolées au Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, pendant l'année 2001. Ces souches ont été caractérisées sur le plan de leur mécanisme de résistance aux β -lactamines, par combinaison de techniques bactériologiques usuelles (détermination de la CMI), de techniques biochimiques (détermination du point isoélectrique des β -lactamases) et génétiques (analyse et séquençage du gène *ampC*). L'analyse des profils de résistance aux β -lactamines, l'amplification du gène *ampC* et le séquençage de la partie adjacente en 5', ainsi que l'analyse des transcrits spécifiques, ont permis d'envisager une première explication concernant la régulation génétique et l'hyper-expression de ce gène de résistance.

III.2- Matériel et méthodes - Résultats :

Article 3 : AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains.

Stéphane Corvec, Nathalie Caroff, Eric Espaze, Cécile Giraudeau, Henri Drugeon, Alain Reynaud. (2003) *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **52**:629-635.

AmpC cephalosporinase hyperproduction in *Acinetobacter baumannii* clinical strains

Stéphane Corvec^{1*}, Nathalie Caroff², Eric Espaze¹, Cécile Giraudeau¹, Henri Drugeon¹ and Alain Reynaud²

¹Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Hygiène hospitalière, CHU, Nantes;

²Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Faculté de Pharmacie, Université de Nantes, Nantes, France

Received 16 April 2003; returned 21 May 2003; revised 7 July 2003; accepted 9 July 2003

Objective: To compare the genetic environments of *ampC* genes in different *Acinetobacter baumannii* isolates showing different levels of β -lactam resistance.

Methods: The patterns of β -lactam resistance and β -lactamase production were investigated for 42 *A. baumannii* clinical strains. The MICs of various β -lactams were determined in the presence or absence of the class C cephalosporinase inhibitor, cloxacillin (500 mg/L). The *ampC* gene and its 5' adjacent sequence were analysed by PCR and DNA sequencing. An RT-PCR method was developed to evaluate *ampC* transcript levels.

Results: Strains fell into three resistance groups: first, strains with a ceftazidime MIC \leq 8 mg/L (20 strains, 47.6%); secondly, strains with a ceftazidime MIC 32 mg/L, which was reduced four-fold in the presence of cloxacillin (eight strains, 19%); and thirdly, strains with a ceftazidime MIC \geq 256 mg/L, which did not decrease in the presence of cloxacillin (14 strains, 33.4%). In all of the resistant isolates (groups II and III), but not in any of the ceftazidime-susceptible isolates (group I), a 1180 bp insert showing all the characteristics of an insertion sequence was detected upstream from the *ampC* gene. Isolates having this insert overexpress *ampC*, according to RT-PCR experiments.

Conclusion: Presence of an insertion sequence upstream of *ampC* in *A. baumannii* clinical isolates, possibly including a strong promoter, has the potential to cause over-expression of AmpC, resulting in high-level ceftazidime resistance.

Keywords: AmpC hyperproducers, insertion sequences, *Acinetobacter baumannii*

Introduction

Members of the genus *Acinetobacter* are aerobic, non-fermenting Gram-negative bacilli, responsible for a wide spectrum of infections in immunocompromised hosts.

The *Acinetobacter baumannii* complex has emerged as some of the most important opportunistic pathogens within the hospital environment, being able to colonize and produce infections in most immunocompromised patients, especially from intensive care units¹ and/or in the context of serious underlying disease. Antimicrobial treatment of such severe infections is complicated by a widespread multidrug resistance pattern.

Different mechanisms of β -lactam resistance have been reported and identified in *A. baumannii*: β -lactamase production,² penicillin-

binding protein alterations^{3,4} and reduced penetration across the outer membrane.⁵ Nevertheless, β -lactamase production is one of the main mechanisms of resistance to β -lactams in *Acinetobacter* spp. Such β -lactamases can be plasmid-mediated enzymes like TEM-1 or CARB-5 penicillinases,^{6,7} integron-located class D oxacillinases,^{8–10} class B metalloenzymes^{11,12} or chromosomally encoded cephalosporinases (AmpC) belonging to class C β -lactamases.^{13,14} The AmpC cephalosporinase was recently sequenced from a multi-resistant *A. baumannii* clinical strain (Ab RYC 52763/97) isolated during an outbreak in Spain.¹⁴ This constitutively expressed enzyme does not share strong similarity with Enterobacteriaceae AmpC cephalosporinases.¹⁵ As of yet there is no information about the regulation of *A. baumannii* AmpC expression.

*Correspondence address. Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène hospitalière, CHU de Nantes – 9 quai Moncoussu, 44093 Nantes Cedex 01, France. Tel: +33-2-40-08-39-55; Fax: +33-2-40-08-38-29; E-mail: stephane.corvec@chu-nantes.fr

In this study, we examined the different β -lactam-resistance patterns encountered in 42 *A. baumannii* clinical strains and related this to AmpC expression. In order to investigate the changes in AmpC expression noted, we compared the genetic environment of the *ampC* gene in different strains showing different levels of β -lactam resistance.

Materials and methods

Bacterial strains

From January to December 2001, 42 strains of *A. baumannii* were isolated from 42 patients from different units at Nantes University Hospital. Identifications were performed with the Vitek2 system with an identification card for Gram-negative bacilli (ID-GNB) (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and confirmed by overnight growth on Trypticase soy agar (bioMérieux) at 44°C.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

DNA isolation from *A. baumannii* and PFGE were performed as previously described with some modifications¹⁶ with a *Sma*I restriction. NCTC 8523 was used as DNA size marker. The interpretation of the banding pattern was performed according to Tenover *et al.*¹⁶

Susceptibility tests and MIC determination

Susceptibility to β -lactams was determined using the disc diffusion method (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France) on Mueller–Hinton (MH) agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), according to the recommendations of the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.¹⁷

MICs were determined in the presence or absence of 500 mg/L of cloxacillin by serial two-fold dilution tests in MH agar. Inocula of 10⁴ cfu/spot from an 18 h culture in MH broth were applied with a Steers multiple-inoculum replicator.

A. baumannii ATCC 19606 was used as a control strain.

β -Lactamase extraction and isoelectric focusing

After 18 h of culture in Trypticase soy broth (bioMérieux), bacterial pellets were obtained by 20 min centrifugation at 10 000g. After washing and resuspension in distilled water, bacterial pellets were sonicated in a Branson Sonifier 250 to disrupt bacterial cell walls (intermittent exposure of 5×30 s). After centrifugation, the supernatant contained the β -lactamase crude extract. Isoelectric focusing was performed according to the method of Matthew *et al.*,¹⁸ using an 8% acrylamide/bisacrylamide gel containing ampholines (pH 3.5–9.5). An iodine–starch agar gel, containing either benzylpenicillin or cloxacillin, was used to visualize the β -lactamase bands.

Detection of metallo- β -lactamase-producing strains

Metallo- β -lactamase production was detected by imipenem-EDTA and ceftazidime-EDTA double-disc synergy test. Clinical strains were inoculated on MH agar plates. Two 10 μ g imipenem discs and two 30 μ g ceftazidime discs (Bio-Rad) were placed on each plate, and 5 μ L of a 0.5 M pH 8.0 EDTA solution were added onto one of each antibiotic disc. The inhibition zones were compared after 18 h of incubation at 37°C; metallo- β -lactamase production leads to a 6–12 mm diameter increase in the presence of EDTA.^{19,20}

Detection of *ampC* by PCR

Genomic bacterial DNA was extracted from the 42 strains by heating a suspension of bacteria to 95°C for 5 min in a final volume of 50 μ L of

distilled sterile water. After centrifugation at 13 000g, the supernatants were used as DNA templates. PCR amplifications were performed in a DNA thermal cycler Perkin-Elmer 480 (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Cergy-Pontoise, France). A 663 bp fragment was amplified by PCR using primers ACI5 (5'-ACTTACTTCAACTCGCGACG-3') and ACI6 (5'-TAAACACCACATATGTTCCG-3') corresponding to nucleotides 486–505 and 1128–1148 of the structural *ampC* gene, respectively (GenBank accession number AJ009979). The PCR was performed in a final volume of 50 μ L containing 10 mM Tris–HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 200 μ M of each nucleotide, 0.5 μ M of each primer, 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Promega, Charbonnières, France) and 10 μ L of DNA extract. After a 90 s denaturation step at 94°C, the 30 cycle PCR procedure was 30 s denaturation at 94°C, 30 s annealing at 57°C and 60 s extension at 72°C, followed by a final extension step of 10 min at 72°C. The PCR products were detected on a 1.5% agarose gel.

Determination of the *ampC* genetic environment by inverse-PCR

Genomic DNA extraction was performed using QIAmp DNA MiniKit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and DNA was digested with *Hind*III endonuclease for 3 h at 37°C. After heat inactivation of the enzyme, a ligation was performed using T₄ DNA ligase in a final volume of 10 μ L. After overnight incubation at 4°C, 10 μ L of the ligation product was added to a PCR mixture containing two inverse primers (INV5 and INV6, opposite sense from ACI5 and ACI6). The PCR was performed as previously described, apart from an extension time increased to 2 min. A band of ~1300 bp was obtained and sequenced in one strand using INV5 as a primer.

Amplification and sequencing of *ampC* 5' non-coding sequence

After inverse-PCR and sequencing the 5' non-coding region of susceptible strains, a new primer, ACI10 (5'-GCTGAACGCGATAAACTTC-3'), located upstream from the *ampC* gene was synthesized, and used with a primer located inside the *ampC* gene ACI2 (5'-TAGTACTGCTATT-TACGGCT-3') corresponding to nucleotides 327–347 of the *ampC* gene. PCR was carried out as previously described.

Detection of integrons by integrase-PCR

Screening for the presence of class 1 integrons for each strain was realized as previously described with integrase-specific primers.²¹

RT-PCR analysis for *ampC* mRNA detection

Total mRNA was extracted from three *A. baumannii* strains representing each group (isolates 1, 2 and 3) using the Qiagen RNeasy Protect Bacteria Mini Kits (Qiagen). Five microlitres of DNase-treated RNA was reverse-transcribed in a final volume of 25 μ L containing 50 mM of Tris–HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 400 μ M of each nucleotide, 2 μ M of the reverse primer (ACI6 and 16S2) and 200 U of M-MLV reverse transcriptase (Promega). The reaction mixture was incubated for 1 h at 42°C, followed by a 5 min incubation at 95°C. Ten microlitres of the cDNA was used for amplification of specific *ampC* mRNA, using the primers for *ampC* (ACI5/ACI6) and 10 μ L for the 16S rRNA (16S1 5'-GGAGGAAGGTGGGGATGACG-3' and 16S2 5'-ATGGTGTGACGGGCGGTGTG-3')²² under the same conditions: 5 min initial denaturation at 94°C, followed by 35 cycles of 30 s denaturation at 94°C, 30 s annealing at 55°C and 1 min extension at 72°C, and a final extension step of 7 min at 72°C. Both PCR products were detected on a 1.5% agarose gel. Each RT-PCR was performed in triplicate.

ampC in *A. baumannii* clinical strains

Table 1. MICs (mg/L) of different β -lactams for all strains of the study

Strains	TIC	TIC+ CLA	TIC+ CLO	CTX	CTX+ CLO	CAZ	CAZ+ CLO	FEP	FEP+ CLO	IPM	IPM+ CLO	Isoelectric focusing (pI)
ATCC 19606	8	8	<2	16	<1	8	8	32	8	1	0.5	>8
Group I^a												
1	16	16	8	16	4	4	4	32	16	1	0.25	ND
6	16	16	4	8	2	<2	<2	4	0.5	0.5	0.125	ND
14	8	4	<2	4	<1	<2	<2	32	<0.25	1	<0.03	ND
16	>512	256	>256	32	64	8	8	256	128	4	1	5.4, >8
17	16	8	4	8	<1	<2	<2	4	0.5	0.5	0.125	>8
18	16	16	4	8	2	4	2	4	1	0.5	0.125	ND
20	<4	<2	<2	4	<1	<2	<1	<0.5	<0.25	0.25	<0.03	ND
24	16	8	4	8	<1	<2	<2	2	0.5	0.5	0.125	ND
26	>512	256	>256	16	8	8	8	128	64	1	0.25	5.4, >8
33	32	32	16	32	16	8	8	16	8	0.5	0.5	ND
37	32	32	16	32	16	8	8	16	8	0.5	0.5	ND
38	32	32	16	16	16	8	8	16	8	0.5	0.5	ND
48	>512	256	>256	16	8	8	8	32	32	2	0.25	5.4, >8
49	32	32	16	16	16	8	8	16	8	0.5	0.5	>8
50	16	16	8	8	4	<2	<2	4	2	0.5	0.125	>8
51	32	32	16	16	16	8	8	8	8	0.5	0.5	>8
54	32	32	16	16	16	8	8	16	8	0.5	0.5	>8
64	32	32	16	16	16	8	8	8	8	0.5	1	ND
65	<4	4	<2	<2	<1	<2	<2	16	<0.25	0.5	<0.03	ND
67	16	2	<2	4	<1	<2	<2	2	<0.25	0.5	<0.03	ND
Group II^a												
2	32	32	8	256	4	32	8	32	16	2	0.125	>8
8	32	32	4	256	<1	32	8	32	8	4	0.5	>8
10	32	32	8	256	4	32	8	32	16	2	0.125	>8
19	32	32	4	256	<1	32	4	32	2	4	0.25	>8
21	32	32	4	256	<1	32	8	32	8	2	0.5	>8
43	32	32	<2	128	<1	32	2	32	<0.25	4	0.5	>8
66	32	32	4	256	<1	32	8	32	8	4	0.25	>8
72	32	<2	<2	256	<1	32	8	32	8	4	0.25	>8
Group III^a												
3	>512	>256	>256	128	64	512	>256	64	32	32	32	6.3, >8
4	>512	>256	>256	256	64	256	>256	64	32	1	1	>8
7	>512	>256	>256	256	64	512	>256	64	32	1	1	>8
12	>512	>256	>256	128	64	512	>256	32	32	2	1	>8
22	>512	>256	>256	128	64	512	>256	32	32	32	32	6.3, >8
28	>512	>256	>256	>256	128	>512	>256	256	64	2	1	5.4, >8
35	>512	>256	>256	256	128	512	>256	64	32	32	32	6.3, >8
55	>512	>256	>256	128	128	512	>256	64	64	64	>32	6.3, >8
57	>512	>256	>256	128	128	512	>256	64	64	64	>32	6.3, >8
59	>512	>256	>256	128	128	512	>256	64	64	64	>32	6.3, >8
62	>512	>256	>256	128	128	512	>256	64	64	64	>32	6.3, >8
63	>512	>256	>256	128	64	512	>256	32	64	32	32	6.3, >8
68	>512	>256	>256	128	128	512	>256	64	64	64	>32	6.3, >8
70	>512	>256	>256	128	128	512	>256	64	64	64	>32	6.3, >8

TIC, ticarcillin; CLA, clavulanate; CLO, cloxacillin; CTX, cefotaxime; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; IPM, imipenem; ND, not detected.
^aSee text for details.

Results

β -Lactam resistance and β -lactamase expression by clinical *A. baumannii* isolates

The susceptibilities of 42 *A. baumannii* clinical strains, isolated in 2001, to β -lactams were determined (Table 1). Strains can be

separated into three groups: 20 strains (47.6%) showing a ceftazidime MIC \leq 8 mg/L make up group I; eight strains (19%) showing a ceftazidime MIC 32 mg/L, which was decreased in the presence of cloxacillin, make up group II; and 14 strains (33.4%) showing a ceftazidime MIC \geq 256 mg/L, which was not decreased in the presence of cloxacillin, make up group III. In group III, 10 of the 14 isolates (71%)

Table 2. PCR of the *ampC* gene and the *ampC* genetic environment of the study strains

Strains	ACI5/ACI6 ^a	ACI1/ACI2 ^b	ACI10/ACI2 ^c	Integrase
ATCC 19606	+	–	356 bp	ND
Group I ^d				
1, 6, 14, 17, 18, 20, 24, 33, 37, 38, 49, 50, 51, 54, 64, 65 and 67	+	–	356 bp	–
16, 26 and 48	+	–	356 bp	+
Group II ^d				
2 and 10	+	+	~1500 bp	+
8, 19, 21, 43, 66 and 72	+	+	~1500 bp	–
Group III ^d				
3, 4, 7, 12, 22, 28, 35, 55, 57, 59, 62, 63, 68 and 70	+	+	~1500 bp	+

ND, not done.

^aACI5, forward primer located inside the structural constitutive *ampC* gene; ACI6, reverse primer located inside the structural constitutive *ampC* gene.

^bACI1, forward primer located upstream from the *ampC* gene according to the sequence published by Bou & Martinez-Beltran;¹⁴ ACI2, reverse primer located inside the structural constitutive *ampC* gene.

^cACI10, forward primer located upstream from the *ampC* gene according to the sequence we determined by inverse-PCR.

^dSee text for details.

were also resistant to the carbapenem, imipenem (MIC \geq 32 mg/L), and the imipenem MICs were not modified in the presence of cloxacillin. All the group I and II strains were susceptible to imipenem, and its MIC decreased (twice for group I strains and three- to four-fold in group II strains) in the presence of cloxacillin. PFGE molecular typing of the 42 isolates showed that all group I and II isolates represent different strains. However, 75% of group III isolates were collected from a burns intensive care unit and presented a high degree of similarity (>90%) (data not shown).

Isoelectric focusing was performed on the crude β -lactamase extracts of all 42 isolates. For 12 strains (all in group I), no β -lactamase could be detected, probably because β -lactamase expression was below the sensitivity of the method. For 30 strains (71%), including all the group II and III strains, a basic β -lactamase band, most probably corresponding to the AmpC cephalosporinase (pI > 8), was detected. In all cases, the AmpC band intensity was higher for strains from groups II and III than from group I. Several strains showed an additional β -lactamase band with a pI of 5.4. These strains were also characterized by their resistance to ticarcillin, decreased by clavulanate, so the pI 5.4 band most probably represents a TEM-type β -lactamase. For 10 group III strains having an imipenem MIC \geq 32 mg/L, a pI 6.3 band was also visible after revelation with an iodine–starch agar gel containing cloxacillin instead of benzylpenicillin. Tests for the presence of a metallo- β -lactamase in these strains was negative using imipenem-EDTA and ceftazidime-EDTA screening discs.

ampC gene upstream sequence and AmpC expression in clinical *A. baumannii* isolates

PCR tests for the *ampC* gene were positive for all 42 strains. However, using forward and reverse primers (ACI1 and ACI2) located in the 5' non-coding sequence and *ampC* gene, respectively, previously published by Bou & Martinez-Beltran,¹⁴ group I (ceftazidime

susceptible) strains did not give any PCR amplification product, as shown in Table 2. By inverse PCR, we determined the immediate 5' upstream region of the *ampC* genes of these group I strains. The sequence obtained is very different from the *ampC* upstream regions of group II and III (ceftazidime resistant) isolates, as shown in Figure 1. A PCR was then performed with template DNA from all the strains using a forward primer anchored in the *ampC* upstream sequence from group I isolates (ACI10) and the *ampC*-targeted reverse primer used previously (ACI2). Following this reaction, group I strains yielded an amplicon of 356 bp, but group II and III isolates gave an ~1500 bp amplicon. These results suggested an insertion upstream from the *ampC* gene in groups II and III isolates. The 1500 bp product was sequenced on both strands. Compared with the group I isolates, an insertion sequence of ~1200 bp, with characteristic direct repeats of 9 bp (5'-GAGCTAATC-3') and inverted repeats of 11 bp (5'-CTCTGTACACG-3'), was present in the 5' non-coding region of all group II and III strains. An alignment of this sequence with the EMBL database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) revealed 100% identity with an upstream sequence of the *phaB*_{AC} gene in *A. baumannii*, encoding an acetoacetyl-CoA reductase.^{23,24} This sequence was also previously detected upstream of the ARI-1 gene, encoding OXA-23, an extended-spectrum class D β -lactamase, in *A. baumannii* strains.²⁵

RT-PCR analysis was conducted in order to estimate *ampC* transcript levels in the three different groups of strains. While a control reaction (measuring 16S rRNA levels) gave a similar strong signal for the three groups of strains, a large difference was obtained for the *ampC*-specific transcript (Figure 2). *ampC* mRNA is considerably more abundant in both group II and III strains, which have the *ampC* upstream insertion, than in group I strains, which do not.

The presence of integrase genes was confirmed by PCR in some of the strains, but there is no clear correlation with the presence of the *ampC* upstream insertion sequence (Table 2).

ampC in *A. baumannii* clinical strains

	5'	-100	-60
Susceptible strains	TTTTTTTATAGCTGAACGCGATAAACTTCGATCCAATTCATAAAAATATAACAATTAATTA		
Resistant strains	GTTTAAGATAAGATATAAACTCATTGAGATGTGTCATAGTATTCGTCGTTAGAAAACAATTAT		
		-30	+1
Susceptible strains	GGTGATTTTGTATTATAAAAGTAGGCATCTTTCTTTTAAATAATTTATGAGCTAAT CATGCG		
Resistant strains	TATTATGACATTATTTCAATGAGTTATCTATTTTATCGTGTACAGAG-----		
		+30	+60
Susceptible strains	<u>ATTTAAAAAAATTTCTTGTCTACTTTTATCCCGCTTTTATTTTATTTTAGTACCTCAATTTATG</u>		
Resistant strains	-----		
		+90	3'
Susceptible strains	<u>CGGGCAATACACCAAAGACCAAGAAATTA</u>		
Resistant strains	-----		

Figure 1. Comparison of the 5' non-coding sequence of susceptible strains of *A. baumannii* determined by inverse-PCR and both group II and III resistant strains. The start codon is shown in bold type and the *ampC* gene sequence is underlined. Identical sequences are represented by dashed lines.

Discussion

In *Escherichia coli*, the main mechanism of overproduction of the constitutive AmpC enzyme is the acquisition of point mutations in the *ampC* promoter and attenuator regions.²⁶⁻²⁹

In *A. baumannii*, it appears that the presence of an ~1200 bp sequence upstream of *ampC* causes overexpression of AmpC. This 1200 bp sequence presents structural elements characteristic of an insertion sequence (IS): creation of direct repeats of 9 bp in the target sequence and presence of inverted repeats of 11 bp at each end of the inserted fragment.³⁰ RT-PCR analysis confirms the difference in the level of expression of the AmpC cephalosporinase. Furthermore, the RT-PCR results were in accordance with the ceftazidime MICs. Thus, the presence of the insertion sequence in both groups II and III probably increased the resistance. Accordingly, our experimental data suggest that overexpression of the *ampC* gene could be mediated by this IS, by providing a strong promoter upstream from the start codon ATG of the gene.

In *E. coli*, the crucial step of initiation of mRNA synthesis is strongly influenced by the sequence of two hexamers, the -35 and -10 boxes.³¹ At these sites, consensus sequences have been defined for *E. coli*, respectively TTGACA and TATAAT, optimally separated by 17 bp. The closer sequences are to the consensus sequences, the stronger the promoter. The first two bases of the hexamers are known to be the best conserved ones among the various promoters sequenced.³¹ No data are available about *A. baumannii* promoter consensus sequences. However, putative -35 and -10 boxes (TTGTTC and TATGAT) separated by 17 bp could be detected in the mobile element about 100 bp upstream of the start codon in the *A. baumannii ampC* gene. They differ from the *E. coli* consensus sequences by three bases and one base, respectively, the first bases being conserved.

Gene activation or inactivation by transposition of an IS element is a well-known phenomenon. Jaurin & Normark³² described AmpC overproducing *E. coli* laboratory mutants with an IS2 insertion

sequence located in the promoter, leading to a 20-fold increase in promoter strength. On the other hand, in *E. coli*, enhanced efflux expression has been associated with insertion of IS186 into the AcrAB repressor gene *acrR*, inducing reduced susceptibility to fluoroquinolones.³³ Our data confirm the role of mobile elements in modifying transcription rates of bacterial resistance genes.

Alignment with databases revealed 100% identity between the *ampC* upstream IS and the *phaB*_{AC} upstream sequence, a mobile element previously found in the *A. baumannii* genome. Most interestingly, this same IS has been found upstream of the class D β-lactamase ARI-1.²⁵ To our knowledge, it is the first time that the same mobile element could be found upstream of both a class D oxacillinase gene usually located on integrons^{34,35} and a class C gene like *ampC*. However, the same insertion sequence has been very recently detected upstream of the *aac(3)IIa* gene, encoding an aminoglycoside modifying enzyme.³⁶ This mobile element seems to be widespread, and

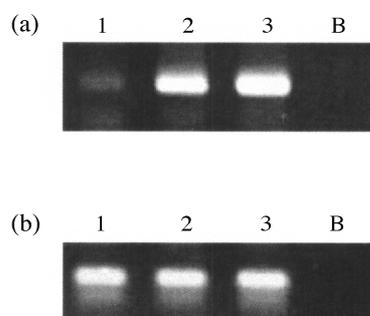


Figure 2. Comparison showing the intensity of the mRNA specific transcripts of the *ampC* gene (a) and 16S rRNA transcripts (b). Lane B, blank; lane 1, group I susceptible strain (isolate 1); lane 2, group II resistant strain (isolate 2); lane 3, group III resistant strain (isolate 3).

could represent a gene capture system, able to regulate different genes in *A. baumannii*.

It has also been shown recently that *Oligella urethralis* has integrated the *A. baumannii ampC* gene into its chromosome. The *ampC* gene in question carries the same upstream sequence as our group I strain.³⁷

The distribution of the different resistance patterns in our study was very similar to that described by Danes *et al.*,² with nearly half of the strains being susceptible or moderately resistant to ceftazidime, and 33.4% showing a decreased susceptibility or resistance to imipenem. This resistance was not corrected by cloxacillin, so a mechanism other than AmpC β -lactamase overproduction must be involved. Carbapenem resistance in *A. baumannii* has been associated with modifications in outer membrane proteins⁵ or penicillin-binding proteins,^{3,4} and production of different β -lactamases.² Class B enzymes have been described in *A. baumannii*,^{11,12} but the search for a metallo-enzyme was negative using an imipenem-EDTA or ceftazidime-EDTA test.^{19,20} Furthermore, numerous studies have shown that imipenem resistance in *A. baumannii* was mostly linked to the production of a class D extended-spectrum oxacillinase.^{8–10} These enzymes belong to two different clusters (OXA23/27 and OXA 24/25/26/40) and the genes encoding OXA-type β -lactamases are often located on class 1 integrons.³⁸ The integrase gene was detected by PCR in all the imipenem resistant strains of our study, but no oxacillinase gene could be detected with primers belonging to both clusters. Studies are in progress to understand the mechanism(s) underlying decreased susceptibility to imipenem of these strains.

References

- Bergogne-Bérézin, E. & Towner, K. J. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews* **9**, 148–65.
- Danes, C., Navia, M. M., Ruiz, J. *et al.* (2002). Distribution of β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and the effect of Syn 2190 (AmpC inhibitor) on the MICs of different β -lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **50**, 261–4.
- Fernandez-Cuenca, F., Martinez-Martinez, L., Conejo, M. C. *et al.* (2003). Relationship between β -lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**, 565–74.
- Gehrlen, M., Leving, H., Cullman, W. *et al.* (1991). Imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* is due to altered penicillin-binding proteins. *Chemotherapy* **37**, 405–12.
- Clark, R. B. (1996). Imipenem resistance among *Acinetobacter baumannii*: association with reduced expression of a 33–36 kDa outer membrane protein. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **38**, 245–51.
- Paul, G., Joly-Guillou, M. L., Bergogne-Bérézin, E. *et al.* (1989). Novel carbenicillin-hydrolysing β -lactamase (CARB-5) from *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratus*. *FEMS Microbiology Letters* **59**, 45–50.
- Vila, J. (1998). Mechanisms of antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Reviews in Medical Microbiology* **9**, 87–97.
- Afzal-Shah, M., Woodford, N. & Livermore, D. M. (2001). Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 583–8.
- Bou, G., Oliver, A. & Martinez-Beltran, J. (2000). OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 1556–61.
- Lopez-Otsoa, F., Gallego, L., Towner, K. J. *et al.* (2002). Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in northern Spain. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 4741–3.
- Chu, Y. W., Afzal-Shah, M., Houang, E. T. *et al.* (2001). IMP-4, a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong-Kong between 1994 and 1998. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 710–4.
- Tysall, L., Stockdale, M. W., Chadwick, P. R. *et al.* (2002). IMP-1 carbapenemase detected in an *Acinetobacter* clinical isolate from the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**, 217–8.
- Perilli, M., Felici, A., Oratore, A. *et al.* (1996). Characterization of the chromosomal cephalosporinases produced by *Acinetobacter Iwoffii* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 715–9.
- Bou, G. & Martinez-Beltran, J. (2000). Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 428–32.
- Barlow, M. & Hall, B. G. (2002). Origin and evolution of the AmpC β -lactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 1190–8.
- Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V. *et al.* (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 2233–9.
- Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. (2003). Communiqué 2003. [Online]. <http://www.sfm.asso.fr/nouv/general.php?pa=2> (6 August 2003, date last accessed).
- Matthew, M., Harris, A. M., Marshall, M. J. *et al.* (1975). The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. *Journal of General Microbiology* **88**, 169–78.
- Lee, K., Chong, Y., Shin, H. B. *et al.* (2001). Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology and Infection* **7**, 88–91.
- Yong, D., Lee, K., Yum, J. H. *et al.* (2002). Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 3798–801.
- Koeleman, J. G. M., Stooft, J., Van Der Bijl, M. W. *et al.* (2001). Identification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* by integrase gene PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 8–13.
- Martineau, F., Picard, F. J., Roy, P. H. *et al.* (1996). Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Microbiology* **34**, 2888–93.
- Schembri, M. A., Bayly, R. C. & Davies, J. K. (1994). Cloning and analysis of the polyhydroxyalkanoic acid synthase gene from an *Acinetobacter* sp.: evidence that the gene is both plasmid and chromosomally located. *FEMS Microbiology Letters* **118**, 145–52.
- Schembri, M. A., Bayly, R. C. & Davies, J. K. (1995). Phosphate concentration regulates transcription of the *Acinetobacter* polyhydroxyalkanoic acid biosynthetic genes. *Journal of Bacteriology* **177**, 4501–7.
- Donald, H. M., Scaife, W., Amyes, S. G. B. *et al.* (2000). Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 196–9.
- Caroff, N., Espaze, E., Gautreau, D. *et al.* (2000). Analysis of the effects of –42 and –32 *ampC* promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing AmpC. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **45**, 783–8.
- Corvec, S., Caroff, N., Espaze, E. *et al.* (2002). –11 Mutation in the *ampC* promoter increasing resistance to β -lactams in a clinical *Escherichia coli* strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 3265–7.
- Nelson, E. C. & Elisha, B. G. (1999). Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**, 957–9.

ampC in *A. baumannii* clinical strains

29. Jaurin, B., Grundström, T. & Normark, S. (1982). Sequence elements determining *ampC* promoter strength in *E. coli*. *EMBO Journal* **1**, 875–81.
30. Mahillon, J. & Chandler, M. (1998). Insertion sequences. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 725–74.
31. Harley C. B. & Reynolds, R. P. (1987). Analysis of *Escherichia coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Research* **15**, 2343–61.
32. Jaurin, B. & Normark, S. (1983). Insertion of IS2 creates a novel *ampC* promoter in *Escherichia coli*. *Cell* **32**, 809–16.
33. Jellen-Ritter, A. S. & Kern, W. V. (2001). Enhanced expression of the multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in *Escherichia coli* mutants selected with a fluoroquinolone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 1467–72.
34. Gallego, L. & Towner, K. J. (2001). Carriage of class 1 integrons and antibiotic resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Northern Spain. *Journal of Medical Microbiology* **50**, 71–7.
35. Gombac, F., Riccio, M. L., Rossolini, G. M. *et al.* (2002). Molecular characterization of integrons in epidemiologically unrelated clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Italian hospitals reveals a limited diversity of gene cassette arrays. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 3665–8.
36. Segal, H., Thomas, R. & Gay Elisha, B. (2003). Characterization of class 1 integron resistance gene cassettes and the identification of a novel IS-like element in *Acinetobacter baumannii*. *Plasmid* **49**, 169–78.
37. Mammeri, H., Poirel, L., Mangeney, N. *et al.* (2003). Chromosomal integration of a cephalosporinase gene from *Acinetobacter baumannii* into *Oligella urethralis* as a source of acquired resistance to β -lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**, 1536–42.
38. Naas, T. & Nordmann, P. (1999). OXA-type β -lactamases. *Current Pharmaceutical Design* **5**, 865–79.

III.3- Commentaires :

Quand nous avons engagé cette étude, alors qu'aucune donnée n'était disponible dans la littérature sur le promoteur du gène *ampC* et la régulation de sa transcription chez *A. baumannii*, nous nous attendions à mettre en évidence des mutations ponctuelles dans la région située en amont du gène, par rapport aux données du séquençage, qui venaient d'être rapportées par une équipe espagnole. En effet, à l'inverse de la majorité des β -lactamases AmpC, celle de *A. baumannii* était connue pour être produite sur un mode constitutif, comme celle de *E. coli* que nous avons précédemment étudiée.

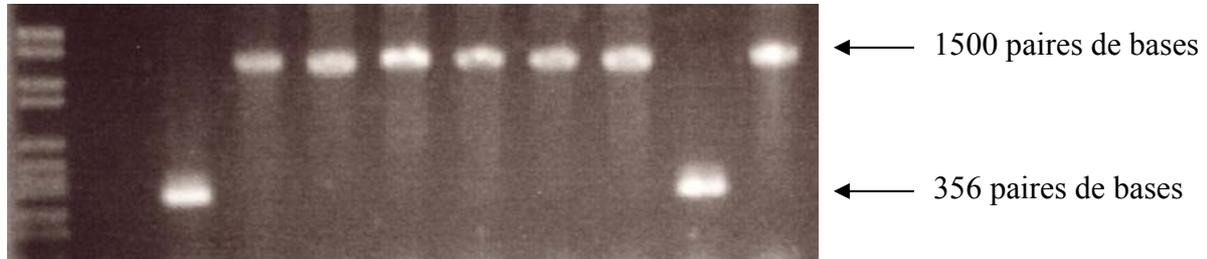
Lors de l'exploration de la région 5' non codante en amont du gène *ampC*, nous avons observé que certaines souches présentaient une amplification d'un fragment de taille très supérieure à la taille attendue (environ 1500 paires de bases, pour un fragment cible de 356 paires de bases) (**Figure 35**, p.112).

Le séquençage du gène *ampC* et de la partie en amont, en position 5', a mis en évidence un élément de 1200 paires de bases, compatible avec la structure et les caractéristiques d'une séquence d'insertion, chez les souches présentant une résistance à l'égard de la ceftazidime, céphalosporine de troisième génération de référence, avec une CMI supérieure ou égale à 32 mg/L.

L'intégration de ce type de séquences en amont d'un gène est un phénomène antérieurement décrit comme élément de régulation positive ou négative, entraînant soit l'activation, soit l'inactivation de l'expression du gène concerné (Kato *et al.*, 2003, Jellen-Ritter et Kern, 2001, Jaurin et Normark, 1983). Notre observation a contribué à confirmer le rôle d'éventuels éléments mobiles dans la régulation et la transcription des gènes de résistance bactériens ; en effet, ces structures sont susceptibles d'apporter soit de nouveaux hexamères, pouvant jouer le rôle de promoteur plus ou moins fort en amont du codon "start", soit un seul hexamère (nouvelle box -35) avec création d'un promoteur hybride (Mahillon et Chandler, 1998).

La corrélation directe des observations phénotypiques aux données génétiques obtenues a ensuite été possible, par la mise au point, pour cette espèce bactérienne, d'un protocole d'analyse des transcrits spécifiques du gène *ampC*, par RT-PCR.

Figure 35 : Amplification, par PCR, de la partie 5' non codante du gène *ampC* : mise en évidence par migration en gel d'agarose 1,5 % (1 heure à 100 volts).



M : marqueur de taille et B : blanc.
1 et 6 : souches sensibles à la ceftazidime.
2, 3, 4, 7, 8, 10 et 63 : souches résistantes à la

L'analyse la séquence insérée en amont du gène *ampC* a permis d'en démontrer la parfaite homologie avec une séquence située en amont du gène *phaB_{AC}*, gène codant pour une acétoacétyl-CoA réductase (Schembri *et al.*, 1995, Schembri *et al.*, 1994) (**Figure 36**, p. 113). Sa distribution au sein du génome de l'espèce *A. baumannii* apparaît intéressante, puisqu'elle a été également rapportée en amont du gène codant pour une β -lactamase de classe D : ARI-1, également dénommée Oxa-23 (Donald *et al.*, 2000), mais aussi en amont d'un gène de résistance codant pour une enzyme inactivatrice des aminosides (Segal *et al.*, 2003). Sa diffusion au sein de l'espèce pourrait laisser penser à un système de capture de gène, évoqué par certains auteurs (Segal *et al.*, 2003), cette séquence apparaissant capable de réguler différents gènes chez *A. baumannii*. A l'avenir, il serait intéressant d'explorer, par des techniques d'hybridation moléculaire, le nombre de copies de cette séquence chez les souches de *A. baumannii*, afin de vérifier son implication dans différents systèmes d'expression génétique de la bactérie (Segal *et al.*, 2004).

Par ailleurs, très récemment, la séquence du gène *ampC* de *Acinetobacter genospecies 3* a été publiée par la même équipe espagnole (Beceiro *et al.*, 2004). La souche concernée, également résistante aux β -lactamines, présentait un début de région promotrice (région 5' non codante) similaire à celle identifiée chez les souches de *A. baumannii* résistantes à la ceftazidime que nous avons étudiées.

Figure 36 : IS en amont du gène *ampC* de souches de *Acinetobacter baumannii* résistantes à la ceftazidime.

5' AAATTAGGTGATTTTTGTTATAAAAAGTAGGCATCTTTCTTTTTAAATAATTTATG
 AGCTAATCTCTGTACACGACAAATTCACAGAACCCTTATCCTATCAGGGTTCTG
 CCTTCTTAAAATTGCCAAAATTCCTTAAACTCTTCTTTTTTCCCAAACCAATTA
 AACGCTGAATCGCCATTTGAACATAGTCTAAACCATAGCGAAATAAACTCATTGA
 GAGTCGTCCATGCTTCTTTATTTTTATCGCTTTTTTTTTGATCATGTTGCCATTACC
 CGTTAAGTAACACCAACAG AAGCTTATAGCTAACACCGCAATCAATTTTTTCACT
 CGTCTAGGGTCTGTCAAGCGCGTATTTTCAAGATTAACCCGCGTCCTTTGAGAC
 AACTGAATAAGGTTTCAATTTCCAGCGTAATGCATAATCCTGAATAGCATTGGC
 ATTAACTGAGGAGAAACGACGAGTAAAAGCTCTCCATTTTCTAACTGTAGTGCAC
 TTATATATAGTTTCACCCGACCAACCAAAAATCCGTCGTTTACGACATTCAATTTGACCAACTTTAAG
 ATGGCGAAATAAATCACTAATTTTATGATTCTTTCCTAAATGATTGGTGACAATGAAGTTTTTTTAA
 CACGAATGCAGAAGTTGATGTCTTGTTCAATTAACCATGTAAACCACTGCTCACCGATAAACTCTC
 TGTCTGCGAACACATTCACAATACGGTCTTTACCAAAAATGGCTATAAAGCGTTGAATCAAAGCAA
 TACGCTCTTTCGTATCTGAATTTCCACGTTTATTAAGCAATGTCCAAAGGATAGGTATCGCTATTC
 CACGATAAACGATTGCGAGCATCAGGATATTAATATTTTCGTTTTCCCATTTCCAATTGGTT
 CTATCTAAAGTCAGTTGCACTTGGTCGAATGAAAACATATTGAAAATCAACTGAG
 AAATTTGACGATAATCAAATACTGACCTGCAAAGAAGCGCTGCATACGTCGATA
 AAATGATTGTGGTAAGCACTTGATGGGCAAGGCTTTAGATGCAGAAGAAAGATT
 ACATGTTTGCTTTAAAATAATCACAAGCATGATGAGCGCAAAGCACTTTAAATGTGACTT
 GTTCATTTTAGATATTTGTTAAGATAAGATATAACTCATTGAGATGTGTCATAGTATTCGTCGTT
 AGAAAACAATTATTATGACATTATTTCAATGAGTTATCTATTTTTATCGTGTACAGAGGAGCTAATC
 ATGCAATTTAAAAAATTTCTTGTCTACTTTTATCCCGCTTTTTATTTTTAGTACCTCAATTTATGC
 GGACAATACACCAAAAAGACCAAGAAATTA AAAA ACTGGTAGATCAAATTTTAAACCATTATTAGAA
 AAATATGATGTGCCGGGTATGGCTGTGGGTGTTATTCAAATAATAAAAAGTATGAAATGTATTA3'

En bleu clair, figure une partie de la séquence commune aux souches sensibles et résistantes.
 En vert, figurent les séquences Direct Repeat.
 En rouge, figurent les séquences Inversées Répétées.
 En jaune, figure la séquence retrouvée déjà chez les *Acinetobacter baumannii* en amont du gène *PhaB_{AC}* et en amont d'ARI-1.
 En violet, figure le codon START.
 En bleu foncé, figure le début de la séquence du gène *ampC*.

En noir en gras et souligné, les box -35 et -10.

A. baumannii est une bactérie fréquemment isolées lors d'épidémies d'infections nosocomiales. Ainsi, en dehors de l'analyse des mécanismes impliqués dans la résistance aux β -lactamines, nous nous sommes aussi intéressés au caractère éventuellement clonal des souches étudiées, par réalisation d'un typage moléculaire des différents isolats.

Ce typage, par électrophorèse en champ pulsé, a révélé la présence d'un sous-groupe particulier, au sein des souches de notre étude : un degré d'homologie supérieur à 90 % a été observé entre des souches également caractérisées par une résistance aux carbapénèmes (CMI d'imipénème supérieure ou égale à 32 mg/L) (**Figure 37**, p. 114). Ce type de souches a aussi été rapporté par d'autres auteurs, notamment lors d'épidémies nosocomiales (Quale *et al.*, 2003, Da Silva *et al.*, 2002). La diffusion de ce type de clones multirésistants, au sein des hôpitaux français, est un problème de santé publique majeur (Institut National de Veille Sanitaire, rapport 29 décembre 2003). Chez *A. baumannii*, la résistance aux carbapénèmes peut classiquement être associée à trois types de mécanismes avec, par ordre croissant de fréquence, la modification de PLP (Fernandez-Cuenca *et al.*, 2003), la modification des protéines de membrane externe (Clark, 1996) ou la production d'une β -lactamase acquise (Poirel *et al.*, 2003, Afzal-Shah *et al.*, 2001, Bou *et al.*, 2000, Vila, 1998).

Par isoélectrofocalisation analytique, à partir d'extraits enzymatiques, nous avons donc recherché la présence éventuelle de plusieurs β -lactamases, chez les isolats résistants à l'imipénème. Effectivement, nous avons observé une activité enzymatique correspondant à un point isoélectrique proche de 6,3, en complément de la β -lactamase AmpC de pI très basique (pI > 8) (**Figure 38**).

Figure 37 : Comparaison des profils obtenus par électrophorèse en champ pulsé, pour les souches de *Acinetobacter baumannii* étudiées.

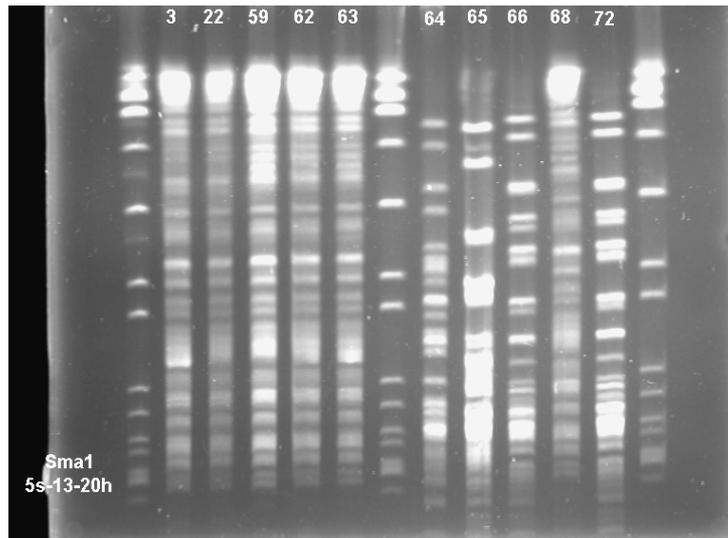
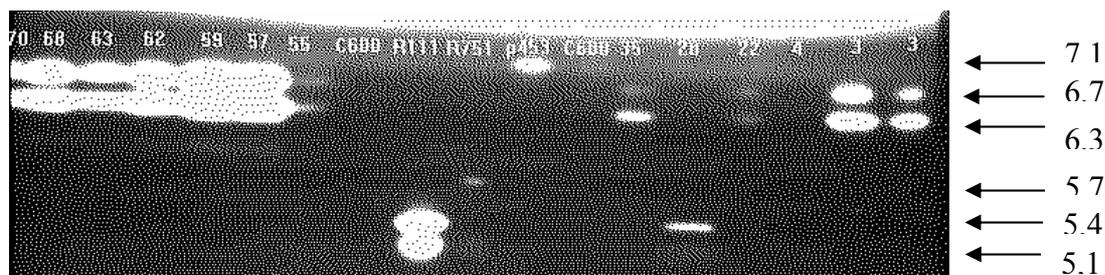


Figure 38 : Détection du point isoélectrique des β -lactamases produites par diverses souches de *Acinetobacter baumannii*, par isoélectrofocalisation analytique.

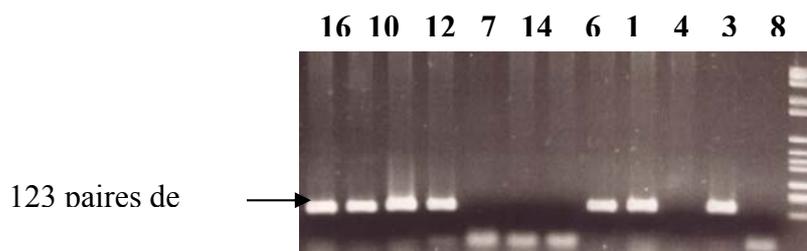


Nous avons alors cherché à déterminer le support génétique de la β -lactamase associée à AmpC. L'isolement au laboratoire, de manière contemporaine, de souches de *P. aeruginosa* O11 présentant un profil phénotypique caractérisé par la résistance aux carbapénèmes, et produisant une métallo-enzyme de classe B appartenant au groupe VIM (enzyme de type VIM-2), nous a conduit à rechercher l'éventuelle présence d'intégrons chez ces souches multirésistantes de *A. baumannii*. En effet, la présence de métallo-enzymes, récemment rapportée en Corée, chez *A. baumannii*, était associée à la présence d'intégron de classe 1, support génétique du gène bla_{VIM-2} et, par conséquent, de la résistance aux carbapénèmes (Yum *et al.*, 2002). Après la description de l'autre classe de métallo-enzyme, notamment de l'enzyme IMP-4, chez *A. baumannii* (Houang *et al.*, 2003, Chu *et al.*, 2001), Da Silva *et al.* ont publié la caractérisation moléculaire d'un nouvel intégron : In76, portant uniquement le gène bla_{IMP-5} , chez une souche de *A. baumannii* nosocomiale, au Portugal (Da Silva *et al.*, 2002).

La recherche d'intégrons de classe 1, par détection du gène de l'intégrase par amplification génique, s'est effectivement avérée positive chez toutes les souches de notre étude résistantes à l'imipénème (**Figure 39**).

Néanmoins, nous n'avons pas pu mettre en évidence le gène de la carbapénémase détectée chez les souches de *P. aeruginosa* de sérotype O11. Nous n'avons pas retrouvé, non plus, de gènes de β -lactamases de classe D ou oxacillinases à large spectre, malgré l'utilisation de deux couples d'amorces appartenant aux deux clusters rencontrés chez *A. baumannii* : Oxa23/27 et Oxa24/25/26/40 (Lopez-Otsoa *et al.*, 2002, Afzal-Shah *et al.*, 2001, Bou *et al.*, 2000).

Figure 39 : Détection du gène de l'intégrase des intégrons de classe 1 de *Acinetobacter baumannii*, par PCR : mise en évidence après migration en gel d'agarose à 1,5 % (1 heure à 100 volts).



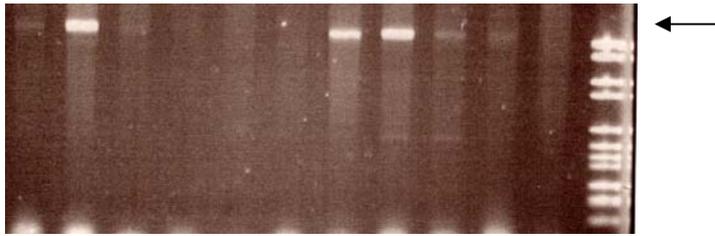
M : marqueur de taille, B : blanc.
2, 3, 4, 7, 10, 12 et 16 : souches présentant le gène de l'intégrase

En fonction du nombre de cassettes insérées, les intégrons peuvent présenter une taille plus ou moins importante. Cela présente l'inconvénient d'une possible non-détection, en raison des limites techniques de la PCR. Chez les souches qui possédaient le gène de l'intégrase des intégrons de classe 1, nous avons alors réalisé une PCR avec des amorces des régions conservées, permettant d'amplifier l'intégralité de l'intégron (**Figure 40**).

Figure 40 : Détection de l'intégron de classe 1, par PCR chez *Acinetobacter baumannii* : mise en évidence en gel d'agarose à 1,5 % (migration de 1 heure à 100 volts).

57 63 55 1 2 16 12 7 4 3

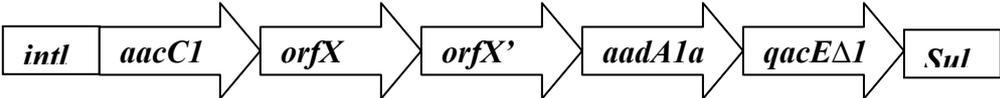
2500 paires de



M : marqueur de taille, B : blanc.
 3, 4, 7, 12, 55, 63 et 57 : souches possédant un intégron
 de classe 1

Par ailleurs, nous avons réalisé le séquençage complet de l'intégron pour l'une des souches étudiées, afin d'y rechercher la présence éventuelle d'un gène expliquant la résistance aux carbapénèmes. Ce séquençage a démontré la présence d'un élément de 2500 paires de bases, support de différents gènes de résistance, mais aucun gène permettant d'expliquer la résistance aux carbapénèmes (**Figure 41**). Un intégron du même type a été antérieurement décrit, en Italie (Gombac *et al.*, 2002), chez des souches de *A. baumannii* mais également dans d'autres espèces, suggérant des possibilités de transferts inter-espèces.

Figure 41 : Séquence de l'intégron identifié chez des souches de *Acinetobacter baumannii* résistantes aux carbapénèmes (Gen bank accession number AJ310480), d'après Gombac *et al.*, 2002.



La présence de l'intégron mis en évidence n'exclut en rien qu'il en existe éventuellement d'autres, peut-être de taille trop grande pour être révélés par les techniques de PCR classique, mais qui pourraient expliquer la résistance aux carbapénèmes des souches que nous avons étudiées.

Pour tenter de comprendre ce phénotype de résistance, il sera sans doute nécessaire de cloner la β-lactamase présentant un point isoélectrique d'environ 6,3 (compatible avec les pI des oxacillinasés), afin de la caractériser par sa séquence. Par ailleurs, il serait probablement intéressant d'évaluer l'implication complémentaire éventuelle d'un phénomène d'imperméabilité et donc d'analyser les protéines de membrane externe des souches concernées (Costa *et al.*, 2000).

IV- Etude de la régulation et des mécanismes de résistance à l'association amoxicilline plus acide clavulanique, chez des souches de *Klebsiella pneumoniae* isolées en 2002.

IV- Présentation :

L'isolement de souches de *K. pneumoniae* présentant un phénotype sauvage (par expression constitutive de la β -lactamase naturelle SHV-1) est fréquent en pathologie humaine. Le choix du traitement antibiotique alors nécessaire ne pose généralement pas de problème. Par contre, depuis une vingtaine d'années, différents types de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) ont été identifiés chez ces bacilles à Gram négatif. Les gènes codant pour ces enzymes responsables d'une résistance aux oxyimino-céphalosporines sont généralement portés par des plasmides, le plus souvent en association avec d'autres gènes de résistance aux antibiotiques, tels que les aminoglycosides et l'association triméthoprime-sulfaméthoxazole (Paterson *et al.*, 2003) ; les possibilités d'antibiothérapie se trouvent ainsi considérablement réduites.

Récemment, nous avons observé régulièrement, dans notre laboratoire, des souches de *K. pneumoniae* dont le phénotype de résistance était différent du phénotype sauvage. Après avoir sélectionné, sur une année, les souches résistantes à l'association amoxicilline/acide clavulanique, nous n'en n'avons retrouvé qu'une seule productrice de BLSE. Nous avons donc cherché à évaluer l'implication éventuelle d'une hyperexpression de l'enzyme SHV-1, par application des développements technologiques que nous avons précédemment réalisés. Les résultats obtenus nous ont ensuite conduits à nous intéresser à d'autres mécanismes de résistance aux β -lactamines, permettant d'expliquer les phénotypes observés. La mise en œuvre de techniques bactériologiques usuelles, ainsi que l'exploration génétique des promoteurs et gènes retrouvés, a révélé une possible combinaison de différents mécanismes.

IV.2- Matériel et méthodes - Résultats :

Article 4 : β -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical strains from a French hospital : genetic mechanisms and their consequences.

Stéphane Corvec, Nathalie Caroff, Daniel Cosano, Sandie Dauvergne, Henri Drugeon, Alain Reynaud. (article soumis au *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*).

**β -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* clinical strains
from a French hospital :
genetic mechanisms and their consequences.**

Stéphane CORVEC^{1*}, Nathalie CAROFF², Daniel COSANO², Sandie DAUVERGNE²,
Henri DRUGEON¹ and Alain REYNAUD²

¹Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Hygiène Hospitalière, CHU, Nantes,
France

²Laboratoire de Bactériologie-Virologie, JE Génétique des interactions hôtes-micro-
organismes, Faculté de Pharmacie, Université de Nantes, France

Keywords: β -lactamases, OmpK36, RT-PCR, promoters.

Corresponding author. Mailing address : Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène
Hospitalière, CHU de Nantes - 9 quai Moncousu, 44093 Nantes Cedex 01, France.

Phone : 33.2.40.08.39.55, E-mail : stephane.corvec@chu-nantes.fr

Abstract

Objective : To investigate the different mechanisms underlying β -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae* strains presenting a resistance pattern different from the low-level penicillinase producers, but susceptible to oxyimino-cephalosporins.

Methods : The β -lactam MICs and β -lactamase production were investigated for twenty-six *K. pneumoniae* clinical strains isolated during one year in a French hospital. Strains were compared by PFGE. *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} genes and their promoter sequences were analysed by PCR and DNA sequencing. A RT-PCR method was developed to evaluate *bla*_{SHV-1} transcripts. *OmpK36* gene was sequenced for cefoxitin resistant isolates.

Results : All strains gave a PCR product with *bla*_{SHV-1} primers, but sequencing showed that five of them presented a LEN-1 genotype, according the pI 7.1 of the β -lactamase detected by isoelectric focusing. One strain produced a SHV-44 variant defined by a single substitution (R205L). Five SHV overproducers were detected by RT-PCR on specific mRNA. Three of them harbored mutations or deletions in the *bla*_{SHV} promoter region. Eight isolates produced a TEM-type β -lactamase (1 TEM-34, 2 TEM-2 and 5 TEM-1). Seven cefoxitin resistant strains presented either small or large deletions in the *ompK36* gene.

Conclusion : Various different enzymatic or non-enzymatic mechanisms, sometimes associated, contribute to increase the resistance to β -lactams in *Klebsiella pneumoniae* clinical strains.

Introduction

Klebsiella pneumoniae strains are usually characterized by a low-level resistance to amoxicillin and ticarcillin, induced by the synthesis of a chromosomal class A β -lactamase called SHV-1. The low-level production of this enzyme enables β -lactamase inhibitors, like clavulanic acid, to restore susceptibility to amino and carboxypenicillins.

However, *K. pneumoniae* has been considered, for a long time, as the main extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producer among Enterobacteriaceae, and many studies have focused on this resistance mechanism and its dramatic consequences in terms of nosocomial outbreaks and treatment.^{1,24} Nevertheless, at the moment, it seems that other species, like *Enterobacter aerogenes*, are more frequently implicated in nosocomial outbreaks of ESBL producing strains.² Other resistance mechanisms have been punctually described in *K. pneumoniae* isolates, like IRT production,^{13,21} SHV-1 overproduction^{27,30} or porin modifications,^{10,16} but the precise quantitative role and the consequences of the association of different mechanisms have not been studied in a large number of strains.

In this paper, we investigated the effect of these different mechanisms and their association in 26 *K. pneumoniae* strains, isolated during a one-year period in a French hospital and presenting a resistance pattern different from that of wild-type strains.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains

Twenty-six clinical *K.pneumoniae* strains, selected for their resistance pattern different from the usual phenotype, were isolated in 2002 in Nantes hospital, France. Identification was performed by the VITEK2[®] system with an ID-GNB[®] (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France).

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

DNA isolation from *K. pneumoniae* and PFGE were performed as previously described with some modifications³⁴ with a *SpeI* restriction. NCTC 8523 was used as DNA size marker. The interpretation of the banding pattern was performed according to Tenover *et al.*³⁴

Susceptibility tests, MICs determination

MICs of β -lactams were determined by serial twofold agar dilution method according to the NCCLS guidelines.

β -lactamases extraction and isoelectric focusing

After an 18h culture in Trypcase Soy broth (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France), bacterial pellets were centrifugated, washed, resuspended in distilled water and then sonicated in a Branson Sonifier 250, to disrupt bacterial cell wall. After centrifugation, the supernatant contained the β -lactamase crude extract. Isoelectric focusing (IEF) was performed according to the method of Matthew *et al.*²³, using an 8 % acrylamide/bisacrylamide gel containing ampholines (pH 3.5 to 9.5). An iodine-starch agar gel containing benzylpenicillin was used to visualize the β -lactamase bands.

PCR and sequencing of bla_{TEM} and bla_{SHV} genes and ompK36 gene

Direct extraction of total bacterial DNA was performed by boiling a bacterial suspension for 5 min. After a 10 min centrifugation at 10 000g, supernatants were used as DNA templates.

PCR conditions were 95°C for 5 min, followed by 30 cycles of 95°C for 30 sec, 57°C for 30 sec, 72°C for 1 min, and a final extension step of 7 min at 72°C.

Primers used in this study are listed in table I.

RT-PCR of the *SHV* gene

Total RNA was extracted from the strains producing only the SHV-1 enzyme using the QIAGEN RNeasy Protect Bacteria Mini Kits (QIAGEN S.A., Courtaboeuf, France). Five microlitres of DNase-treated RNA was reverse-transcribed in a final volume of 25 μ L containing 50 mM of Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 400 μ M of (each) nucleotides, 2 μ M of the reverse primer (Gap A2 and SHV6) and 200 units of M-MLV-Reverse Transcriptase (Promega). The reaction mixture was incubated for one hour at 42°C, followed by a 5-minute incubation at 95°C

Ten microliters of the cDNA were used for amplification of specific *bla*_{SHV-1} mRNA using the *bla*_{SHV-1} primers : SHV5 and SHV6. The conditions were identical as described above, but 32 PCR cycles gave an optimal signal.

As a control, 25 PCR cycles were realized on the same cDNA amplifying the constitutively expressed *gap* gene, encoding D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, a highly conserved glycolysis enzyme in bacteria.⁵

These RT-PCR products were detected after migration on a 39.5:1 acrylamide/bisacrylamide gel.

RESULTS

β -Lactamase production by the 26 clinical isolates

Two hundred and fifteen *K. pneumoniae* strains were isolated in 2002 in our hospital. Most of them presented the wild phenotype (i.e. resistance to amoxicillin and ticarcillin, susceptibility to co-amoxiclav and cefoxitin). One strain presenting a strongly positive co-amoxiclav synergy test was classified as ESBL and was not further investigated. Twenty-six strains presenting a β -lactam resistance pattern different from the wild phenotype, without ESBL production, were

tested in this study. Most of them were isolated from urine and only three from blood cultures. PFGE showed all the isolates to be different.

For all isolates, the *bla*_{SHV} gene was detected by PCR but IEF performed on crude bacterial extracts showed only twenty strains to harbor a pI 7.6 β -lactamase, corresponding to the SHV-1 enzyme. One strain harbored a SHV-44 variant, characterized by a single substitution (R205L), which modified the pI (7.0 instead of 7.6).¹ Five other strains, presenting a pI 7.1 enzyme, were shown to harbor the *bla*_{LEN-1} gene by (post-PCR) sequencing. MIC for amoxicillin was lower for these isolates than for the SHV-1 producing strains (Table II).

By IEF, eight of the strains harbored a pI 7.6 β -lactamase presented also an additional band of pI 5.4 (6 strains) or 5.6 (2 strains). These results were confirmed by PCR that amplified a *bla*_{TEM} gene fragment. Sequencing of the PCR products revealed 3 TEM-1B, 2 TEM-1F, 2 TEM-2, and one TEM-34.³⁶ In these 8 strains, the additional TEM-type β -lactamase could explain the increased β -lactam resistance. Two *bla*_{TEM-2} presented their usual strong Pa/Pb promoter. More unusual was the presence of a weak P3 promoter upstream of *bla*_{TEM-1F}. These results are summarized in table II.

SHV-1 overproduction

In the group of strains producing only a SHV type β -lactamase, RT-PCR showed a large increase in SHV specific mRNA for 5 strains (1, 10, 11, 25, 29), while the control reaction measuring *gap* gene level gave a similar strong signal for all strains, despite only 25 PCR cycles (Figure 1).

Analysis of the SHV-1 promoter sequence, using one primer located upstream the -35 box and the other one located in the structural gene, revealed for two strains (1 and 25) a C→A mutation in the second base of the -10 box, already known to increase transcription,³⁰ and a 28 bp deletion downstream the -10 box for another one (strain 10 - Figure 2). However, for the other strains no mutation explaining the SHV overproduction could be detected in the promoter.

Porin modifications

Seven strains (n° 4, 7, 15, 18, 19, 24 and 26) presented a high ceftioxin MIC \geq 8 mg/L. For these strains, specific SHV mRNA appeared not to be increased. Then, the gene encoding for OmpK36 porin was analyzed by PCR. The most resistant strain (strain n°4, MIC = 128 mg/L) presented a large deletion of approximately 1000 bp, whereas the others presented numerous small deletions and point mutations in the *ompK36* gene.

DISCUSSION

Among the Enterobacteriaceae, *K. pneumoniae* differs from most other species, as it does not produce a chromosomal class C cephalosporinase (as most members of this family), but a chromosomal class A enzyme. During the last 30 years, *K. pneumoniae* has developed a multitude of acquired β -lactam resistance mechanisms - : extended-spectrum β -lactamases,¹ plasmidic cephalosporinases,^{3,4} metallo-enzyme production,²² oxacillinase production²⁹ ... - and has been a great subject of interest in the field of β -lactamases.

The purpose of this paper was to understand the mechanisms developed by *K. pneumoniae* strains isolated in our hospital and to define the contribution of each of them to the resistance.

Thirty-one percent of the strains harbored a TEM type enzyme. This percentage was very similar to that found by Chang *et al.*⁸ In their study, all the isolates were of the TEM-1 type, but they did not investigate the TEM-1 variants. Inhibitory resistant TEM-type β -lactamase have been first described in *E. coli* at the beginning of the 1990's, but have then spread to other Enterobacteriaceae, like *K. pneumoniae* or *Proteus mirabilis*.⁷ Only one IRT enzyme (TEM-34 or IRT-6) has been detected in this study, showing that this mechanism has not spread widely in our hospital in *K. pneumoniae*. It is interesting to note that the Met-69 \rightarrow Val substitution,

characteristic of IRT-6, can occur either on a bla_{TEM-2} or a bla_{TEM-1} gene framework.⁶ Here, the overproduction of IRT-6 is the consequence of a C-32 → T mutation upstream of the bla_{TEM} gene, leading to a strong overlapping Pa/Pb promoter, usually described upstream of bla_{TEM-2} .^{18,19} bla_{TEM-1F} gene is also usually under the control of a strong P4 promoter, but this was not observed in both isolates of this study.²⁰ At the opposite, bla_{TEM-1B} gene is usually associated with a weak P3 promoter. It is interesting to notice that co-amoxiclav MICs are well correlated with the strength of the bla_{TEM} promoter, and that the most resistant isolate to this antibiotic is the IRT-producer.

Strains that did not produce a TEM type enzyme were studied for SHV overproduction that could explain the observed resistance pattern. Then, RT-PCR was used to detect and evaluate the amount of specific SHV mRNA, compared with an external standard. Five isolates were shown to overproduce a SHV type β -lactamase. RT-PCR technology well detected the correlated amount of specific transcripts and this powerful tool could be used to study the regulation of resistance gene expression. Nevertheless, working on bacterial mRNA is not easy, because of their short half life and instability : standardization of bacterial growth is needed and DNase treatment is necessary to eliminate residual DNA.³¹

It has been shown, by site-directed mutagenesis, that the mutation in the second base of the Pribnow box increased transcription of the bla_{SHV-1} gene.³⁰ This mutation increases the homology with the -10 consensus sequence TATAAT, defined in *Escherichia coli*. The closer to the consensus, the stronger the promoter. Among our SHV overproducers, two strains presented this mutation. Another promoter presented a 28 bp deletion that did not affect the boxes.

Studying the SHV-1 promoter, we noticed that five genes presented a sequence closer to bla_{LEN-1} than bla_{SHV-1} . The loci for *SHV-1* and *LEN-1* genes are probably arranged in tandem.⁹ These findings support the hypothesis of a common chromosomal ancestor.¹⁴

During this study, we reported a new SHV variant, SHV-44, previously described in *K. pneumoniae* but detected in association with TEM-15, so that the effect of each enzyme could not be determined.¹ The *bla*_{SHV} gene harbored three silent mutations and a substitution (R205L). To our knowledge, it is the first description of SHV-44 alone in a *K. pneumoniae* strain. The replacement of the basic amino-acid Arg by Leu decreases the β -lactamase pI. This mutation does not enhance the resistance to broad-spectrum cephalosporins as the mutation (G238S) described in SHV-5.

Seven strains presented high cefoxitin MICs whereas they did not produce a TEM β -lactamase neither overproduce SHV-1. These strains were suspected to present a decreased permeability to β -lactam antibiotics. OmpK35 and OmpK36 are the two major porins equivalent, respectively, to OmpF and OmpC of *E. coli*. Another quiescent porin has been detected in *K. pneumoniae* and called OmpK37.¹¹ Numerous studies have shown that decrease or loss of one or both porins could be implicated in β -lactam resistance.^{12,15,17,25,26} *OmpK36* gene has been sequenced in seven strains. At the opposite to the description by Hernandez-Alles *et al.*,¹⁶ for laboratory mutants, but also for clinical strains, no insertion sequence disrupting the gene could be detected in the sequenced genes. However, in one cefoxitin resistant isolate, a very large deletion was found, obviously leading to the total absence of the corresponding protein. In the others, numerous point mutations and small deletions, necessarily modifying the reading frame were detected.

Decreased permeability has been previously described essentially in association with ESBL, leading to high level of resistance. In association with SHV-1 overproduction, this impermeability have yet led to false identification of ESBL.³⁵

In recent years, it was shown that, in many species, decreased permeability alone could not lead to high level of resistance, but could act in synergy with β -lactamase to induce very high level of resistance. According to the various β -lactamases that can be acquired by a strain of *K. pneumoniae*, the factors, and particularly antibiotic treatments,²⁸ that can induce this decreased permeability have to be studied.

REFERENCES

1. Arpin, C., Dubois, V., Coulange, L., Andre, C., Fischer, I., Noury, P., *et al.* (2003). Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in community and private health care centers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3506-3514.
2. Bertrand, X., Hocquet, D., Boisson, K., Siebor, E., Plesiat, P. & Talon, D. (2003). Molecular epidemiology of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamase in a French university-affiliated hospital. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **22**, 128-133.
3. Bonnet, R. (2004). Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases : the CTX-M Enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1-14.
4. Bradford, P. A., Urban, C., Mariano, N., Projan, S. J., Rahal, J. J. & Bush, K. (1997). Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC β -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **41**. 563-569.

5. Branlant, G. & Branlant, C. (1985). Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* gap gene. Different evolutionary behavior of the NAD⁺-binding domain and of the catalytic domain of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Eur J. Biochem.* **150**, 61-66.
6. Canica, M. M., Lu, C. Y., Krishnamoorthy, R. & Paul, G. C. (1997). Molecular diversity and evolution of *bla*_{TEM} genes encoding β -lactamases resistant to clavulanic acid in clinical *E. coli*. *J. Mol. Evol.* **44**, 57-65.
7. Chaibi, E. B., Sirot, D., Paul, G. & Labia, R. (1999). Inhibitor-resistant TEM β -lactamases : phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**, 447-458.
8. Chang, F.-Y., Siu, L. K., Fung, C.-P., Huang, M.-H. & Ho, M. (2001). Diversity of SHV and TEM β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* : Gene Evolution in Northern Taiwan and Two Novel β -Lactamases, SHV-25 and SHV-26. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2407-2413.
9. Chaves, J., Ladona, M. G., Segura, C., Coira, A., R.Reig & Ampurdanes, C. (2001). SHV-1 β -lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **45**, 2856-2861.
10. Crowley, B., Benedi, V. J. & Domenech-Sanchez, A. (2002). Expression of SHV-2 β -lactamase and of reduced amounts of OmpK36 porin in *Klebsiella pneumoniae* results in increased resistance to cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **46**, 3679-3682.
11. Doménech-Sanchez, A., Hernandez-Allès, S., Martinez-Martinez, L., Benedi, V. J. & Alberti, S. (1999). Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae* : its role in β -lactam antibiotic resistance. *Journal of Bacteriology.* **181**, 2726-2732.

12. Domenech-Sanchez, A., Martinez-Martinez, L., Hernandez-Allés, S., Conejo, M. C., Pascual, A., Tomas, J. M., *et al.* (2003). Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **47**, 3332-3335.
13. Girlich, D., Karim, A., Poirel, L., Cavin, M. H., Verny, C. & Nordmann, P. (2000). Molecular epidemiology of an outbreak due to IRT-2 β -lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric department. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**, 467-473.
14. Haeggman, S., Lofdahl, S. & Burman, L. G. (1997). An allelic variant of the chromosomal gene for class A β -lactamase K2, specific for *Klebsiella pneumoniae*, is the ancestor of SHV-1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 2705-2709.
15. Hernandez-Allés, S., Alberti, S., Alvarez, D., Doménech-Sanchez, A., Martinez-Martinez, L., Gil, J., *et al.* (1999). Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology.* **145**, 673-679.
16. Hernandez-Allés, S., Benedi, V. J., Martinez-Martinez, L., Pascual, A., Aguilar, A., Tomas, J. M., *et al.* (1999). Development of resistance during antimicrobial therapy caused by insertion sequence interruption of porin genes. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **43**, 937-939.
17. Hernandez-Allés, S., Conejo, M., Pascual, A., Tomas, J. M., Benedi, V. J. & Martinez-Martinez, L. (2000). Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**, 273-277.
18. Lartigue, M. F., Leflon-Guibout, V., Poirel, L., Nordmann, P. & Nicolas-Chanoine, M. H. (2002). Promoters P3, Pa/Pb, P4, and P5 upstream from *bla*_{TEM} genes and their relationship to β -lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 4035-4037.
19. Leflon-Guibout, V., Heym, B. & Nicolas-Chanoine, M.-H. (2000). Updated Sequence Information and Proposed Nomenclature for *bla*_{TEM} Genes and Their Promoters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 3232-3234.

20. Leflon-Guibout, V., V, S., B, H. & Nicolas-Chanoine, M. H. (2000). Epidemiological survey of amoxicillin-clavulanate resistance and corresponding molecular mechanisms in *Escherichia coli* isolates in France: new genetic features of *bla*_{TEM} genes. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **44**, 2709-2714.
21. Lemozy, J., Sirot, D., Chanal, C., Huc, C., Labia, R., Dabernat, H., *et al.* (1995). First characterization of inhibitor-resistant TEM (IRT) β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2580-2582.
22. Luzzaro, F., Docquier, J. D., Colinon, C., Endimiani, A., Lombardi, G., Amicosante, G., *et al.* (2004). Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo- β -lactamase encoded by a conjugative plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 648-650.
23. Matthew, M., Harris, A. & Marshall, M. (1975). The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. *Journal of General Microbiology.* **88**, 169-178.
24. Melano, R., Corso, A., Petroni, A., Centron, D., Orman, B., Pereyra, A., *et al.* (2003). Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum β -lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 36-42.
25. Nelson, E. C., Segal, H. & Elisha, B. G. (2003). Outer membrane protein alterations and *bla*_{TEM-1} variants : their role in β -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**, 899-903.
26. Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* **67**, 593-656.
27. Petit, A., Ben Yaghlane-Bousslama, H., Sofer, L. & Labia, R. (1992). Does high level production of SHV-type penicillinase confer resistance to ceftazidime in Enterobacteriaceae ? *FEMS Microbiol Lett.* **71**, 89-94.

28. Poirel, L., Heritier, C., Podglajen, I., Sougakoff, W., Gutmann, L. & Nordmann, P. (2003). Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV β -lactamase that compromises the efficacy of imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 755-758.
29. Poirel, L., Heritier, C., Tolun, V. & Nordmann, P. (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 15-22.
30. Rice, L. B., Carias, L. L., Hujer, A. M., Bonafede, M., Hutton, R., Hoyen, C., *et al.* (2000). High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 β -lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **44**, 362-367.
31. Rokbi, B., Seguin, D., Guy, B., Mazarin, V., Vidor, E., Mion, F., *et al.* (2001). Assessment of *Helicobacter pylori* gene expression within mouse and human gastric mucosae by real-time reverse transcriptase PCR. *Infect. Immun.* **69**, 4759-4766.
32. Siu, L. K., Ho, P. L., Yuen, K. Y., Wong, S. S. & Chau, P. Y. (1997). Transferable hyperproduction of TEM-1 β -lactamase in *Shigella flexneri* due to a point mutation in the pribnow box. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 468-470.
33. Sutcliffe, J. G. (1978). Nucleotide sequence of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **75**, 3737-3741.
34. Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B. E., Persing, D. H., *et al.* (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis : criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2233-2239.
35. Wu, T. L., Siu, L. K., Su, L. H., Lauderdale, T. L., Lin, F. M., Leu, H. S., *et al.* (2001). Outer membrane protein change combined with co-existing TEM-1 and SHV-1 β -

lactamases lead to false identification of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**, 755-761.

36. Zhou, X. Y., Bordon, F., Sirot, D., Kitzis, M. D. & Gutmann, L. (1994). Emergence of clinical isolates of *Escherichia coli* producing TEM-1 derivatives or an OXA-1 β -lactamase conferring resistance to β -lactamase inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1085-1089.

Table I. Primers used in the study.

Primer names	Sequence 5'-3'	role	References
TEM A	GACTGGATGGAGGCGGAT	PCR/Sequencing of the <i>bla</i> _{TEM} gene	33
TEM B	CAATGCTTAATCAGTGAGGC	PCR/Sequencing of the <i>bla</i> _{TEM} gene	33
TEM C	TGATAACACTGCGGCCAACT	PCR/Sequencing of the <i>bla</i> _{TEM} gene	33
TEM D	ATAAACCAGCCAGCCGGAAG	PCR/Sequencing of the <i>bla</i> _{TEM} gene	33
TEM E	GTATCCGTCATGAGACAAT	PCR/Sequencing of the <i>bla</i> _{TEM} gene	33
TEM F	GATCAAGGCGAGTTACATGA	PCR/Sequencing of the <i>bla</i> _{TEM} gene	33
TEM G	GAATTCTGAAGACGAAAGG	PCR/Sequencing of the <i>bla</i> _{TEM} promoter	33
TEM H	CGACACGGAAATGTTGAATA	PCR/Sequencing of the <i>bla</i> _{TEM} promoter	33
SHV 2	TCATGGGAAAGCGTTCATCGG	PCR/Sequencing of the <i>bla</i> _{SHV} promoter	30
SHV 3	AGTTCATCACGGCCTTGAGTC	PCR/Sequencing of the <i>bla</i> _{SHV} promoter	30

		promoter	
SHV 5	CGCAGCCGCTTGAGCAAATTA	RT-PCR of SHV mRNA	30
SHV 6	TATCGTCATGGTAATGGCGG	RT-PCR of SHV mRNA	30
SHV7	GCAGTGCTGGCGGGGTGGA	PCR/Sequencing of the <i>bla</i> _{SHV} gene	30
SHV8	CATCATTACCGACCGGCATCT	PCR/Sequencing of the <i>bla</i> _{SHV} gene	30
Gap 1	ATCAACGGTTTTGGCCGTAT	External control for RT-PCR	5
Gap 2	GTTGATAACTTTAGCCAGCGG	External control for RT-PCR	5
Omp K 36A	AAGTTAAAGTACTGTCCCTCC	PCR/Sequencing of the <i>ompK36</i> gene	17
OmpK 36B	TTGTTGGTCGGAGAAGTACC	PCR/Sequencing of the <i>ompK36</i> gene	17
OmpK 36C	TTGTAGTCAACATAGGTGGAC	PCR/Sequencing of the <i>ompK36</i> gene	17
OmpK 36D	AACTTCCTGCAGTCCCGTG	PCR/Sequencing of the <i>ompK36</i> gene	17

Table II. Characteristics of the 26 *Klebsiella pneumoniae* studied strains.

N° strains	PCR		IEF	MIC (mg/L)					<i>bla</i> _{SHV} gene promoters	m RNA SHV	β-lactamases	<i>bla</i> _{TEM} gene promoters
	SHV	TEM		AMX	AMC	TIC	CF	FOX				

1	+	-	7,6	2048	128	2048	64	2	0,125	A	+++	SHV-1	ND
25	+	-	7,6	1024	8	2048	1	4	0,03	A	++	SHV-1	ND
10	+	-	7,6	2048	512	2048	4	4	0,03	del 28 bp	+++	SHV-1	ND
29	+	-	7,6	2048	16	2048	4	2	0,03	N	++	SHV-1	ND
4	+	-	7,6	128	8	256	32	128	> 0,5	N	-	SHV-1	ND
24	+	-	7,6	64	8	256	2	32	0,25	N	-	SHV-1	ND
15	+	-	7,6	128	8	256	2	16	0,125	N	-	SHV-1	ND
18	+	-	7,6	2048	32	2048	16	16	0,25	N	-	SHV-1	ND
19	+	-	7,6	256	8	512	2	16	0,25	N	-	SHV-1	ND
6	+	-	7,6	128	4	256	1	4	0,03	N	-	SHV-1	ND
8	+	-	7,6	256	8	512	2	4	0,03	N	-	SHV-1	ND
14	+	-	7,6	256	8	512	2	4	0,03	N	-	SHV-1	ND
11	+	-	7	2048	64	2048	8	2	0,03	N	+++	SHV-44	ND
7	+	-	7,1	64	2	64	2	32	0,25	N	-	LEN-1	ND
26	+	-	7,1	64	8	124	2	16	0,125	N	-	LEN-1	ND
22	+	-	7,1	64	8	128	2	8	0,125	N	-	LEN-1	ND
28	+	-	7,1	64	8	128	2	8	0,25	N	-	LEN-1	ND
21	+	-	7,1	64	4	128	1	4	0,03	N	-	LEN-1	ND
2	+	+	5,4+7,6	1024	16	2048	1	4	0,03	ND	ND	SHV-1, TEM-1B	P3
17	+	+	5,4+7,6	2048	32	2048	2	8	0,03	ND	ND	SHV-1, TEM-1B	P3
23	+	+	5,4+7,6	512	8	2048	2	4	0,03	ND	ND	SHV-1, TEM-1B	P3
20	+	+	5,4+7,6	2048	16	2048	2	4	0,06	ND	ND	SHV-1, TEM-1F	P3
16	+	+	5,4+7,6	2048	16	2048	4	8	0,06	ND	ND	SHV-1, TEM-1F	P3
13	+	+	5,6+7,6	2048	64	2048	8	4	0,03	ND	ND	SHV-1, TEM-2	Pa/Pb
27	+	+	5,6+7,6	2048	64	2048	4	8	0,13	ND	ND	SHV-1, TEM-2	Pa/Pb
3	+	+	5,4+7,6	2048	1024	2048	1	4	0,03	ND	ND	SHV-1, TEM-34	Pa/Pb

N : promoters identical to *bla*_{SHV-1}

del 28 : deletion of 28 bp after the -10 box.

ND : not detected.

A : substitution of cytosine by adenine.

AMX : amoxicillin, AMC : amoxicillin + clavulanate, TIC : ticarcillin, CF : cefalotin, FOX : cefoxitin,

CTX : cefotaxime.

Fig 1. Comparison of the mRNA specific of *bla*_{SHV-1} gene (a) and *gap* gene (b). Lane B : Blank, lane 1 : strain 29, lane 2 : strain 1, lane 3 : strain 14, lane 4 : strain 21, lane 5 : strain 8 and lane 6 : strain 10.

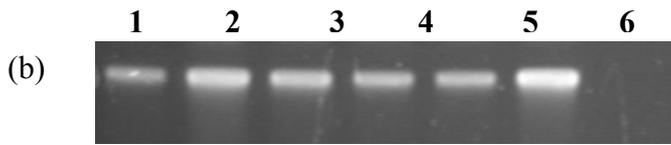
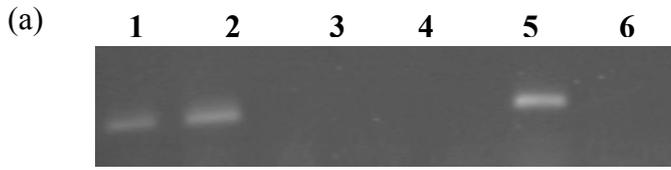


Fig 2. Comparison of the *bla*_{SHV-1} promoter regions of *Klebsiella pneumoniae* strains. Start codon is shown in boldface type and *bla*_{shv-1} gene sequence is underlined. Identical sequences are

represented by dashed lines. Deletion is represented by asterisks. Characteristics of the strains are reported in table II.

	-35 box	-120	-10 box	-100	-80
Strains n°4, 6, 8, 14, 15, 18, 19 and 24	<u>GCTATATTGATTATTCGAAATAAAAGATGACAAATGATGAAGGAAAAAAGAGGAATTGTG</u>				
Strain n°1	-----A-----				
Strain n°10	-----*****-----				
Strain n°25	-----A-----C-----				
	-60		-40		-20
Strains n°4, 6, 8, 14, 15, 18, 19 and 24	<u>AAAGCAAACGCCGGTTATTCTTATTTGTCGCTTCTTTACTCGCCTTTATCGGCCCTCA</u>				
Strain n°1	-----				
Strain n°10	*****-----				
Strain n°25	-----				
	+1		+20		+40
Strains n°4, 6, 8, 14, 15, 18, 19 and 24	<u>CAAGGATGTATTGTGGTTATGCGTTATATTCGCCTGTGTATTATCTCCCTGTTAGCCACT</u>				
Strain n°1	-----				
Strain n°10	-----T-----				
Strain n°25	-----				
	+60		+80		
Strains n°4, 6, 8, 14, 15, 18, 19 and 24	<u>GCCGCTGGCGGTACACGCCAGCCCGCAGCCGCTTGAGCAAATTAA</u>				
Strain n°1	-----				
Strain n°10	-----				
Strain n°25	-----				

IV.3- Commentaires :

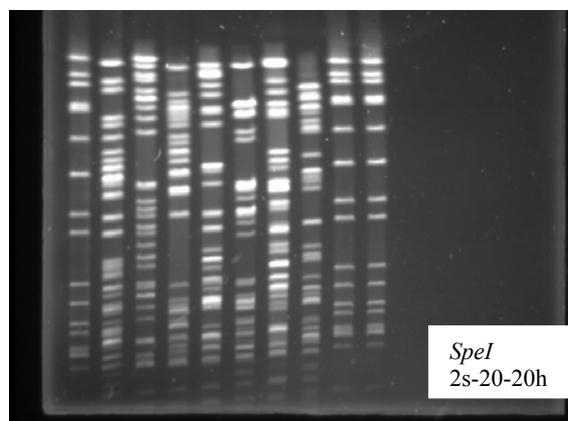
Parmi les entérobactéries, l'espèce *K. pneumoniae* se distingue par la production d'une β -lactamase naturelle de classe A : la pénicillinase SHV-1. Le phénotype de résistance des souches sauvages est caractérisé par une résistance à l'égard des pénicillines A et carboxy-pénicillines.

Des phénotypes de résistance différents de celui précédemment décrit sont cependant régulièrement observés au laboratoire, le plus connu étant la production de β -lactamase à spectre étendu, objectivé par un test de synergie positif entre l'acide clavulanique et les oxyimino-céphalosporines (Arpin *et al.*, 2003). Bien qu'initialement décrites chez *K. pneumoniae*, la présence de ces enzymes est rapportée aujourd'hui chez de nombreux membres de la famille des entérobactéries, et la dissémination des souches qui les produisent est mondiale (Perilli *et al.*, 2002). Au cours de notre étude, une seule souche présentait un test de synergie positif. Au sein de notre hôpital, nous détectons plus de β -lactamases à spectre étendu chez des espèces telles que *E. coli*, *E. aerogenes* ou *Proteus mirabilis* que chez *K. pneumoniae*.

Après exclusion de cette souche productrice de BLSE, l'objectif de notre travail a été de détecter et de caractériser les éventuels mécanismes responsables de la résistance observée à l'égard de l'association amoxicilline-acide clavulanique essentiellement, mais aussi de la céfoxitine. Les 26 souches sélectionnées, sur les 215 isolées au cours de l'année 2002, provenaient de diverses unités de soins et, pour la majorité d'entre elles, d'exams cyto-bactériologiques des urines. Le typage moléculaire, par électrophorèse en champ pulsé, a mis en évidence une grande hétérogénéité des isolats (Figure 42).

Figure 42 : Comparaison des profils obtenus par électrophorèse en champ pulsé, pour 7 souches de *Klebsiella pneumoniae* étudiées.

M 6 8 10 11 14 20 29 M M

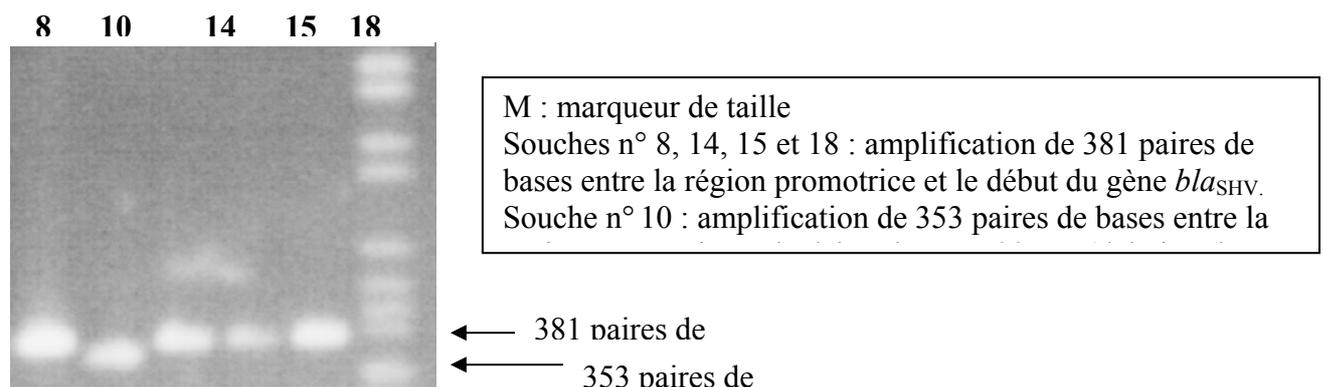


Les techniques bactériologiques classiques, associant la mesure de la CMI à l'égard de diverses β -lactamines et l'isoélectrofocalisation analytique, ont permis un premier classement de ces

souches de *K. pneumoniae*. Les techniques moléculaires ont ensuite approfondi l'investigation de leur résistance aux β -lactamines.

L'hyperproduction du gène chromosomique *bla_{SHV}* a été objectivée par RT-PCR, chez cinq souches (19,2 %). Parmi ces souches, deux présentaient une mutation antérieurement décrite par Rice *et al.* dans la Pribnow box ou box -10 (Rice *et al.*, 2000). Par contre, une souche (souche n°10) présentait une délétion de 28 paires de bases en aval de ce même hexamère (Figure 43) ; sa CMI à l'égard de l'association amoxicilline-acide clavulanique était la plus élevée (CMI = 512 mg/L) dans le groupe qui ne possédait pas d'autre enzyme inactivatrice. Le rôle de cette délétion, qui n'affecte pas les boxes, devrait être étudié prochainement dans notre laboratoire.

Figure 43 : Visualisation de la différence de taille de l'amplicon correspondant à l'amplification de la région en amont du gène *bla_{SHV}* des souches de *Klebsiella pneumoniae*.

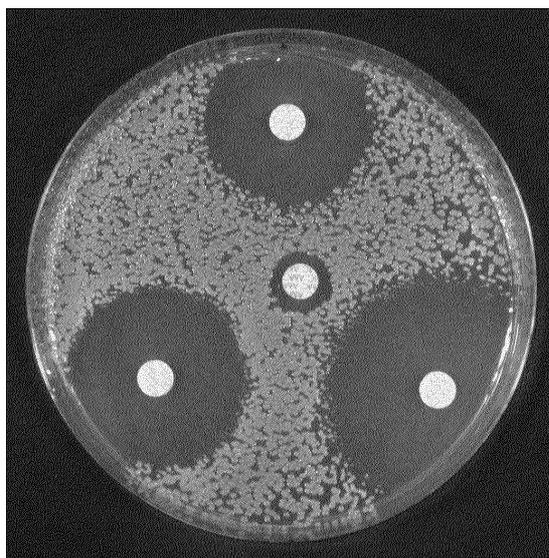


Le séquençage de la région promotrice de *bla_{SHV}* des deux dernières souches hyperproductrices de l'enzyme correspondante n'a révélé aucune mutation ou autre événement génétique, susceptible d'expliquer ce niveau de production. Ainsi, il semble exister d'autres facteurs capables d'augmenter le niveau de transcription de ce gène chromosomique.

Par ailleurs, la souche n°11 présentait un pI de 7,0 en isoélectrofocalisation, alors que celui de SHV-1 est classiquement détecté à 7,6 (Chaves *et al.*, 2001, Haeggman *et al.*, 1997). Afin de comprendre cette modification, nous avons réalisé le séquençage de l'intégralité du gène *bla_{SHV}* : quatre mutations ponctuelles ont été détectées, dont trois étaient silencieuses ; la dernière entraîne une substitution de l'acide aminé basique en position 205 (Arginine → Leucine), responsable de la diminution du pI.

Cette enzyme a été très récemment décrite et dénommée SHV-44 (Arpin *et al.*, 2003). La souche chez laquelle les auteurs l'avaient détectée produisait aussi une enzyme TEM-15. Les auteurs stipulaient que le remplacement de l'arginine par la leucine, en position 205, ne modifiait pas le spectre d'activité de l'enzyme, ce que nous confirmons ici, puisque notre souche (qui ne produit pas d'autre β -lactamase), conserve une très grande sensibilité vis-à-vis des céphalosporines de troisième génération (Figure 44).

Figure 44 : Test de synergie réalisé sur la souche n° 11 exprimant uniquement le gène *bla_{SHV44}*.



Dans notre panel, huit souches sur 26 (30,8 %) possédaient une β -lactamase de type TEM. L'analyse moléculaire des promoteurs de ces huit souches a confirmé le rôle des régions promotrices dans la régulation de l'expression des gènes de β -lactamases (Tableau VI, p. 140).

Enfin, il nous semble judicieux de poursuivre l'investigation de la résistance par imperméabilité, chez les souches qui présentent une diminution de sensibilité ou une résistance à l'égard de la céfoxitine, afin de mieux comprendre les modifications moléculaires et leur impact sur la résistance aux β -lactamines. Une analyse des protéines de membrane externe s'avère nécessaire, pour mesurer l'effet des nombreuses mutations et délétions détectées dans les gènes. Toutefois, ces techniques se prêtent mal à une analyse quantitative. Dans ce domaine des résistances par défaut de perméabilité, il est très difficile de relier génotype et phénotype. En effet, la redondance fonctionnelle existant entre les différentes porines fait que l'absence ou la diminution de l'une d'entre elle peut être compensée par la surexpression d'une autre.

Tableau VI : Comparaison des séquences nucléotidiques des promoteurs et des gènes *bla*_{TEM} retrouvés chez les souches de *Klebsiella pneumoniae* étudiées.

AA*	Polymorphismes des promoteurs et des									Données concernant les souches de l'étude							
	1A	1B	1C	1D	1E	1F	1G	1H	2	n°2	n°3	n°13	n°16	n°17	n°20	n°23	n°27
32	C	C	C	C	C	C	C	T	T	C	T	T	C	C	C	C	T
162	G	G	G	G	G	T	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
175	A	G	A	A	G	A	A	G	A	G	G	A	A	G	A	G	A
226	C	T	C	C	T	C	C	T	C	T		C	C	T	C	T	C
317	C	C	C	C	C	C	C	C	A	C	C	A	C	C	C	C	A
346	A	A	A	A	G	G	A	G	G	A	A	G	G	A	G	A	G
436	C	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
604	G	T	G	G	T	G	T	T	G	T	T	G	G	T	G	T	G
682	T	T	T	T	T	C	T	C	C	T	T	C	C	T	C	T	C
913	C	C	C	T	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
925	G	G	G	G	G	A	G	G	A	G	G	A	A	G	A	G	A
Point isoélectrique de la β -lactamase produite										5,4	5,4	5,6	5,4	5,4	5,4	5,4	5,6
Gène <i>bla</i> _{TEM} identifié										1B	34	2	1F	1B	1F	1B	2
Promoteurs du gène <i>bla</i> _{TEM} identifié										P3	Pa/Pb	Pa/Pb	P3	P3	P3	P3	Pa/Pb

AA* : position de l'acide aminé selon la classification de Ambler.

V- Etude du système d'efflux constitutif MexAB-OprM chez une souche de *Pseudomonas aeruginosa* surexprimant ce système : rôle d'une séquence d'insertion IS21 dans le gène régulateur *mexR*.

V.1- Présentation :

Bien que la résistance aux β -lactamines chez les bacilles à Gram négatif soit essentiellement liée à la synthèse d'enzymes inactivatrices, d'autres mécanismes, comme la modification de PLPs ou l'altération des porines, peuvent aussi être impliqués, seuls ou en participant à une augmentation du niveau de résistance aux β -lactamines.

Chez *P. aeruginosa*, de nombreux mécanismes de résistance acquise aux antibiotiques coexistent. A l'état naturel, il existe deux mécanismes de résistance : d'une part, la présence d'une enzyme inactivatrice des β -lactamines qui est une céphalosporinase AmpC inductible et, d'autre part, un système d'efflux actif, le système MexAB-OprM qui entraîne l'extrusion des xénobiotiques vers le milieu extérieur *via* une pompe d'efflux actif, énergie-dépendante.

Ce système est le seul qui soit exprimé physiologiquement chez cette bactérie possédant déjà, par ailleurs, une imperméabilité naturelle nettement supérieure à celle des entérobactéries (Nikaido, 1996). Son hyperexpression contribue à une résistance de bas niveau aux β -lactamines, notamment à l'égard de la ticarcilline, seule ou associée à un inhibiteur de β -lactamases, ainsi qu'à l'aztréoname. La régulation de l'opéron rassemblant les gènes codant pour MexAB-OprM est de type transcriptionnel, grâce au gène *mexR* situé en amont (Sanchez *et al.*, 2002). Les bactéries exprimant ce phénotype de résistance (*nalB*) présentent le plus souvent des mutations ponctuelles dans le gène régulateur *mexR* (Adewoye *et al.*, 2002, Srikumar *et al.*, 2000).

L'application des moyens technologiques précédemment développés nous a permis de caractériser le mécanisme en cause, chez une souche résistante à bas niveau aux β -lactamines, en raison de l'interruption du gène *mexR* par une séquence d'insertion de 2131 paires de bases.

V.2- Matériel et méthodes - Résultats :

Article 5 : **Detection of an IS21 insertion sequence in the *mexR* gene of *Pseudomonas aeruginosa* increasing β -lactam resistance.**

David Boutoille, Stéphane Corvec, Nathalie Caroff, Cécile Giraudeau, Eric Espaze, Jocelyne Caillon, Patrick Plésiat, Alain Reynaud. (2004) *FEMS Microbiology Letters*, **230**:143-146.

Detection of an IS21 insertion sequence in the *mexR* gene of *Pseudomonas aeruginosa* increasing β -lactam resistance

David Boutoille ^a, Stéphane Corvec ^a, Nathalie Caroff ^{b,*}, Cécile Giraudeau ^a,
Eric Espaze ^a, Jocelyne Caillon ^a, Patrick Plésiat ^c, Alain Reynaud ^b

^a Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène Hospitalière, CHU de Nantes, 44093 Nantes Cedex 01, France

^b Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Faculté de Pharmacie de Nantes, UFR de Sciences Pharmaceutiques, 1 rue G. Veil, 44035 Nantes Cedex 01, France

^c Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Jean Minjot, F-25030 Besançon, France

Received 9 September 2003; received in revised form 17 October 2003; accepted 18 November 2003

First published online 6 December 2003

Abstract

To understand the regulation of the MexAB OprM efflux system in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* presenting a decreased susceptibility to ticarcillin and aztreonam, the *mexR* repressor gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and was shown to be disrupted by an insertion sequence of more than 2 kb, with characteristic direct and inverted repeat sequences. Sequencing revealed a 2131-bp IS21 insertion sequence. A reverse transcription PCR method was used to quantify *mexA* transcripts and showed an increased transcription rate of *mexA* in this strain, compared with a PAO1 control strain. The *nalB* phenotype in *P. aeruginosa* may be due to point mutations, but also to the presence of an insertion sequence in the *mexR* regulator gene.

© 2003 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Efflux; Regulation; Transcription; Insertion sequence

1. Introduction

Antimicrobial chemotherapy of *Pseudomonas aeruginosa* infections is a major problem, especially in hospitals, since this bacterium exhibits natural and acquired resistance to many antibiotics. Among resistance mechanisms expressed by *P. aeruginosa*, the importance of antibiotic efflux in multidrug-resistant strains is becoming more and more recognized [1,2]. These efflux pumps are tri-component systems consisting of three proteins: an outer membrane porin-like protein (OprM), bound to a member of the resistance-nodulation-division family of energy-driven efflux pumps (MexB) via a periplasmic fusion protein (MexA) which forms a channel enabling the cell to expel antibiotics from the cytoplasm or from the periplasmic space. While it is constitutively expressed, at a low level, in

wild-type strains, the *mexAB-oprM* operon is overexpressed in *nalB* mutants [3]. This operon is regulated by MexR, a regulatory protein belonging to the MarR family [4]. Mutations in the *mexR* gene have been associated with the *nalB* phenotype [5]. It is particularly interesting to understand the different mechanisms used by *P. aeruginosa* to overproduce MexAB-oprM, as recent studies tend to prove that this efflux system exports not only antibiotics, but also virulence factors that could play a major role in invasiveness of this nosocomial pathogen [6,7].

In this paper, we describe an IS21 insertion in the *mexR* gene, increasing *mexAB-OprM* operon transcription rate.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains

Strain 5031 was isolated from the trachea of an 11-month-old child hospitalized in Nantes hospital, France, in 1996. Strain identification was performed by conventional methods. It belongs to *P. aeruginosa* serogroup O11. A PAO1 wild-type strain was used as a control.

* Corresponding author. Tel.: +33 (240) 41 29 48;
Fax: +33 (240) 41 28 41.

E-mail address: nathalie.caroff@sante.univ-nantes.fr (N. Caroff).

2.2. Minimum inhibitory concentration (MIC) determination

MICs for various β -lactams were determined by the E-test method, according to NCCLS guidelines.

2.3. Isoelectric focusing

After 18 h of culture in trypticase-soy broth (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), bacterial pellets were obtained through 20 min centrifugation at $10\,000\times g$. After washing and resuspension in distilled water, bacterial pellets were sonicated in a Branson 250 sonifier to disrupt bacterial cell wall (intermittent exposure of 5×30 s). After centrifugation, the supernatant contained the β -lactamase crude extract.

Isoelectric focusing was performed according to the method of Matthew et al. [8], using an 8% acrylamide/bisacrylamide gel containing ampholines (pH 3.5–9.5). An iodine-starch agar gel containing benzylpenicillin was used to visualize the β -lactamase bands.

2.4. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of the *mexR* gene

In order to search for mutations in the *mexR* gene, primers *mex1*₁₇₁CATGGCCCATATTCAGAACC₁₉₀ and *mex8*₅₁₅AGGTTTCTTCCCTCCAGCTC₄₉₆ were chosen to amplify a 344-bp fragment [4]. Rapid DNA extraction was performed by heating a suspension of bacteria to 95°C for 5 min in a final volume of 50 μ l of distilled sterile water. After centrifugation, the supernatant was used as DNA template. The PCR reaction was performed in a final volume of 50 μ l containing 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M of each nucleotide, 1 μ M of each primer, 1.25 U of *Taq* DNA polymerase (Promega, Charbonnières, France) and 10 μ l of bacterial DNA. After 5 min initial denaturation at 94°C, the PCR procedure consisted in 30 cycles of 30 s denaturation at 94°C, 30 s annealing at 55°C, and 2 min extension at 72°C, followed by a final extension step of 7 min at 72°C.

2.5. Cloning and sequencing of the insert

The PCR product was cloned in pGEM-T-easy vector (Promega) and sequenced with the ABI Prism Big Dye Terminator cycle sequencing system (Perkin-Elmer, Applied Biosystems) using four pairs of overlapping primers. The BLAST program was used to analyze the nucleotide sequence.

2.6. Quantification of transcripts by RT-PCR

A suspension of 10^8 bacteria ml⁻¹ was diluted 1:1000 in fresh Luria broth medium to obtain a bacterial density of

approximately 10^5 bacteria ml⁻¹. The cultures were grown to mid-exponential phase at 37°C, until they reached an optical density of 0.25 measured at 600 nm. Total RNA was extracted using the Qiagen RNeasy Protect Bacteria Mini Kits (Qiagen, Courtaboeuf, France) and diluted 1:100. DNase treatment was performed for 15 min at 25°C in a final volume of 16 μ l containing 2 U of RQ1 RNase-free DNase (Promega) in the presence of 80 U of RNasin[®] ribonuclease inhibitor (Promega). EDTA was added to a final concentration of 2.5 mM and the DNase was inactivated by 10 min incubation at 65°C.

Five microliters of DNase-treated RNA were reverse-transcribed in a final volume of 25 μ l containing 50 mM of Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 400 μ M of each nucleotide, 2 μ M of the reverse primer (LA19 and 16S reverse) [9,10] and 200 U of M-MLV Reverse Transcriptase (Promega). The reaction mixture was incubated for 1 h at 42°C, followed by a 5-min incubation at 95°C.

Ten microliters of the cDNA were then used for amplification of the *mexR-mexA* intergenic region with previously described primers K14 and LA19 [9]. Ten microliters were used for amplification with 16S rRNA universal primers [10].

Densitometric analysis of the ethidium bromide-stained gel was performed using 1 D Image Analysis Software.

3. Results and discussion

MICs for various β -lactams were determined for strain 5031 and compared with strain PA01, showing an increased MIC for aztreonam and ticarcillin, not corrected by clavulanate, compatible with MexAB OprM overexpression (Table 1). Furthermore, no other β -lactamase than the chromosomal cephalosporinase ($pI > 8$) could be detected in this isolate by analytical isoelectric focusing.

PCR amplification of the 5031 strain *mexR* gene generated a fragment of more than 2000 bp, instead of the expected one of 344 bp (Fig. 1). Sequencing revealed an insertion of more than 2000 bp at base 414, with characteristic direct repeats in the target of 4 bp, and inverted repeats of 11 bp.

Table 1
MICs of various β -lactams for *P. aeruginosa* strains 5031 and PA01

Antibiotic	MIC (μ g ml ⁻¹)	
	5031 strain	PA01 strain
Ticarcillin	64	8
Ticarcillin-clavulanate	64	8
Piperacillin	4	2
Piperacillin-tazobactam	4	2
Aztreonam	8	2
Cefepime	4	1
Ceftazidime	2	1
Imipenem	1	1

Comparison of the sequence with database revealed an IS21 insertion sequence. Disruption of promoters or regulatory genes by insertion sequences enhancing expression has already been described [11–13]. Insertion sequences are small mobile elements containing one or two open reading frames encoding transposase activity, and carrying at their extremity inverted repeats of different lengths responsible for cleavage of target DNA and transposition [14]. IS21 was first described in 1989 in *P. aeruginosa* [15]. Among the IS family currently known, IS21 is one of the largest, at 2131 bp. This sequence carries two adjacent overlapping genes, *istA* and *istB*. It was recently demonstrated that the IS21 transposition machinery appears to prefer targets displaying an 11-bp periodicity of the dinucleotide AA flanking the insertion sites [16]: this is the case in the *mexR* insertion described here. IS21 is often present as a tandem (IS21)₂ [17], conferring increased transposase activity but, in our case, only one copy was present in the *mexR* gene.

The *mexR* gene is located immediately upstream of the efflux genes and encodes a repressor of the *mexAB-oprM* operon [4]. It has recently been shown, by footprinting experiments, that the MexR protein binds to the *mexA-mexR* intergenic region at two different sites. Two different promoters have been detected upstream of *mexA*, a proximal promoter responsible for low-level expression of *mexAB-OprM* and a distal one responsible for the overexpression in *nalB* strains [9]. However, recent studies suggested that only the more distal region, overlapping with *mexR*, had real promoter activity [18]. In our case, quantifying the mRNA-specific transcripts obtained from the distal promoter, a three-fold increase in mRNA was detected in isolate 5031 compared with the PA01 strain (Fig. 2). This result is in perfect correlation with the two- to three-fold increase of the OprM protein, detected by Western blot in such isolates [19]. Moreover, Hocquet et al. [20], working on an epidemic clone overproducing MexAB OprM, found a 1.6- to 3-fold increase in *mexA* transcripts, compared with a PA01 strain, by real-time RT-PCR. An-

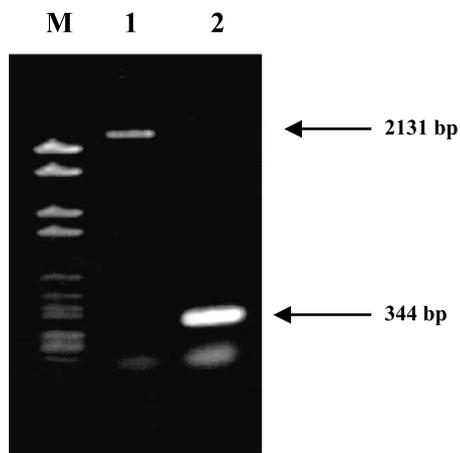


Fig. 1. PCR amplification of a fragment of the *mexR* gene from strains 5031 (lane 1) and PA01 (lane 2). Lane M, molecular mass marker VI (Boehringer).

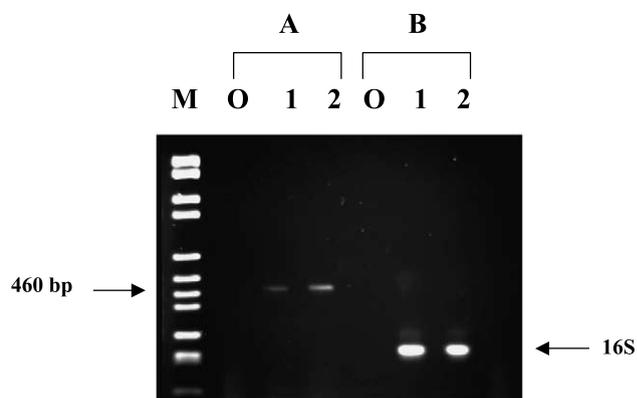


Fig. 2. RT-PCR of total RNA from strains PA01 (1) and 5031 (2) (A) with *mexA*-specific primers⁹, (B) with 16S universal primers¹⁰. Lane O: blank without RNA. Lane M: molecular mass marker IV (Boehringer).

other recent study showed that the amount of the protein MexA was increased approximately eight-fold in a *nalB* strain compared with a wild-type one [21].

Different mutations, insertions or deletions inactivating *mexR* have been described in strains exhibiting an efflux phenotype but, as far as we know, this is the first description of a possible inactivation by an insertion sequence. *nalB* strains can either present decreased amounts or absence of MexR, or normal amounts with loss of ability to dimerize [22].

In order to study the frequency of inactivation of *mexR* by IS21, it would be interesting to screen for the presence of this insertion sequence in a population of *P. aeruginosa* presenting an efflux phenotype.

References

- [1] Nikaido, H. (1998) Antibiotic resistance caused by Gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin. Infect. Dis.* 27 (Suppl. 1), S32–S41.
- [2] Nikaido, H. (1996) Multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 178, 5853–5859.
- [3] Poole, K., Krebes, K., McNally, C. and Neshat, S. (1993) Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.* 175, 7363–7372.
- [4] Poole, K., Tetro, K., Zhao, Q., Neshat, S., Heinrichs, D. and Bianco, N. (1996) Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2021–2028.
- [5] Srikumar, R., Paul, C.J. and Poole, K. (2000) Influence of mutations in the *mexR* repressor gene on expression of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182, 1410–1414.
- [6] Hirakata, Y., Srikumar, R., Poole, K., Gotoh, N., Suematsu, T., Kohno, S., Kamihira, S., Hancock, R.E.W. and Speert, D.P. (2002) Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Exp. Med.* 196, 109–118.
- [7] Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J. and Poole, K. (1998) Influence of the *mexAB-OprM* multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 180, 5443–5447.
- [8] Matthew, M., Harris, A.M., Marshall, M.J. and Ross, G.W. (1975) The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. *J. Gen. Microbiol.* 88, 169–175.

- [9] Evans, K., Adewoye, L. and Poole, K. (2001) MexR repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of MexR binding sites in the *mexA-mexR* intergenic region. *J. Bacteriol.* 183, 807–812.
- [10] Martineau, F., Picard, F.J., Roy, P.H., Ouelette, M., and Bergeron, M.G. (1996) Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2888–2893.
- [11] Jaurin, B. and Normark, S. (1983) Insertion of IS2 creates a novel *ampC* promoter in *Escherichia coli*. *Cell* 32, 809–816.
- [12] Jellen-Ritter, A.S. and Kern, W.V. (2001) Enhanced expression of the multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in *Escherichia coli* mutants selected with a fluoroquinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1467–1472.
- [13] Kato, N., Yamazoe, K., Han, C.-G. and Ohtsubo, E. (2003) New insertion sequence elements in the upstream region of *cfiA* in imipenem-resistant *Bacteroides fragilis* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 979–985.
- [14] Mahillon, J. and Chandler, M. (1998) Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 725–774.
- [15] Reimman, C., Moore, R., Little, S., Savioz, A., Willetts, N.S. and Haas, D. (1989) Genetic structure, function and regulation of the transposable element IS21. *Mol. Gen. Genet.* 215, 416–424.
- [16] Berger, B. and Haas, D. (2001) Transposase and cointegrase: specialized transposition proteins of the bacterial insertion sequence IS21 and related elements. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 403–419.
- [17] Szeverényi, I., Nagy, Z., Farkas, T., Olasz, F. and Kiss, J. (2003) Detection and analysis of transpositionally active head-to-tail dimers in three additional *Escherichia coli* IS elements. *Microbiology* 149, 1297–1310.
- [18] Sanchez, P., Rojo, F. and Martinez, J.L. (2002) Transcriptional regulation of *mexR*, the repressor of *Pseudomonas aeruginosa mexAB-oprM* multidrug efflux pump. *FEMS Microbiol. Lett.* 207, 63–68.
- [19] Cavallo, J.D., Plésiat, P., Couetdic, G., Leblanc, F., Fabre, R. and GERPB (2002) Mechanisms of β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence of OprM-overproducing strains in a French multicentre study. *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 1039–1043.
- [20] Hocquet, D., Bertrand, X., Köhler, T., Talon, D. and Plésiat, P. (2003) Genetic and phenotypic variations of a resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemic clone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 67, 1887–1894.
- [21] Narita, S., Eda, S., Yoshihara, E. and Nakae, T. (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.
- [22] Adewoye, L., Sutherland, A., Srikumar, R. and Poole, K. (2002) The *mexR* repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity. *J. Bacteriol.* 184, 4308–4312.

V.3- Commentaires :

L'impact spécifique de la résistance par efflux actif sur l'efficacité de l'antibiothérapie n'est pas toujours facile à évaluer. En effet, chez les souches cliniques, la présence concomitante fréquente de plusieurs mécanismes de résistance ne facilite pas l'investigation de ce phénomène. Ainsi, sa responsabilité dans les mauvaises réponses ou les échecs aux traitements antibiotiques mis en œuvre est apparue difficile à évaluer (Plésiat *et al.*, 1998).

La sélection de mutants résistants *in vitro* suggère que de tels systèmes de pompes pourraient notamment constituer une première ligne de défense de cette espèce bactérienne, face à la large utilisation des quinolones en thérapeutique, en diminuant l'accumulation intracellulaire de ces antibiotiques et facilitant la sélection d'un mutant dans le gène de l'ADN-gyrase (Plésiat *et al.*, 1998).

Il a été démontré que la régulation d'un tel système était de type transcriptionnel (Sanchez *et al.*, 2002, Srikumar *et al.*, 2000, Saito *et al.*, 1999), liée à la survenue de divers événements génétiques au sein du gène régulateur *mexR*, répresseur de l'opéron *mexAB-oprM* (Adewoye *et al.*, 2002). Différentes mutations, en positions 73 (C→T, la plus fréquente), 146 (A→C), 248 (G→A) ou 388 (A→C), ont été rapportées dans la littérature, à l'origine de la surexpression de MexAB-OprM (Saito *et al.*, 1999). Certaines se traduisent par des substitutions d'acides aminés (Poole *et al.*, 1996), d'autres par des modifications et altérations de structure de la protéine, lorsque le cadre de lecture du gène *mexR* se trouve décalé (Plésiat *et al.*, 1998).

La régulation de cet opéron s'avère cependant plus complexe. Récemment, il a été démontré que le produit du gène *mexR* se liait à la région intergénique *mexR-mexA* (Saito *et al.*, 2001), au niveau de deux sites qui contiennent chacun une séquence inversée répétée d'un pentamère : GTTGA. Ces séquences sont localisées dans une région supposée contenir les promoteurs de *mexR* et *mexA* (Evans *et al.*, 2001). D'autres études, sur la structure génétique complexe de cet opéron, ont suggéré que les promoteurs de *mexR* et *mexA* se chevauchent et chevauchent eux-mêmes la région où s'effectue la liaison du produit du gène *mexR* (Sanchez *et al.*, 2002).

Ainsi, il apparaît que la transcription de *mexR* et de *mexA* pourrait être régulée à plusieurs niveaux (Sanchez *et al.*, 2002) :

- 1- l'ARN-polymérase pourrait être en compétition avec MexR, puisqu'il existe un chevauchement des deux régions promotrices de *mexR* et de *mexA*, ainsi qu'avec le site de fixation de *mexR* ;

- 2- les promoteurs respectifs de *mexR* et de *mexA* pourraient être en compétition pour se lier avec l'ARN-polymérase, les mutations décrites entraînant une augmentation d'activité de l'un par rapport à l'autre ;
- 3- l'expression de ces deux gènes pourrait être liée à la phase de croissance bactérienne, la synthèse de *mexR* étant plus importante en phase exponentielle de croissance.

Par ailleurs, on a démontré récemment la relation quantitative entre les trois protéines du complexe et la capacité d'extrusion (Narita *et al.*, 2003). C'est donc un facteur additionnel qui pourrait intervenir dans l'expression de ce système d'efflux. Néanmoins, l'influence majeure des mutations dans le gène répresseur *mexR* reste l'hypothèse prépondérante (Srikumar *et al.*, 2000).

L'éventail des événements génétiques responsables de ce phénotype de résistance par hyperexpression d'un mécanisme d'efflux ne cesse de s'élargir. Ainsi, Hocquet *et al.* ont récemment rapporté la présence d'une nouvelle mutation en position 107 du gène *mexR*, entraînant le remplacement d'une histidine par une proline (Hocquet *et al.*, 2003). Cependant, ces mêmes auteurs ont aussi observé que l'expression de MexAB-OprM pourrait évoluer vers le niveau de souches sauvages, chez d'autres mutants avec un gène *mexR* altéré, par suite de mutations dans les séquences promotrices de *mexA* et *mexR*, ou bien dans le site de liaison au ribosome, de l'opéron lui-même : une des souches concernées présentait une délétion de 3 paires de bases dans la région intergénique *mexA-mexR*, site de liaison du répresseur *mexR* ; l'autre souche présentait une substitution (A→C) dans la séquence putative de Shine-Dalgarno, localisée huit nucléotides en amont du codon "start" de *mexA*.

D'autre part, il a été montré, chez des souches de phénotype *nalB* (hyperexprimant l'opéron *mexAB-oprM*), que des modifications moléculaires au sein du même gène *mexR*, compromettaient sa stabilité et sa capacité à former des dimères (Adewoye *et al.*, 2002).

Nos travaux ont révélé que la présence d'une séquence d'insertion IS21 dans le gène *mexR* entraînait également une dérégulation de l'opéron *mexAB-oprM*. L'augmentation, d'un facteur 3, du niveau d'expression des transcrits spécifiques, retrouvée par RT-PCR, a confirmé les résultats obtenus par Saito *et al.* lors d'une étude par gène reporter (Saito *et al.*, 1999).

La technique de RT-PCR s'est avérée reproductible, même pour détecter cette augmentation très modérée de la quantité de transcrits. Elle est aussi aisée à mettre en œuvre que la quantification des protéines spécifiques par des techniques de Western Blot. L'exploration des phénomènes de régulation moléculaire de l'expression du système d'efflux MexAB-OprM est encore relativement récente et limitée. En raison de son caractère

physiologique, de nombreuses voies de recherche s'attachent à en découvrir les implications dans le fonctionnement de la cellule bactérienne (Poole *et al.*, 1994) ou dans le domaine physiopathologique, puisqu'on a évoqué sa participation à des phénomènes de virulence associés au quorum-sensing (Hirakata *et al.*, 2002). Disposer d'outils permettant d'en préciser le fonctionnement au niveau moléculaire, ainsi que la régulation, s'avère donc potentiellement d'un réel intérêt, pour envisager l'utilisation de molécules régulatrices de telles pompes d'efflux (Lomovskaya *et al.*, 2001).

DISCUSSION GENERALE

Les problèmes liés à l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques, ainsi qu'à leur dissémination, constituent des préoccupations apparues peu après la première utilisation thérapeutique des antibiotiques. Du fait de l'évolution des systèmes de soins et de certaines dérives thérapeutiques, entre autres, on a progressivement assisté à l'apparition de bactéries multi-résistantes (BMR). Depuis maintenant plusieurs années, elles représentent un problème de santé majeur, tant en termes de mortalité ou de morbidité induites qu'en termes de coûts financiers, particulièrement dans le secteur hospitalier (Quale *et al.*, 2002).

Du fait de leur caractère nouvellement émergent, les infections par bactéries à Gram positif multi-résistantes, telles que *S. aureus* résistants à la méticilline ou *Enterococcus sp.* résistants aux glycopeptides (Patel, 2003), ont fait l'objet d'une attention particulière, au cours des dernières années. Cependant, des bactéries à Gram négatif d'isolement fréquent, telles que les entérobactéries, au premier rang desquelles *E. coli*, ont également évolué vers la multirésistance, par exemple par hyperproduction de leur céphalosporinase naturelle AmpC. D'autres bacilles à Gram négatif couramment agents d'infections nosocomiales, tels que *P. aeruginosa* et *A. baumannii*, ont aussi vu leur implication renforcée par l'apparition de nouveaux mécanismes de résistance aux antibiotiques, comme les métallo-enzymes inactivant des β -lactamines introduites relativement récemment en thérapeutique : les carbapénèmes (Nordmann et Poirel, 2002).

En dehors des mécanismes directement impliqués dans la résistance bactérienne aux antibiotiques, des facteurs indirects ont aussi contribué à l'émergence et à la dissémination de résistances : (i) l'accroissement de l'espérance moyenne de vie, à laquelle s'associe une prise en charge de pathologies plus sévères, engendrant des risques infectieux accrus ; (ii) la fréquence plus importante des séjours en structures hospitalières et les risques qui s'y rapportent, du fait d'un certain déficit dans le domaine de l'hygiène des soins et de l'environnement des patients, qu'il s'avère difficile de gérer avec une totale efficacité, dans un contexte socio-économique contraignant ; (iii) l'utilisation parfois mal contrôlée des antibiotiques.

Le développement des techniques moléculaires contribue à une analyse étendue et approfondie de ces problèmes. Il a apporté ainsi un premier progrès dans la maîtrise des infections nosocomiales, en permettant une comparaison des souches isolées dans différents contextes, grâce aux techniques d'épidémiologie moléculaire et, notamment, la technique d'électrophorèse en champ pulsé ; des hypothèses ont alors pu être formulées sur les sources et voies de dissémination des BMR, aboutissant à des mesures concrètes, pour tenter d'endiguer le phénomène. Un second apport lié au développement des techniques moléculaires résulte de la possibilité d'analyser plus précisément les mécanismes impliqués dans la résistance aux antibiotiques, en particulier chez les bactéries les plus couramment isolées en pathologie humaine, ainsi que la régulation génétique de ces phénomènes. Ceci doit notamment permettre d'évaluer les risques potentiels qui y sont liés : possibilités d'émergence des diverses résistances ; impact exact en termes de phénotypes et conséquences pratiques sur les choix thérapeutiques quotidiens.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes intéressés à la résistance aux β -lactamines, chez des bacilles à Gram négatif d'isolement courant dans le cadre de nos activités hospitalières, compte tenu aussi du fait que ces antibiotiques sont très fréquemment prescrits pour le traitement des infections dues à ces bactéries.

Nous avons cependant souhaité centrer nos travaux sur la résistance par production d'enzymes inactivatrices naturelles, exprimées sur un mode constitutif. En effet, beaucoup d'études ont déjà été rapportées, dans la littérature, sur les résistances acquises par production de nouvelles β -lactamases. Par ailleurs, l'investigation du niveau de production d'une β -lactamase naturelle nous est apparue comme une perspective intéressante en vue d'étudier, ultérieurement, la régulation d'autres gènes impliqués soit dans la résistance aux antibiotiques, soit dans certains phénomènes de virulence bactérienne.

Chez *E. coli*, l'hyperproduction de la céphalosporinase AmpC ne concerne qu'un faible pourcentage de souches (environ 1 % des souches dans le contexte que nous avons étudié), mais un nombre important d'isollements, étant donné le degré d'implication de cette bactérie en Bactériologie médicale. En effet, *E. coli* représente plus de 85 % des bactéries isolées lors d'infections urinaires, particulièrement dans le cas des infections acquises à l'hôpital, dont cette espèce bactérienne reste l'agent le plus fréquent (Gordon *et al.*, 2003).

Parmi les entérobactéries, nous nous sommes également intéressés à *K. pneumoniae*, souvent responsable aussi d'infections urinaires, mais également d'infections pulmonaires, notamment en milieu hospitalier, où l'on isole, avec une fréquence non négligeable (environ 15 %, dans notre étude), des souches présentant des résistances différentes de celles du phénotype sauvage. Ainsi, pendant l'année sur laquelle a porté notre analyse, nous avons identifié des souches caractérisées par l'hyperproduction de la β -lactamase naturelle SHV-1. Certes, l'hyperexpression du gène *bla*_{SHV-1} s'avère rare (5 souches sur 215, dans notre échantillonnage), mais elle a déjà été rapportée dans la littérature (Petit *et al.*, 1992, Rice *et al.*, 2000). Compte tenu des possibilités d'association de mécanismes de résistance et des confusions possibles entre différents mécanismes, sur le plan phénotypique, il nous est apparu intéressant d'étudier spécifiquement les facteurs responsables de l'hyperproduction de cette β -lactamase chromosomique chez *K. pneumoniae* (Hernandez-Alles *et al.*, 2000, Sabate *et al.*, 2002).

Notre intérêt pour l'étude de l'hyperproduction de céphalosporinase AmpC chez *A. baumannii* résulte, tout d'abord, de la fréquence du phénotype correspondant chez cette espèce bactérienne (2/3 des souches isolées au cours d'une année, dans notre hôpital). Le traitement des infections par ces bactéries s'avère souvent délicat, en raison de la fréquente multi-résistance aux antibiotiques, notamment aux β -lactamines, par des mécanismes enzymatiques ou non enzymatiques (Clark, 1996, Fernandez-Cuenca *et al.*, 2003, Limansky *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'importance de *A. baumannii* dans les infections nosocomiales, chez les patients fragilisés, immunodéprimés ou atteints de pathologies chroniques graves, ainsi que son fort pouvoir de

dissémination et sa capacité de persistance dans l'environnement, ont été soulignés (Bergogne-Bérézin et Towner, 1996, Corbella *et al.*, 2000, Poirel *et al.*, 2003).

*

L'antibiogramme représente encore, au quotidien, le principal moyen d'étude de la résistance bactérienne aux antibiotiques. Cependant, c'est essentiellement un outil à visée thérapeutique, pour optimiser le choix des antibiotiques destinés à obtenir une issue clinique rapidement favorable, dans des conditions de maîtrise des coûts aussi pertinentes que possible. Dans ce but, il consiste essentiellement à déterminer un phénotype de résistance ; il fournit éventuellement des données chiffrées sur les niveaux de résistance, sous forme de CMI plus ou moins précises. L'apparition de techniques automatisées a permis d'en simplifier la réalisation ; elle a surtout grandement favorisé l'analyse et l'interprétation des résultats, grâce aux systèmes experts et d'épidémiologie qui y sont associés. En effet, ils intègrent des critères d'analyse des mécanismes de résistance impliqués, des programmes d'alertes vis-à-vis de l'émergence de phénotypes potentiellement préoccupants, soit pour le choix du traitement du patient immédiatement concerné, soit par leur rareté et le risque de leur extension (Sanders *et al.*, 2001).

Grâce aux méthodes moléculaires, on peut désormais étudier directement les gènes impliqués dans un phénomène de résistance. Toutefois, la présence de ce gène n'implique pas obligatoirement qu'il s'exprime de façon phénotypiquement détectable. Le modèle de la céphalosporinase AmpC de *E. coli* en est d'ailleurs un bon exemple : sa régulation transcriptionnelle, et notamment l'existence d'un atténuateur transcriptionnel, sont responsables d'une très faible expression du gène. Cela conduit à la production d'une quantité très limitée d'enzyme, qui se traduit habituellement par un niveau de résistance non détectable *in vitro* et sans implication thérapeutique.

Pendant longtemps, les études moléculaires sur les β -lactamases sont restées essentiellement axées sur la détection de mutations ponctuelles dans les gènes de structure codant pour ces enzymes, en recherchant celles qui s'avéraient capables de provoquer une modification du spectre d'activité de l'enzyme (Stürenburg et Mack, 2003). De plus en plus, on constate cependant que des mécanismes qui régulent l'expression des gènes correspondants jouent également un rôle majeur dans la résistance.

*

Dès le début de ce travail, nous avons donc perçu la nécessité d'un outil permettant d'évaluer le niveau de production des β -lactamases étudiées, afin d'analyser précisément les mécanismes de régulation de l'expression des gènes impliqués et le niveau de production d'enzymes inactivatrices qui en résulte.

Les méthodes spectrophotométriques de mesure d'activité enzymatique s'avéraient à la fois trop peu sensibles et inadaptées à des souches produisant différents types d'enzymes, comme c'est assez souvent le cas des BMR. La technique de Northern blot a été exclue, en raison de sa relative complexité et, surtout, du fait qu'elle impose l'utilisation délicate de radio-éléments. Des techniques de gènes reporter avaient été antérieurement mises au point au sein du laboratoire, fournissant des résultats satisfaisants ; cependant elles nécessitent plusieurs étapes de clonage et représentent un système relativement artificiel, en termes d' "environnement" pour l'expression des gènes étudiés (Bullifent *et al.*, 1995).

Nous avons donc entrepris la mise au point d'une technique de détection et d'évaluation semi-quantitative des ARNm bactériens spécifiques, par RT-PCR. Lorsque nous avons initié ce travail, cette technique était déjà utilisée, depuis plusieurs années, dans le domaine de la Virologie, alors que ses applications en Bactériologie s'avéraient limitées. Cela résultait notamment de la grande instabilité des ARNm bactériens et des difficultés techniques qui en découlent, rapportées dans la littérature (Carpoussis *et al.*, 2002, Hellyer *et al.*, 1999, Sails *et al.*, 1998). Par contre, la RT-PCR présente l'intérêt majeur de permettre l'étude de la viabilité bactérienne et, notamment, la détection des bactéries non cultivables, seules les bactéries vivantes synthétisant de l'ARN (Sheridan *et al.*, 1998) ; aussi a-t-elle été initialement développée en Microbiologie alimentaire (Hein *et al.*, 2001). En Bactériologie médicale, un second intérêt s'est imposé, lié aux possibilités d'étude de la régulation de l'expression des gènes, en particulier les gènes de résistance aux antibiotiques ou bien les gènes codant pour des facteurs de virulence (Salvi *et al.*, 2003, Rokbi *et al.*, 2001). Dans le cadre de nos travaux, la mise en oeuvre d'une technique de RT-PCR a eu un double objectif : (i) évaluer la différence d'impact direct de divers événements génétiques sur le niveau de transcription d'un gène ; (ii) analyser le degré exact de corrélation entre le niveau d'expression des transcrits spécifiques et le phénotype de résistance observé.

La mise au point d'une technique adaptée à l'étude de la régulation génétique des β -lactamases a été initiée sur le modèle simple de la céphalosporinase AmpC de *E. coli*, déjà partiellement étudiée au sein du laboratoire. Ensuite, la mise au point d'une RT-PCR appliquée aux autres espèces bactériennes étudiées a nécessité, pour chacune d'entre elles, la recherche de conditions de croissance bactérienne optimales. En effet, cette phase s'est avérée essentielle pour une extraction efficace des ARN bactériens, toujours en raison de leur faible demi-vie (Selinger *et al.*, 2003). En dehors de la maîtrise des conditions d'extraction, il est également apparu très important de respecter scrupuleusement un certain nombre de conditions opératoires : (i) utiliser des inhibiteurs de RNases dans les milieux réactionnels ; (ii) pré-traiter les ARN extraits à la

DNase, pour s'assurer de l'absence d'une amplification potentielle de l'ADN contaminant co-extrait ; (iii) conserver les ARN extraits à -80°C. Ces contraintes techniques sont incontournables, pour s'affranchir des altérations du matériel cible et de réactions faussement positives liées à la présence d'ADN contaminant (Bustin, 2002). Par ailleurs, les conditions de réalisation de l'étape de RT se sont avérées cruciales, du fait des variations qu'elles peuvent introduire au niveau de la quantification. Les enzymes utilisées pour la phase de RT sont très sensibles aux sels, aux alcools ou aux phénols, le plus souvent utilisés lors de l'extraction préalable des ARN ; il a été montré que des traces de ces composants peuvent altérer et affecter l'efficacité de la RT, qui peut fluctuer de 5 à 90 % (Freeman *et al.*, 1999).

Au décours de notre étude, les applications de la technologie "temps réel" se sont développées, présentant un certain nombre d'avantages. Son intérêt majeur est l'utilisation d'un système en tube fermé et la quantification ne requiert aucune manipulation post-amplification (Houde et Poitras, 2002) : les problèmes de contamination par amplicons sont ainsi significativement réduits (Bustin, 2000). Par ailleurs, le processus complet de détection/amplification est automatisé, assurant un gain de temps et d'excellentes performances (Bustin, 2002).

Nous avons donc entrepris de confronter les performances de la technique de RT-PCR conventionnelle que nous avons initialement développée (mesure en point final), avec celles de cette nouvelle technique de suivi cinétique de la réaction d'amplification. Dans la mesure où nous souhaitons une évaluation des transcrits et non une quantification précise, une technique par sonde d'hydrolyse (technologie TaqManTM) était envisageable, mais elle nous est apparue longue et coûteuse. Notre choix de système de détection s'est alors porté sur un agent intercalant, dont la fluorescence augmente lorsqu'il se lie à l'ADN double brin. En effet, le SYBR Green I est à la fois économique et facile à utiliser et il assure une plus grande sensibilité que le BET, sans inhiber la réaction d'amplification. Par contre, la spécificité de la réaction repose exclusivement sur la spécificité des amorces (Houde et Poitras, 2002).

En pratique, cette technique nous a effectivement permis de prouver l'influence respective de différentes mutations et séquences d'insertion sur le niveau d'expression de différents gènes de résistance aux β -lactamines. Dans un contexte hospitalier où la multi-résistance des bactéries est souvent liée à l'association de différents mécanismes, cette technique constitue un outil très intéressant, pour analyser l'impact respectif des divers mécanismes impliqués. De plus, la confrontation des phénotypes avec l'analyse quantitative des ARNm spécifiques de tel ou tel mécanisme de résistance a permis d'évoquer des phénomènes phénotypiquement difficilement décelables, aussi bien chez *K. pneumoniae* (hyperproduction de SHV-1 associée ou non à une modification de porines) que chez *A. baumannii* (hyperproduction de céphalosporinase \pm production d'enzyme de type OXA ?).

Des perspectives de développement de cette technique sont désormais envisageables. L'arrivée prochaine des extracteurs d'acides nucléiques permettra une standardisation rigoureuse des protocoles et la réalisation de plus grandes séries. La technologie en temps réel est potentiellement utilisable pour la détection rapide simultanée de gènes divers, en développant des PCR multiplex. En matière d'étude de la régulation des gènes de résistance aux antibiotiques, notre expérience pourrait être appliquée à des mécanismes plus complexes, tels que la production des céphalosporinases inductibles ou bien à l'exploration de mécanismes non enzymatiques. La RT-PCR est également susceptible de permettre l'investigation couplée de mécanismes de résistance aux antibiotiques et de mécanismes et interactions cellulaires impliqués dans la physiopathologie des infections bactériennes.

*

Chez les procaryotes, la régulation génétique est essentiellement d'ordre transcriptionnel, conditionnée par la force du promoteur situé en amont du gène cible. Les études qui s'y rapportent sont toujours basées sur la notion de séquences consensus, telles qu'elles ont été initialement définies chez *E. coli*, il y a plus de vingt ans, c'est-à-dire TTGACA pour la box -35 et TATAAT pour la box -10 (Jaurin *et al.*, 1981, Hawley et McClure, 1983). L'évolution vers la résistance, par mutations ponctuelles localisées dans ces régions promotrices, est encore très régulièrement décrite. Dans la majorité des cas, les mutations observées surviennent dans des positions qui conduisent à une homologie renforcée avec les séquences consensus (Jaurin *et al.*, 1982). Du fait de caractéristiques particulières du génome bactérien, on peut émettre l'hypothèse qu'elles puissent également affecter l'expression d'autres gènes. En effet, ce génome est d'une taille relativement réduite, par rapport aux multiples structures et fonctions des bactéries. Cela se traduit par une particularité de l'organisation génétique des procaryotes : d'importantes interactions entre différents opérons ont été mises en évidence, notamment chez *E. coli*, où l'on a démontré qu'une séquence pouvait coder pour un fragment ou la totalité de deux protéines différentes (Grundström et Jaurin, 1982). Dans le cas de la céphalosporinase AmpC de *E. coli*, on a montré que le dernier gène de l'opéron fumarate-réductase (*frdD*) était chevauchant avec la région promotrice de la β -lactamase ; le rôle de terminateur de l'opéron métabolique est assuré par l'atténuateur du gène *ampC*. Cet opéron *frdD* code pour une flavo-enzyme membranaire qui représente la dernière enzyme acceptrice d'électrons, lors d'une croissance en conditions anaérobies. L'intrication de ces deux structures génétiques conduit à envisager qu'un événement mutationnel affectant la régulation de *ampC* puisse aussi affecter *frdD*, avec d'éventuelles conséquences métaboliques délétères dans certaines conditions de croissance. Cela pourrait expliquer, d'une part, la moindre fréquence de certaines mutations plus impliquées dans de telles conséquences et, d'autre part, l'absence d'association de certaines d'entre-elles. Ainsi, la

mutation -42, apparemment la plus fréquemment retrouvée chez les souches de *E.coli* résistantes aux céphalosporines de troisième génération, entraîne un décalage du site d'initiation de la transcription (avec création d'une box -35 identique à la séquence consensus), mais elle n'induit pas de substitution d'acide aminé dans le gène *frdD* ; par contre, toutes les autres mutations (en positions -32, -18 et -11) entraînent une modification d'acide aminé de la protéine.

La détermination précise des boxes -10 et -35 pose parfois des problèmes. Lorsque nous nous sommes intéressés à la régulation de la β -lactamase naturelle de *K. pneumoniae*, nous avons pu remarquer que les boxes envisagées par Mercier et Lévesque comme étant impliquées dans la régulation du gène *bla_{SHV-1}* (Mercier et Lévesque, 1990) étaient différentes de celles évoquées plus récemment par Rice *et al.* (Rice *et al.*, 2000). Grâce à des techniques d'extension d'amorce et de mutagenèse dirigée, ces auteurs ont confirmé le positionnement génétique du site d'initiation de la transcription, mais aussi rapporté des boxes décalées vers l'amont, par rapport aux séquences précédemment décrites ; ils en ont montré l'implication, en rapportant l'influence d'une substitution de la deuxième base de la box dénommée -10, sur l'hyperexpression du gène de la β -lactamase. Dans notre échantillonnage de souches de *K. pneumoniae*, nous avons effectivement constaté qu'aucune d'entre elles ne présentait de mutation dans les boxes définies par Mercier et Lévesque, alors que deux souches hyperproductrices de SHV-1 présentaient la même mutation que celle décrite par Rice *et al.*

*

En dehors des mutations qui peuvent interférer avec la régulation génétique de la production de β -lactamases constitutives, nous avons aussi observé l'impact de l'intégration de séquences d'insertion.

La fréquence de description de ces éléments génétiques s'avère importante et révèle leur caractère ubiquitaire (Mahillon et Chandler, 1998). Ces éléments mobiles peuvent être retrouvés en plusieurs copies dans le patrimoine génétique d'une bactérie. Il a été montré, chez *E. coli* K12, que leur distribution dans le chromosome bactérien pouvait également varier en fonction des souches analysées (Hu et Deonier, 1981). Les différentes IS retrouvées chez une même bactérie ne sont pas toutes impliquées dans des mécanismes de résistance ; elles peuvent également interférer avec d'autres phénomènes de régulation affectant, par exemple, des phénomènes de virulence. L'évolution des connaissances a permis de montrer qu'elles sont susceptibles d'intervenir à différents niveaux :

- (i) **elles peuvent être impliquées dans des modifications de la région 5' non codante et interférer ainsi dans sa régulation : en effet, ces IS possèdent des hexamères dans les régions terminales des IR ; lors de la transposition, si ces séquences -35 sont**

positionnées à une distance correcte de la Pribnow box en position -10, elles peuvent créer un promoteur hybride avec, pour conséquence, une augmentation de l'expression du gène adjacent (Mahillon et Chandler, 1998).

- (ii) elles peuvent s'intégrer dans des gènes de régulation identifiés comme tels (cas de la séquence IS21 insérée dans le gène *mexR* répresseur de l'opéron *mexAB-oprM* chez *P. aeruginosa*).**
- (iii) leur intégration peut provoquer l'interruption d'un gène codant pour une protéine fonctionnelle ou de structure impliquée dans la résistance : ainsi, l'insertion de différents types d'IS a été rapportée comme étant responsable de la résistance aux antibiotiques chez *K. pneumoniae*, par inactivation des gènes codant pour les porines (Hernandez-Allès *et al.*, 1999).

Ces éléments plus ou moins instables vont pouvoir être transférés à d'autres micro-organismes, dans le génome desquels ils pourront facilement s'intégrer, grâce à leur structure génétique particulière, caractérisée par la présence de séquences inversées répétées à leurs extrémités.

Bien que l'acquisition de ces IS puisse avoir un effet négatif sur certaines propriétés physiologiques des bactéries, il semble bien que, pour certaines espèces, elle constitue un des moyens les plus adaptés pour évoluer vers la résistance aux antibiotiques. Dès 1987, l'identification de différents éléments transposables chez *Burkholderia cepacia* était liée à une activation de l'expression de gènes de résistance aux β -lactamines (Scordilis *et al.*, 1987). Par ailleurs, dans le cadre de la résistance aux carbapénèmes par production d'enzyme inactivatrice chez *Bacteroides fragilis*, on a montré que le gène chromosomique *cfiA*, qui code pour une carbapénémase, était habituellement "silencieux" chez la plupart des souches, naturellement sensibles. L'obtention de bactéries résistantes à l'imipénème par mutation *in vitro*, démontrée dès 1992, est cependant un événement rare (Podglajen *et al.*, 1992). Par contre, chez des souches cliniques comme *in vitro*, l'expression phénotypiquement décelable du gène *cfiA* peut résulter de l'intégration de diverses IS (Kato *et al.*, 2003, Podglajen *et al.*, 1994) ; on a montré que 3 à 14 copies de la séquence IS1186, notamment, étaient retrouvées dans le génome des bactéries ainsi devenues résistantes aux carbapénèmes. Ce type de mécanisme pourrait également être à l'origine de résistances chez *A. baumannii* : la séquence que nous avons retrouvée en amont du gène *ampC*, déjà décrite en amont du gène métabolique *phaB_{AC}* (Schembri *et al.*, 1995), a été retrouvée en amont d'autres gènes de résistance aux β -lactamines par inactivation enzymatique (*bla_{OXA-23}* - Donald *et al.*, 2000), mais aussi dans des cas de résistance aux aminosides (*aac(3)-II_a* - Segal *et al.*, 2003).

*

Les outils d'analyse *in vitro* aujourd'hui disponibles contribuent à une connaissance relativement précise des phénomènes de résistance bactérienne aux antibiotiques. Au-delà de l'antibiogramme au quotidien, qui assure le dépistage des résistances et l'évocation des mécanismes potentiellement impliqués, les techniques moléculaires permettent l'investigation plus ou moins approfondie de ces mécanismes et, notamment, de leur régulation génétique ; elles permettent aussi d'étudier les voies de dissémination des bactéries résistantes. On parvient ainsi à une approche globale de ces problèmes.

Les résultats des études *in vitro* et les différences qu'ils révèlent, en termes d'impact des divers mécanismes de résistance, doivent cependant impérativement être confrontés avec le contexte d'isolement des bactéries concernées.

L'émergence de bactéries résistantes par mutation, par exemple, est notamment liée à deux catégories de paramètres : (i) les conditions d'utilisation des antibiotiques, en particulier les posologies et modalités d'administration (durée de traitement, monothérapies ou associations), qui conditionnent les concentrations obtenues *in vivo* ; (ii) les caractéristiques du patient et de son infection, en particulier l'inoculum bactérien au site de l'infection et le degré d'accessibilité pour les antibiotiques. Le niveau de résistance respectivement induit par différentes mutations, comme l'interférence éventuelle avec l'expression d'autres gènes, du métabolisme bactérien par exemple, pourront engendrer des conséquences d'importance variable, en fonction de l'environnement de la bactérie *in vivo*.

L'émergence de souches résistantes par mutation peut ainsi survenir, soit en cours de traitement, au sein de la population bactérienne ciblée, en particulier par exposition à des concentrations subinhibitrices d'antibiotique lors d'une monothérapie, soit par sélection au sein des flores commensales. En 2001, Low *et al.* ont d'ailleurs rapporté le cas d'un patient présentant des abcès hépatiques, chez lequel on a isolé une souche de *E. coli* hyperproduisant sa céphalosporinase AmpC. Par ailleurs, il a été rapporté que le céfépime, souvent prescrit pour le traitement d'infections à entérobactéries hyperproductrices de céphalosporinase AmpC, à l'égard desquelles il reste actif *in vitro*, pourrait être un facteur favorisant l'émergence de souches résistantes, par mutations affectant le gène de la β -lactamase AmpC (Barnaud *et al.*, 2004, Barnaud *et al.*, 2001).

Les préoccupations qui découlent de ces observations incitent à combiner l'investigation étendue et approfondie de tels mécanismes de résistance aux antibiotiques, dans le cadre d'activités de recherche régulières, ainsi que la mise en place de systèmes d'alerte basés sur les connaissances acquises et les risques potentiels que l'on peut en déduire, en vue d'une gestion quotidienne de ce type de problèmes.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les développements technologiques que nous avons réalisés nous ont permis d'atteindre l'essentiel de nos objectifs initiaux. En effet, ils nous ont donné la possibilité d'analyser précisément la résistance aux β -lactamines de bacilles à Gram négatif hyperproduisant leur β -lactamase chromosomique naturelle. La technique de RT-PCR a permis, d'une part, une évaluation des niveaux d'expression des gènes codant pour ces enzymes inactivatrices, mais aussi de déceler d'autres mécanismes de résistance associés et leurs implications respectives chez une même souche bactérienne. L'étude de la régulation transcriptionnelle des gènes concernés, par quantification des transcrits spécifiques, a abouti à l'évaluation de l'impact de deux types d'événements génétiques : des mutations ponctuelles et l'insertion de séquences interférant avec l'expression des gènes impliqués.

Les connaissances ainsi acquises et la maîtrise de nouveaux moyens d'investigation méthodologique nous conduisent à envisager d'approfondir et d'élargir nos recherches selon les orientations suivantes :

- compléter l'exploration du ou des mécanisme(s) en cause dans l'évolution vers la résistance par hyperproduction de céphalosporinase AmpC, chez des souches de *A. baumannii* présentant initialement un phénotype sauvage ;
- élucider le ou les mécanisme(s) responsable(s) de la résistance aux carbapénèmes, chez les souches de *A. baumannii* de notre série, qui produisent une β -lactamase additionnelle ;
- étudier des systèmes de régulation plus complexes, tels que celui des céphalosporinases inductibles, notamment chez *E. cloacae*, dont nous isolons deux types de souches hyperproductrices de céphalosporinase, au laboratoire : les unes s'avèrent parfaitement sensibles *in vitro* aux céphalosporines de 4^{ème} génération, d'autres semblent partiellement résistantes, comme en témoigne la présence de "squatters colonies" dans la zone d'inhibition observée autour d'un disque de céfépime ou de cefpirome ;
- progresser dans la compréhension de la diffusion, chez des isolats communautaires, d'intégrons susceptibles d'acquérir de nouvelles cassettes de résistance au sein de l'environnement hospitalier, chez des patients à risque.

Nous souhaitons donc avoir la possibilité de poursuivre nos travaux fondamentaux, dans le cadre de l'équipe de Recherche qui nous a accueilli, afin de contribuer à une meilleure compréhension des phénomènes de résistance bactérienne aux antibiotiques, observés quotidiennement lors de nos activités hospitalières de diagnostic, et de parvenir à en maîtriser plus efficacement les conséquences.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Adewoye, L., A. Sutherland, R. Srikumar, and K. Poole.** 2002. The *mexR* repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa* : characterization of mutations compromising activity. *J. Bacteriol.* **184**:4308-12.
2. **Afzal-Shah, M., N. Woodford, and D. M. Livermore.** 2001. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:583-8.
3. **Aguena, M., and B. Spira.** 2003. RT-PCR of long prokaryotic operon transcripts without DNase treatment. *J. Microbiol. Methods* **55**:419-23.
4. **Alekshun, M. N., and S. B. Levy.** 1997. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance : the *mar* regulon. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2067-75.
5. **Alifano, P., C. B. Bruni, and M. S. Carlomagno.** 1994. Control of mRNA processing and decay in prokaryotes. *Genetica* **94**:157-72.
6. **Alvarez, M., J. H. Tran, N. Chow, and G. A. Jacoby.** 2004. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC β -lactamases in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:533-7.
7. **Ambler, R. P.** 1980. The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **289**:321-31.
8. **Arlet, G., and A. Philippon.** 1997. Les β -lactamases : une évolution sous la contrainte. *Méd. théor.* **3**:66-75.
9. **Arlet, G., and A. Philippon.** 2003. Les nouvelles β -lactamases à l'aube du troisième millénaire. *Revue Française des Laboratoires* **352**:41-55.
10. **Arpin, C., V. Dubois, L. Coulange, C. Andre, I. Fischer, P. Noury, F. Grobost, J. P. Brochet, J. Jullin, B. Dutilh, G. Larribet, I. Lagrange, and C. Quentin.** 2003. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in community and private health care centers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3506-14.
11. **Aubert, D., T. Naas, and P. Nordmann.** 2003. IS1999 increases expression of the extended-spectrum β -lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **185**:5314-9.
12. **Avison, M. B., C. J. von Heldreich, C. S. Higgins, P. M. Bennett, and T. R. Walsh.** 2000. A TEM-2 β -lactamase encoded on an active Tn1-like transposon in the genome of a clinical isolate of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:879-84.
13. **Bagge, N., O. Ciofu, M. Hentzer, J. I. Campbell, M. Givskov, and N. Hoiby.** 2002. Constitutive high expression of chromosomal β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* caused by a new insertion sequence (IS1669) located in *ampD*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3406-11.

14. **Barlow, M., and B. G. Hall.** 2002. Origin and evolution of the AmpC β -lactamases of *Citrobacter freundii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1190-8.
15. **Barlow, R. S., J. M. Pemberton, P. M. Desmarchelier, and K. S. Gobius.** 2004. Isolation and characterization of integron-containing bacteria without antibiotic selection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:838-42.
16. **Barnaud, G., G. Arlet, C. Danglot, and A. Philippon.** 1997. Cloning and sequencing of the gene encoding the AmpC β -lactamase of *Morganella morganii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **148**:15-20.
17. **Barnaud, G., Y. Benzerara, J. Gravisse, L. Raskine, M. J. Sanson-Le Pors, R. Labia, and G. Arlet.** 2004. Selection during cefepime treatment of a new cephalosporinase variant with extended-spectrum resistance to cefepime in an *Enterobacter aerogenes* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1040-2.
18. **Barnaud, G., R. Labia, L. Raskine, M. J. Sanson-Le Pors, A. Philippon, and G. Arlet.** 2001. Extension of resistance to cefepime and ceftazidime associated to a six amino acid deletion in the H-10 helix of the cephalosporinase of an *Enterobacter cloacae* clinical isolate. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**:185-90.
19. **Bastard, J. P., S. Chambert, F. Ceppa, M. Coude, E. Grapez, S. Loric, F. Muzeau, F. Spyrtos, K. Poirier, V. Copois, C. Tse, and T. Bienvenu.** 2002. RNA isolation and purification methods. *Ann. Biol. Clin.* **60**:513-23.
20. **Battaglia, M., P. Pedrazzoli, B. Palermo, A. Lanza, F. Bertolini, N. Gibelli, G. A. Da Prada, A. Zambelli, C. Perotti, and G. Robustelli della Cuna.** 1998. Epithelial tumour cell detection and the unsolved problems of nested RT-PCR : a new sensitive one step method without false positive results. *Bone Marrow Transplant.* **22**:693-8.
21. **Beceiro, A., L. Dominguez, A. Ribera, J. Vila, F. Molina, R. Villanueva, J. M. Eiros, and G. Bou.** 2004. Molecular characterization of the gene encoding a new AmpC β -lactamase in a clinical strain of *Acinetobacter genomic species 3*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1374-8.
22. **Bennett, P. M.** 1999. Integrons and gene cassettes : a genetic construction kit for bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:1-4.
23. **Bennett, P. M., and I. Chopra.** 1993. Molecular basis of β -lactamase induction in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:153-8.
24. **Bergogne-Berezin, E., and K. J. Towner.** 1996. *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens : microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**:148-65.
25. **Bergstrom, S., F. P. Lindberg, O. Olsson, and S. Normark.** 1983. Comparison of the overlapping *frd* and *ampC* operons of *Escherichia coli* with the corresponding DNA sequences in other gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **155**:1297-305.
26. **Bergthorsson, U., and H. Ochman.** 1998. Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* **15**:6-16.

27. **Beutel, B. A., and M. T. Record, Jr.** 1990. *E. coli* promoter spacer regions contain nonrandom sequences which correlate to spacer length. *Nucleic Acids Res.* **18**:3597-603.
28. **Bonnet, R.** 2004. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases : the CTX-M Enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1-14.
29. **Bornet, C., A. Davin-Regli, C. Bosi, J. M. Pages, and C. Bollet.** 2000. Imipenem resistance of *Enterobacter aerogenes* mediated by outer membrane permeability. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1048-52.
30. **Borukhov, S., and E. Nudler.** 2003. RNA polymerase holoenzyme : structure, function and biological implications. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:93-100.
31. **Borukhov, S., and K. Severinov.** 2002. Role of the RNA polymerase sigma subunit in transcription initiation. *Res. Microbiol.* **153**:557-62.
32. **Bou, G., G. Cervero, M. A. Dominguez, C. Quereda, and J. Martinez-Beltran.** 2000. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme : high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of β -lactamases. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3299-305.
33. **Bou, G., and J. Martinez-Beltran.** 2000. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the gene encoding an AmpC β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:428-32.
34. **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 β -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **41**:563-569.
35. **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**:394-5.
36. **Bullifent, H. L., A. Moir, and R. W. Titball.** 1995. The construction of a reporter system and use for the investigation of *Clostridium perfringens* gene expression. *FEMS Microbiol. Lett.* **131**:99-105.
37. **Busby, S., and R. H. Ebright.** 1994. Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* **79**:743-6.
38. **Busby, S., and R. H. Ebright.** 1999. Transcription activation by catabolite activator protein (CAP). *J. Mol. Biol.* **293**:199-213.
39. **Bush, K., G. A. Jacoby, and A. A. Medeiros.** 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1211-33.
40. **Bustin, S. A.** 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**:169-93.

41. **Bustin, S. A.** 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29**:23-39.
42. **Canica, M. M., C. Y. Lu, R. Krishnamoorthy, and G. C. Paul.** 1997. Molecular diversity and evolution of *bla*_{TEM} genes encoding β -lactamases resistant to clavulanic acid in clinical *E. coli*. *J. Mol. Evol.* **44**:57-65.
43. **Carlson, C. R., and A. B. Kolsto.** 1994. A small (2.4 Mb) *Bacillus cereus* chromosome corresponds to a conserved region of a larger (5.3 Mb) *Bacillus cereus* chromosome. *Mol. Microbiol.* **13**:161-9.
44. **Caroff, N., E. Espaze, I. Berard, H. Richet, and A. Reynaud.** 1999. Mutations in the *ampC* promoter of *Escherichia coli* isolates resistant to oxyiminocephalosporins without extended spectrum β -lactamase production. *FEMS Microbiol. Lett.* **173**:459-65.
45. **Caroff, N., E. Espaze, D. Gautreau, H. Richet, and A. Reynaud.** 2000. Analysis of the effects of -42 and -32 *ampC* promoter mutations in clinical isolates of *Escherichia coli* hyperproducing AmpC. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:783-8.
46. **Carpousis, A. J.** 2002. The *Escherichia coli* RNA degradosome : structure, function and relationship in other ribonucleolytic multienzyme complexes. *Biochem. Soc. Trans.* **30**:150-5.
47. **Carpousis, A. J., N. F. Vanzo, and L. C. Raynal.** 1999. mRNA degradation. A tale of poly(A) and multiprotein machines. *Trends Genet.* **15**:24-8.
48. **Chaibi, E. B., D. Sirot, G. Paul, and R. Labia.** 1999. Inhibitor-resistant TEM β -lactamases : phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:447-58.
49. **Chang, F.-Y., L. K. Siu, C.-P. Fung, M.-H. Huang, and M. Ho.** 2001. Diversity of SHV and TEM β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* : Gene evolution in northern Taiwan and two novel β -lactamases, SHV-25 and SHV-26. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2407-2413.
50. **Chaves, J., M. G. Ladona, C. Segura, A. Coira, R.Reig, and C. Ampurdanes.** 2001. SHV-1 β -lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2856-2861.
51. **Chen, H., H. Tang, and R. H. Ebright.** 2003. Functional interaction between RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain and sigma 70 in UP-element- and activator-dependent transcription. *Mol. Cell* **11**:1621-33.
52. **Chu, Y. W., M. Afzal-Shah, E. T. Houang, M. I. Palepou, D. J. Lyon, N. Woodford, and D. M. Livermore.** 2001. IMP-4, a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter spp.* collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:710-4.
53. **Clark, R. B.** 1996. Imipenem resistance among *Acinetobacter baumannii* : association with reduced expression of a 33-36 kDa outer membrane protein. *J. Antimicrob Chemother.* **38**:245-51.

54. **Cole, S. T.** 1984. Molecular and genetic aspects of the fumarate reductase of *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.* **12**:237-8.
55. **Conejo, M. C., I. Garcia, L. Martinez-Martinez, L. Picabea, and A. Pascual.** 2003. Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2313-5.
56. **Corbella, X., A. Montero, M. Pujol, M. A. Dominguez, J. Ayats, M. J. Argerich, F. Garrigosa, J. Ariza, and F. Gudiol.** 2000. Emergence and rapid spread of carbapenem resistance during a large and sustained hospital outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* **38**:4086-95.
57. **Correia, M., F. Boavida, F. Grosso, M. J. Salgado, L. M. Lito, J. M. Cristino, S. Mendo, and A. Duarte.** 2003. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2838-43.
58. **Costa, S. F., J. Woodcock, M. Gill, R. Wise, A. A. Barone, H. Caiaffa, and A. S. Levin.** 2000. Outer-membrane proteins pattern and detection of β -lactamases in clinical isolates of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Brazil. *Int. J. Antimicrob. Agents* **13**:175-82.
59. **Coulombe, B., and Z. F. Burton.** 1999. DNA bending and wrapping around RNA polymerase : a "revolutionary" model describing transcriptional mechanisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:457-78.
60. **Crowley, B., V. J. Benedi, and A. Domenech-Sanchez.** 2002. Expression of SHV-2 β -lactamase and of reduced amounts of OmpK36 porin in *Klebsiella pneumoniae* results in increased resistance to cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3679-3682.
61. **Cusi, M. G., M. Valassina, and P. E. Valensin.** 1994. Comparison of M-MLV reverse transcriptase and Tth polymerase activity in RT-PCR of samples with low virus burden. *Biotechniques* **17**:1034-6.
62. **Da Silva, G. J., M. Correia, C. Vital, G. Ribeiro, J. C. Sousa, R. Leitao, L. Peixe, and A. Duarte.** 2002. Molecular characterization of *bla*_{IMP-5}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol. Lett.* **215**:33-9.
63. **Danes, C., M. M. Navia, J. Ruiz, F. Marco, A. Jurado, M. T. Jimenez de Anta, and J. Vila.** 2002. Distribution of β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates and the effect of Syn 2190 (AmpC inhibitor) on the MICs of different β -lactam antibiotics. *J. Antimicrob Chemother.* **50**:261-4.
64. **De, E., A. Basle, M. Jaquinod, N. Saint, M. Mallea, G. Molle, and J. M. Pages.** 2001. A new mechanism of antibiotic resistance in Enterobacteriaceae induced by a structural modification of the major porin. *Mol. Microbiol.* **41**:189-98.
65. **deHaseh, P. L., M. L. Zupancic, and M. T. Record, Jr.** 1998. RNA polymerase-promoter interactions : the comings and goings of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* **180**:3019-25.

66. **Deutscher, M. P.** 2003. Degradation of stable RNA in bacteria. *J. Biol. Chem.* **278**:45041-4.
67. **Doménech-Sanchez, A., S. Hernandez-Allès, L. Martinez-Martinez, V. J. Benedi, and S. Alberti.** 1999. Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae* : its role in β -lactam antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* **181**:2726-2732.
68. **Domenech-Sanchez, A., L. Martinez-Martinez, S. Hernandez-Allés, M. C. Conejo, A. Pascual, J. M. Tomas, S. Alberti, and V. J. Benedi.** 2003. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3332-3335.
69. **Donald, H. M., W. Scaife, S. G. Amyes, and H. K. Young.** 2000. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA β -lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:196-9.
70. **Edlund, T., T. Grundstrom, and S. Normark.** 1979. Isolation and characterization of DNA repetitions carrying the chromosomal β -lactamase gene of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **173**:115-25.
71. **Evans, K., L. Adewoye, and K. Poole.** 2001. MexR repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa* : identification of MexR binding sites in the *mexA-mexR* intergenic region. *J. Bacteriol.* **183**:807-12.
72. **Fernandez-Cuenca, F., L. Martinez-Martinez, M. C. Conejo, J. A. Ayala, E. J. Perea, and A. Pascual.** 2003. Relationship between β -lactamase production, outer membrane protein and penicillin-binding protein profiles on the activity of carbapenems against clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob Chemother.* **51**:565-74.
73. **Fluit, A. C., and F. J. Schmitz.** 1999. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**:761-70.
74. **Fournier, B., A. Gravel, D. C. Hooper, and P. H. Roy.** 1999. Strength and regulation of the different promoters for chromosomal β -lactamases of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:850-5.
75. **Fournier, B., P. H. Lagrange, and A. Philippon.** 1996. β -lactamase gene promoters of 71 clinical strains of *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:460-3.
76. **Fournier, B., C. Y. Lu, P. H. Lagrange, R. Krishnamoorthy, and A. Philippon.** 1995. Point mutation in the pribnow box, the molecular basis of β -lactamase overproduction in *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1365-8.
77. **Fournier, B., P. H. Roy, P. H. Lagrange, and A. Philippon.** 1996. Chromosomal β -lactamase genes of *Klebsiella oxytoca* are divided into two main groups, *bla*_{OXY-1} and *bla*_{OXY-2}. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:454-9.
78. **Freeman, W. M., S. J. Walker, and K. E. Vrana.** 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* **26**:112-22, 124-5.

79. **George, A. M.** 1996. Multidrug resistance in enteric and other gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **139**:1-10.
80. **Giakkoupi, P., G. Petrikos, L. S. Tzouveleakis, S. Tsonas, N. J. Legakis, and A. C. Vatopoulos.** 2003. Spread of integron-associated VIM-type metallo- β -lactamase genes among imipenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* strains in Greek hospitals. *J. Clin. Microbiol.* **41**:822-5.
81. **Gibson, U. E., C. A. Heid, and P. M. Williams.** 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* **6**:995-1001.
82. **Girlich, D., A. Karim, L. Poirel, M. H. Cavin, C. Verny, and P. Nordmann.** 2000. Molecular epidemiology of an outbreak due to IRT-2 β -lactamase-producing strains of *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric department. *J. Antimicrob. Chemother.* **45**:467-73.
83. **Girlich, D., T. Naas, S. Bellais, L. Poirel, A. Karim, and P. Nordmann.** 2000. Heterogeneity of AmpC cephalosporinases of *Hafnia alvei* clinical isolates expressing inducible or constitutive ceftazidime resistance phenotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3220-3.
84. **Gombac, F., M. L. Riccio, G. M. Rossolini, C. Lagatolla, E. Tonin, C. Monti-Bragadin, A. Lavenia, and L. Dolzani.** 2002. Molecular characterization of integrons in epidemiologically unrelated clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Italian hospitals reveals a limited diversity of gene cassette arrays. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3665-8.
85. **Gordon, K. A., and R. N. Jones.** 2003. Susceptibility patterns of orally administered antimicrobials among urinary tract infection pathogens from hospitalized patients in North America : comparison report to Europe and Latin America. Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **45**:295-301.
86. **Grunberg-Manago, M.** 1999. Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annu. Rev. Genet.* **33**:193-227.
87. **Grundstrom, T., and B. Jaurin.** 1982. Overlap between *ampC* and *frd* operons on the *Escherichia coli* chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:1111-5.
88. **Guiraud, J.-P.** 1993. Génétique microbienne : bases théoriques et introduction aux applications pratiques. Edition Lavoisier, Paris.
89. **Haeggman, S., S. Lofdahl, and L. G. Burman.** 1997. An allelic variant of the chromosomal gene for class A β -lactamase K2, specific for *Klebsiella pneumoniae*, is the ancestor of SHV-1. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:2705-9.
90. **Hajnsdorf, E., and P. Regnier.** 2000. Host factor Hfq of *Escherichia coli* stimulates elongation of poly(A) tails by poly(A) polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:1501-5.
91. **Hancock, R. E., and F. S. Brinkman.** 2002. Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**:17-38.

92. **Harley, C. B., and R. P. Reynolds.** 1987. Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res.* **15**:2343-61.
93. **Hartl, D. and E. Jones.** 2003. Génétique Les grands principes, 3ème édition. Edition Dunod, Paris.
94. **Hawley, D. K., and W. R. McClure.** 1983. Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **11**:2237-55.
95. **Hein, I., A. Lehner, P. Rieck, K. Klein, E. Brandl, and M. Wagner.** 2001. Comparison of different approaches to quantify *Staphylococcus aureus* cells by real-time quantitative PCR and application of this technique for examination of cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:3122-6.
96. **Hellyer, T. J., L. E. DesJardin, L. Teixeira, M. D. Perkins, M. D. Cave, and K. D. Eisenach.** 1999. Detection of viable *Mycobacterium tuberculosis* by reverse transcriptase-strand displacement amplification of mRNA. *J. Clin. Microbiol.* **37**:518-23.
97. **Hernandez-Allés, S., S. Alberti, D. Alvarez, A. Doménech-Sanchez, L. Martinez-Martinez, J. Gil, J. M. Tomas, and V. J. Benedi.** 1999. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology* **145**:673-679.
98. **Hernandez-Allés, S., V. J. Benedi, L. Martinez-Martinez, A. Pascual, A. Aguilar, J. M. Tomas, and S. Alberti.** 1999. Development of resistance during antimicrobial therapy caused by insertion sequence interruption of porin genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:937-939.
99. **Hernandez-Allés, S., M. Conejo, A. Pascual, J. M. Tomas, V. J. Benedi, and L. Martinez-Martinez.** 2000. Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**:273-277.
100. **Hirakata, Y., R. Srikumar, K. Poole, N. Gotoh, T. Suematsu, S. Kohno, S. Kamihira, R. E. Hancock, and D. P. Speert.** 2002. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Exp. Med.* **196**:109-18.
101. **Hocquet, D., X. Bertrand, T. Kohler, D. Talon, and P. Plesiat.** 2003. Genetic and phenotypic variations of a resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemic clone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1887-94.
102. **Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson, and D. H. Gelfand.** 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:7276-80.
103. **Houang, E. T., Y. W. Chu, W. S. Lo, K. Y. Chu, and A. F. Cheng.** 2003. Epidemiology of rifampin ADP-ribosyltransferase (*arr-2*) and metallo- β -lactamase (*bla*_{IMP-4}) gene cassettes in class 1 integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1382-90.
104. **Hu, M., and R. C. Deonier.** 1981. Comparison of IS1, IS2 and IS3 copy number in *Escherichia coli* strains K-12, B and C. *Gene* **16**:161-70.

105. **INVS.** 2003. Infections ou colonisations à *Acinetobacter baumannii* multi-résistants aux antibiotiques, France - Point sur la situation au 29 décembre 2003. Institut National de Veille Sanitaire.
106. **Ishihama, A.** 2000. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:499-518.
107. **Jacobs, C., J. M. Frere, and S. Normark.** 1997. Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible β -lactam resistance in gram-negative bacteria. *Cell* **88**:823-32.
108. **Jaurin, B., and T. Grundstrom.** 1981. AmpC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of β -lactamases of the penicillinase type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:4897-901.
109. **Jaurin, B., T. Grundstrom, T. Edlund, and S. Normark.** 1981. The *E. coli* β -lactamase attenuator mediates growth rate-dependent regulation. *Nature* **290**:221-5.
110. **Jaurin, B., T. Grundstrom, and S. Normark.** 1982. Sequence elements determining *ampC* promoter strength in *E. coli*. *Embo J.* **1**:875-81.
111. **Jaurin, B., and S. Normark.** 1983. Insertion of IS2 creates a novel *ampC* promoter in *Escherichia coli*. *Cell* **32**:809-16.
112. **Jellen-Ritter, A. S., and W. V. Kern.** 2001. Enhanced expression of the multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in *Escherichia coli* mutants selected with a fluoroquinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1467-72.
113. **Johansson, J., and P. Cossart.** 2003. RNA-mediated control of virulence gene expression in bacterial pathogens. *Trends Microbiol.* **11**:280-5.
114. **Kaatz, G. W., S. M. Seo, and C. A. Ruble.** 1993. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1086-94.
115. **Kato, N., K. Yamazoe, C. G. Han, and E. Ohtsubo.** 2003. New insertion sequence elements in the upstream region of *cfiA* in imipenem-resistant *Bacteroides fragilis* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:979-85.
116. **Klein, P. G., and V. K. Juneja.** 1997. Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4441-8.
117. **Kohler, T., M. Michea-Hamzehpour, U. Henze, N. Gotoh, L. K. Curty, and J. C. Pechere.** 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **23**:345-54.
118. **Kokko, H. I., M. Kivineva, and S. O. Karenlampi.** 1996. Single-step immunocapture RT-PCR in the detection of raspberry bushy dwarf virus. *Biotechniques* **20**:842-6.
119. **Kopp, U., B. Wiedemann, S. Lindquist, and S. Normark.** 1993. Sequences of wild-type and mutant *ampD* genes of *Citrobacter freundii* and *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:224-8.

120. **Korfmann, G., and C. C. Sanders.** 1989. *ampG* is essential for high-level expression of AmpC β -lactamase in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**:1946-51.
121. **Kormarec, J.** 2001. Analyzing the developmental expression of sigma factors with S1-nuclease mapping. In : *Methods in Molecular Biology 160, Nuclease Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ.
122. **Kuga, A., R. Okamoto, and M. Inoue.** 2000. *ampR* gene mutations that greatly increase class C β -lactamase activity in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:561-7.
123. **Kwon, D. H., M. S. Osato, D. Y. Graham, and F. A. El-Zaatari.** 2000. Quantitative RT-PCR analysis of multiple genes encoding putative metronidazole nitroreductases from *Helicobacter pylori*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **15**:31-6.
124. **Lartigue, M. F., V. Leflon-Guibout, L. Poirel, P. Nordmann, and M. H. Nicolas-Chanoine.** 2002. Promoters P3, Pa/Pb, P4, and P5 upstream from *bla*_{TEM} genes and their relationship to β -lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:4035-7.
125. **Lawrence, J. G., and H. Ochman.** 1998. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:9413-7.
126. **Le Derout, J., M. Folichon, F. Briani, G. Deho, P. Regnier, and E. Hajnsdorf.** 2003. Hfq affects the length and the frequency of short oligo(A) tails at the 3' end of *Escherichia coli* rpsO mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **31**:4017-23.
127. **Lee, K., C.A. Holland-Staley, and P.R. Cunningham.** 1996. Genetic analysis of the Shine-Dalgarno interaction : selection of alternative functional mRNA-rRNA combinations. *RNA* **2**:1270-1285.
128. **Leflon-Guibout, V. Speldooren, B. Heym, and M.-H. Nicolas-Chanoine.** 2000. Updated sequence information and proposed nomenclature for *bla*_{TEM} genes and their promoters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3232-3234.
129. **Leflon-Guibout, V., S. V, H. B, and M. H. Nicolas-Chanoine.** 2000. Epidemiological survey of amoxicillin-clavulanate resistance and corresponding molecular mechanisms in *Escherichia coli* isolates in France : new genetic features of *bla*_{TEM} genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2709-2714.
130. **Lemozy, J., D. Sirot, C. Chanal, C. Huc, R. Labia, H. Dabernat, and J. Sirot.** 1995. First characterization of inhibitor-resistant TEM (IRT) β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:2580-2.
131. **Leverstein-Van Hall, M. A., A. Paauw, A. T. Box, H. E. Blok, J. Verhoef, and A. C. Fluit.** 2002. Presence of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital. *J. Clin. Microbiol.* **40**:3038-40.
132. **Lewin, B.** 1997. *Genes VI*, 6ème Edition Oxford University Press and Cell Press.
133. **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 β -lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:1742-52.

134. **Li, X. Z., H. Nikaido, and K. Poole.** 1995. Role of *mexA-mexB-oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**:1948-53.
135. **Li, X. Z., L. Zhang, and K. Poole.** 1998. Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance. *J. Bacteriol.* **180**:2987-91.
136. **Liebert, C. A., R. M. Hall, and A. O. Summers.** 1999. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:507-22.
137. **Lim, H. M., D. E. Lewis, H. J. Lee, M. Liu, and S. Adhya.** 2003. Effect of varying the supercoiling of DNA on transcription and its regulation. *Biochemistry* **42**:10718-25.
138. **Limansky, A. S., M. A. Mussi, and A. M. Viale.** 2002. Loss of a 29-kilodalton outer membrane protein in *Acinetobacter baumannii* is associated with imipenem resistance. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4776-8.
139. **Lindberg, F., and S. Normark.** 1986. Contribution of chromosomal β -lactamases to β -lactam resistance in enterobacteria. *Rev. Infect. Dis.* **8 Suppl 3**:S292-304.
140. **Lindberg, F., L. Westman, and S. Normark.** 1985. Regulatory components in *Citrobacter freundii* AmpC β -lactamase induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:4620-4.
141. **Livak, K. J., S. J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, and K. Deetz.** 1995. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* **4**:357-62.
142. **Livermore, D. M.** 1995. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**:557-84.
143. **Livermore, D. M.** 2001. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**:247-50.
144. **Lomovskaya, O., 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, 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**:105-16.
145. **Lopez-Otsoa, F., L. Gallego, K. J. Towner, L. Tysall, N. Woodford, and D. M. Livermore.** 2002. Endemic carbapenem resistance associated with OXA-40 carbapenemase among *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital in northern Spain. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4741-3.
146. **Low, A. S., F. M. MacKenzie, I. M. Gould, and I. R. Booth.** 2001. Protected environments allow parallel evolution of a bacterial pathogen in a patient subjected to long-term antibiotic therapy. *Mol. Microbiol.* **42**:619-30.
147. **Mah, T. F., K. Kuznedelov, A. Mushegian, K. Severinov, and J. Greenblatt.** 2000. The alpha subunit of *E. coli* RNA polymerase activates RNA binding by NusA. *Genes Dev.* **14**:2664-75.

148. **Mahillon, J.** 1998. Transposons as gene haulers. *APMIS* **106**:29-36.
149. **Mahillon, J., and M. Chandler.** 1998. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:725-74.
150. **Mahlen, S. D., S. S. Morrow, B. Abdalhamid, and N. D. Hanson.** 2003. Analyses of *ampC* gene expression in *Serratia marcescens* reveal new regulatory properties. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:791-802.
151. **Mammeri, H., L. Poirel, P. Bemer, H. Drugeon, and P. Nordmann.** 2004. Resistance to cefepime and ceftazidime due to a 4-amino-acid deletion in the chromosome-encoded AmpC β -lactamase of a *Serratia marcescens* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:716-20.
152. **Mammeri, H., L. Poirel, N. Mangeney, and P. Nordmann.** 2003. Chromosomal integration of a cephalosporinase gene from *Acinetobacter baumannii* into *Oligella urethralis* as a source of acquired resistance to β -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:1536-42.
153. **Martineau, F., F. J. Picard, P. H. Roy, M. Ouellette, and M. G. Bergeron.** 1996. Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.* **34**:2888-93.
154. **Martinez-Antonio, A., and J. Collado-Vides.** 2003. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:482-9.
155. **Masse, E., N. Majdalani, and S. Gottesman.** 2003. Regulatory roles for small RNAs in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:120-4.
156. **McGrath, S., J. S. Dooley, and R. W. Haylock.** 2000. Quantification of *Clostridium botulinum* toxin gene expression by competitive reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:1423-8.
157. **McLean, B. W., S. L. Wiseman, and A. M. Kropinski.** 1997. Functional analysis of sigma-70 consensus promoters in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **43**:981-5.
158. **Melano, R., A. Corso, A. Petroni, D. Centron, B. Orman, A. Pereyra, N. Moreno, and M. Galas.** 2003. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum β -lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**:36-42.
159. **Meng, W., T. Belyaeva, N. J. Savery, S. J. Busby, W. E. Ross, T. Gaal, R. L. Gourse, and M. S. Thomas.** 2001. UP element-dependent transcription at the *Escherichia coli* rrnB P1 promoter : positional requirements and role of the RNA polymerase alpha subunit linker. *Nucleic Acids Res.* **29**:4166-78.
160. **Mercier, J., and R. C. Levesque.** 1990. Cloning of SHV-2, OHIO-1, and OXA-6 β -lactamases and cloning and sequencing of SHV-1 β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:1577-83.

161. **Mitchell, C., L. Gao, and D. R. Demuth.** 2003. Positive and negative cis-acting regulatory sequences control expression of leukotoxin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 652. *Infect. Immun.* **71**:5640-9.
162. **Mitchell, J. E., D. Zheng, S. J. Busby, and S. D. Minchin.** 2003. Identification and analysis of 'extended -10' promoters in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **31**:4689-95.
163. **Mooney, R. A., I. Artsimovitch, and R. Landick.** 1998. Information processing by RNA polymerase : recognition of regulatory signals during RNA chain elongation. *J. Bacteriol.* **180**:3265-75.
164. **Murakami, K. S., and S. A. Darst.** 2003. Bacterial RNA polymerases : the whole story. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**:31-9.
165. **Murakami, K. S., S. Masuda, E. A. Campbell, O. Muzzin, and S. A. Darst.** 2002. Structural basis of transcription initiation : an RNA polymerase holoenzyme-DNA complex. *Science* **296**:1285-90.
166. **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**:922-6.
167. **Nelson, E. C., H. Segal, and B. G. Elisha.** 2003. Outer membrane protein alterations and *bla*_{TEM-1} variants : their role in β -lactam resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* **52**:899-903.
168. **Nesvera, J., J. Hochmannova, and M. Patek.** 1998. An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **169**:391-5.
169. **Nikaido, H.** 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:593-656.
170. **Nikaido, H.** 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **178**:5853-9.
171. **Nikaido, H., and H. I. Zgurskaya.** 2001. AcrAB and related multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**:215-8.
172. **Nishino, K., J. Yamada, H. Hirakawa, T. Hirata, and A. Yamaguchi.** 2003. Roles of TolC-dependent multidrug transporters of *Escherichia coli* in resistance to β -lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3030-3.
173. **Nordmann, P., and L. Poirel.** 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.* **8**:321-31.
174. **Ochman, H., and U. Bergthorsson.** 1995. Genome evolution in enteric bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**:734-8.
175. **Odeh, R., S. Kelkar, A. M. Hujer, R. A. Bonomo, P. C. Schreckenberger, and J. P. Quinn.** 2002. Broad resistance due to plasmid-mediated AmpC β -lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli*. *Clin. Infect. Dis.* **35**:140-5.

176. **Oh, E. T., and J. S. So.** 2003. A rapid method for RNA preparation from Gram-positive bacteria. *J. Microbiol. Methods* **52**:395-8.
177. **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**:306-8.
178. **Olsson, O., S. Bergstrom, F. P. Lindberg, and S. Normark.** 1983. AmpC β -lactamase hyperproduction in *Escherichia coli* : natural ampicillin resistance generated by horizontal chromosomal DNA transfer from *Shigella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:7556-60.
179. **Olsson, O., S. Bergstrom, and S. Normark.** 1982. Identification of a novel *ampC* β -lactamase promoter in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Embo J.* **1**:1411-6.
180. **O'Mahony, J., and C. Hill.** 2002. A real time PCR assay for the detection and quantitation of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* using SYBR Green and the Light Cycler. *J. Microbiol. Methods* **51**:283-93.
181. **Pagès, J.-M. and E. Garnotel.** 2003. Perméabilité membranaire et résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif. *Revue Française des Laboratoires* **352**:57-63.
182. **Paget, M. S., and J. D. Helmann.** 2003. The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biol.* **4**:203.
183. **Pao, S. S., I. T. Paulsen, and M. H. Saier, Jr.** 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:1-34.
184. **Papanicolaou, G. A., A. A. Medeiros, and G. A. Jacoby.** 1990. Novel plasmid-mediated β -lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy β -lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**:2200-9.
185. **Patel, R.** 2003. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. *J. Antimicrob Chemother.* **51 Suppl 3**:13-21.
186. **Paterson, D. L., K. M. Hujer, A. M. Hujer, B. Yeiser, M. D. Bonomo, L. B. Rice, and R. A. Bonomo.** 2003. Extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries : dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:3554-60.
187. **Paulsen, I. T., T. G. Littlejohn, P. Radstrom, L. Sundstrom, O. Skold, G. Swedberg, and R. A. Skurray.** 1993. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:761-8.
188. **Paulsen, I. T., R. A. Skurray, R. Tam, M. H. Saier, Jr., R. J. Turner, J. H. Weiner, E. B. Goldberg, and L. L. Grinius.** 1996. The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol. Microbiol.* **19**:1167-75.

189. **Pearson, J. P., C. Van Delden, and B. H. Iglewski.** 1999. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol.* **181**:1203-10.
190. **Perilli, M., E. Dell'Amico, B. Segatore, M. R. de Massis, C. Bianchi, F. Luzzaro, G. M. Rossolini, A. Toniolo, G. Nicoletti, and G. Amicosante.** 2002. Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamases produced by nosocomial isolates of Enterobacteriaceae from an Italian nationwide survey. *J. Clin. Microbiol.* **40**:611-4.
191. **Persing, D. H.** 1993. *In Vitro* Nucleic Acid Amplification Techniques. In : Diagnostic Molecular Microbiology : principles and applications. Peasing D.H., Tenover F.C. and White T.J., Ed American Society for Microbiology, Washington, D.C.
192. **Petit, A., H. Ben Yaghlane-Bousslama, L. Sofer, and R. Labia.** 1992. Does high level production of SHV-type penicillinase confer resistance to ceftazidime in Enterobacteriaceae ? *FEMS Microbiol. Lett.* **71**:89-94.
193. **Philippon, A., G. Arlet, and G. A. Jacoby.** 2002. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1-11.
194. **Plesiat, P. R.-A., J. Pechere, J-C. Köhler, T.** 1998. Systèmes d'efflux actifs chez *Pseudomonas aeruginosa*. *Méd. Mal. Infect.* **28**:126-133.
195. **Ploy, M. C., T. Lambert, A. Gassama, and F. Denis.** 2000. The role of integrons in dissemination of antibiotic resistance. *Ann. Biol. Clin.* **58**:439-44.
196. **Podglajen, I., J. Breuil, F. Bordon, L. Gutmann, and E. Collatz.** 1992. A silent carbapenemase gene in strains of *Bacteroides fragilis* can be expressed after a one-step mutation. *FEMS Microbiol. Lett.* **70**:21-9.
197. **Podglajen, I., J. Breuil, and E. Collatz.** 1994. Insertion of a novel DNA sequence, 1S1186, upstream of the silent carbapenemase gene *cfiA*, promotes expression of carbapenem resistance in clinical isolates of *Bacteroides fragilis*. *Mol. Microbiol.* **12**:105-14.
198. **Poirel, L., M. Guibert, D. Girlich, T. Naas, and P. Nordmann.** 1999. Cloning, sequence analyses, expression, and distribution of *ampC-ampR* from *Morganella morganii* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**:769-76.
199. **Poirel, L., C. Heritier, I. Podglajen, W. Sougakoff, L. Gutmann, and P. Nordmann.** 2003. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-encoded SHV β -lactamase that compromises the efficacy of imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:755-8.
200. **Poirel, L., C. Heritier, V. Tolun, and P. Nordmann.** 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:15-22.
201. **Poirel, L., O. Menuteau, N. Agoli, C. Cattoen, and P. Nordmann.** 2003. Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J. Clin. Microbiol.* **41**:3542-7.

202. **Poitras, E. H., A.** 2002. La PCR en temps réel : principes et applications. *Rev. Biol. Technology* **2**:2-11.
203. **Poole, K.** 1994. Bacterial multidrug resistance emphasis on efflux mechanisms and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **34**:453-6.
204. **Poole, K.** 2000. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:2233-41.
205. **Poole, K., K. Tetro, Q. Zhao, S. Neshat, D. E. Heinrichs, and N. Bianco.** 1996. Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa* : *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**:2021-8.
206. **Preston, K. E., C. C. Radomski, and R. A. Venezia.** 2000. Nucleotide sequence of the chromosomal *ampC* gene of *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:3158-62.
207. **Pruss, G. J., and K. Drlica.** 1989. DNA supercoiling and prokaryotic transcription. *Cell* **56**:521-3.
208. **Putman, M., H. W. van Veen, and W. N. Konings.** 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:672-93.
209. **Quale, J., S. Bratu, D. Landman, and R. Heddurshetti.** 2003. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. *Clin. Infect. Dis.* **37**:214-20.
210. **Quale, J. M. and the Task force.** 2002. The cost of antibiotic resistance: effect of resistance among *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, and *Pseudomonas aeruginosa* on length of hospital stay. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **23**:106-8.
211. **Rauhut, R., and G. Klug.** 1999. mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**:353-70.
212. **Reisbig, M. D., A. Hossain, and N. D. Hanson.** 2003. Factors influencing gene expression and resistance for Gram-negative organisms expressing plasmid-encoded *ampC* genes of *Enterobacter* origin. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:1141-51.
213. **Ribera, A., J. Vila, F. Fernandez-Cuenca, L. Martinez-Martinez, A. Pascual, A. Beceiro, G. Bou, J. M. Cisneros, J. Pachon, and J. Rodriguez-Bano.** 2004. Type 1 integrons in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates collected at Spanish hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:364-5.
214. **Rice, L. B., L. L. Carias, A. M. Hujer, M. Bonafede, R. Hutton, C. Hoyen, and R. A. Bonomo.** 2000. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 β -lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:362-367.
215. **Richardson, J. P.** 2003. Loading Rho to terminate transcription. *Cell* **114**:157-9.

216. **Rivas, R., N. Vizcaino, R. M. Buey, P. F. Mateos, E. Martinez-Molina, and E. Velazquez.** 2001. An effective, rapid and simple method for total RNA extraction from bacteria and yeast. *J. Microbiol. Methods* **47**:59-63.
217. **Rokbi, B., D. Seguin, B. Guy, V. Mazarin, E. Vidor, F. Mion, M. Cadoz, and M. J. Quentin-Millet.** 2001. Assessment of *Helicobacter pylori* gene expression within mouse and human gastric mucosae by real-time reverse transcriptase PCR. *Infect. Immun.* **69**:4759-66.
218. **Rosenberg, E. Y., D. Ma, and H. Nikaido.** 2000. AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump. *J. Bacteriol.* **182**:1754-6.
219. **Rowe-Magnus, D. A., and D. Mazel.** 2001. Integrons : natural tools for bacterial genome evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**:565-9.
220. **Sabate, M., E. Miro, F. Navarro, C. Verges, R. Aliaga, B. Mirelis, and G. Prats.** 2002. β -lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). *J. Antimicrob. Chemother.* **49**:989-97.
221. **Saier, M. H., Jr.** 1998. Molecular phylogeny as a basis for the classification of transport proteins from bacteria, archaea and eukarya. *Adv. Microb. Physiol.* **40**:81-136.
222. **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**:841-7.
223. **Sails, A. D., F. J. Bolton, A. J. Fox, D. R. Wareing, and D. L. Greenway.** 1998. A reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for the detection of thermophilic *Campylobacter spp.* *Mol. Cell Probes.* **12**:317-22.
224. **Saito, K., S. Eda, H. Maseda, and T. Nakae.** 2001. Molecular mechanism of MexR-mediated regulation of MexAB-OprM efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **195**:23-8.
225. **Saito, K., H. Yoneyama, and T. Nakae.** 1999. *nalB*-type mutations causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the *mexR* gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**:67-72.
226. **Sanchez, P., F. Rojo, and J. L. Martinez.** 2002. Transcriptional regulation of *mexR*, the repressor of *Pseudomonas aeruginosa* mexAB-oprM multidrug efflux pump. *FEMS Microbiol. Lett.* **207**:63-8.
227. **Sanders, C. C., M. Peyret, E. S. Moland, S. J. Cavalieri, C. Shubert, K. S. Thomson, J. M. Boeufgras, and W. E. Sanders, Jr.** 2001. Potential impact of the VITEK2 system and the Advanced Expert System on the clinical laboratory of a university-based hospital. *J. Clin. Microbiol.* **39**:2379-85.
228. **Sarkar, N.** 1997. Polyadenylation of mRNA in prokaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* **66**:173-97.

229. **Savli, H., A. Karadenizli, F. Kolayli, S. Gundes, U. Ozbek, and H. Vahaboglu.** 2003. Expression stability of six housekeeping genes : a proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. *J. Med. Microbiol.* **52**:403-8.
230. **Schembri, M. A., R. C. Bayly, and J. K. Davies.** 1994. Cloning and analysis of the polyhydroxyalkanoic acid synthase gene from an *Acinetobacter sp.* : evidence that the gene is both plasmid and chromosomally located. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**:145-52.
231. **Schembri, M. A., R. C. Bayly, and J. K. Davies.** 1995. Phosphate concentration regulates transcription of the *Acinetobacter* polyhydroxyalkanoic acid biosynthetic genes. *J. Bacteriol.* **177**:4501-7.
232. **Schneider, D. A. R., W. Gourse, R.L.** 2003. Control of rRNA expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:151-156.
233. **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**:2831-7.
234. **Schweitzer, B., and S. Kingsmore.** 2001. Combining nucleic acid amplification and detection. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**:21-7.
235. **Schweizer, H. P.** 1998. Intrinsic resistance to inhibitors of fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is due to efflux : application of a novel technique for generation of unmarked chromosomal mutations for the study of efflux systems. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**:394-8.
236. **Scordilis, G. E., H. Ree, and T. G. Lessie.** 1987. Identification of transposable elements which activate gene expression in *Pseudomonas cepacia*. *J. Bacteriol.* **169**:8-13.
237. **Segal, H., E. C. Nelson, and B. G. Elisha.** 2004. Genetic environment and transcription of *ampC* in an *Acinetobacter baumannii* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:612-4.
238. **Segal, H., R. Thomas, and B. Gay Elisha.** 2003. Characterization of class 1 integron resistance gene cassettes and the identification of a novel IS-like element in *Acinetobacter baumannii*. *Plasmid* **49**:169-78.
239. **Selinger, D. W., R. M. Saxena, K. J. Cheung, G. M. Church, and C. Rosenow.** 2003. Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome Res.* **13**:216-23.
240. **Severinov, K.** 2000. RNA polymerase structure-function : insights into points of transcriptional regulation. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**:118-25.
241. **Sheridan, G. E., C. I. Masters, J. A. Shallcross, and B. M. MacKey.** 1998. Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1313-8.
242. **Sheridan, S. D., M. L. Opel, and G. W. Hatfield.** 2001. Activation and repression of transcription initiation by a distant DNA structural transition. *Mol. Microbiol.* **40**:684-90.

243. **Shimamoto, T., K. Noguchi, M. Kuroda, M. Tsuda, and T. Tsuchiya.** 1994. Transcriptional attenuation and differential mRNA stability in the regulation of the *Escherichia coli* melibiose operon. *J. Biochem.* **115**:1185-9.
244. **Siu, L. K., P. L. Ho, K. Y. Yuen, S. S. Wong, and P. Y. Chau.** 1997. Transferable hyperproduction of TEM-1 β -lactamase in *Shigella flexneri* due to a point mutation in the pribnow box. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:468-70.
245. **Siu, L. K., P. L. Lu, J. Y. Chen, F. M. Lin, and S. C. Chang.** 2003. High-level expression of AmpC β -lactamase due to insertion of nucleotides between -10 and -35 promoter sequences in *Escherichia coli* clinical isolates : cases not responsive to extended-spectrum-cephalosporin treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2138-44.
246. **Skeidsvoll, J., and P. M. Ueland.** 1995. Analysis of double-stranded DNA by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection using the monomeric dye SYBR green I. *Anal. Biochem.* **231**:359-65.
247. **Smith, R. D., C. W. Ogden, and M. A. Penny.** 2001. Exclusive amplification of cDNA template (EXACT) RT-PCR to avoid amplifying contaminating genomic pseudogenes. *Biotechniques* **31**:776-8, 780, 782.
248. **Speer, B. S., N. B. Shoemaker, and A. A. Salyers.** 1992. Bacterial resistance to tetracycline : mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin. Microbiol. Rev.* **5**:387-99.
249. **Srikumar, R., C. J. Paul, and K. Poole.** 2000. Influence of mutations in the *mexR* repressor gene on expression of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **182**:1410-4.
250. **Steege, D. A.** 2000. Emerging features of mRNA decay in bacteria. *RNA* **6**:1079-90.
251. **Stürenberg, E. M., D.** 2003. Extended-spectrum β -lactamases : implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *J. Infection* **47**:273-295.
252. **Sung, K., S. A. Khan, M. S. Nawaz, and A. A. Khan.** 2003. A simple and efficient Triton X-100 boiling and chloroform extraction method of RNA isolation from Gram-positive and Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **229**:97-101.
253. **Toussaint, A., and C. Merlin.** 2002. Mobile elements as a combination of functional modules. *Plasmid* **47**:26-35.
254. **Walckenaer, E., L. Poirel, V. Leflon-Guibout, P. Nordmann, and M. H. Nicolas-Chanoine.** 2004. Genetic and biochemical characterization of the chromosomal class A β -lactamases of *Raoultella* (formerly *Klebsiella*) *planticola* and *Raoultella ornithinolytica*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:305-12.
255. **Wiame, I., S. Remy, R. Swennen, and L. Sagi.** 2000. Irreversible heat inactivation of DNase I without RNA degradation. *Biotechniques* **29**:252-4, 256.
256. **Wilson, K. S., and P. H. von Hippel.** 1995. Transcription termination at intrinsic terminators : the role of the RNA hairpin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:8793-7.

257. **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**:367-74.
258. **Xu, F. F., C. Gaggero, and S. N. Cohen.** 2002. Polyadenylation can regulate ColE1 type plasmid copy number independently of any effect on RNAI decay by decreasing the interaction of antisense RNAI with its RNAII target. *Plasmid* **48**:49-58.
259. **Yum, J. H., K. Yi, H. Lee, D. Yong, K. Lee, J. M. Kim, G. M. Rossolini, and Y. Chong.** 2002. Molecular characterization of metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter genomospecies* 3 from Korea : identification of two new integrons carrying the *bla*_{VIM-2} gene cassettes. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**:837-40.

RESUME

La co-existence de nombreux mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries, témoignant de leurs formidables capacités d'adaptation, entraîne des difficultés d'interprétation des antibiogrammes, au quotidien. Pendant de nombreuses années, les études sur les β -lactamases sont restées majoritairement qualitatives, avec description de nouvelles enzymes, résultant souvent de mutations ponctuelles, par rapport à des enzymes précédemment décrites. De nouveaux outils moléculaires permettent de s'intéresser aux aspects quantitatifs et, notamment, au niveau de production des β -lactamases dont les gènes subissent une régulation transcriptionnelle par des régions promotrices situées en amont.

Nous avons étudié les mécanismes induisant une hyperproduction de β -lactamase chromosomique chez *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* et *Klebsiella pneumoniae*. Les données bactériologiques, biochimiques et épidémiologiques ont été confrontées à l'analyse moléculaire. Les séquences des régions situées en amont des gènes de β -lactamases ont été déterminées et des techniques de RT-PCR ont été développées, afin d'étudier le niveau de transcription des gènes et de relier ainsi les phénotypes aux génotypes.

Des mutations ponctuelles dans la Pribnow box ont été mises en évidence dans le promoteur des gènes *ampC* de *E. coli* et *bla_{SHV-1}* de *K.pneumoniae*, responsables d'une augmentation du niveau de transcription du gène. Chez *A. baumannii*, l'hyperproduction de l'enzyme chromosomique semble liée à la présence d'une séquence d'insertion de 1200 pb en amont du gène. Cependant, chez *K. pneumoniae* et *A. baumannii*, bactéries souvent multirésistantes, la résistance aux β -lactamines par hyperproduction de β -lactamase chromosomique est fréquemment associée à d'autres mécanismes, enzymatiques ou non. Notre étude a permis de préciser l'impact relatif de deux types d'évènements génétiques sur l'augmentation de la résistance aux β -lactamines, par analyse des transcrits spécifiques.

TITLE

Contribution of the study of mRNA to the investigation of β -lactam resistance in Gram negative bacilli.

ABSTRACT

The coexistence of various mechanisms of resistance in bacteria is a consequence of their high adaptability to environmental changes, including antibiotic treatments. The interpretation of antibiotics testing can therefore be very problematic. For many years, the studies of β -lactamases have remained mainly qualitative, with the description of new enzymes that often result from point mutations concerning previously described enzymes. The new molecular tools allow to study the quantitative aspects of resistance and, particularly, the level of production of the β -lactamases, which is the consequence of the transcriptional regulation of the genes by upstream promoter or regulatory regions.

In this study, the mechanism of hyperproduction of the chromosomal β -lactamase from *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* was investigated. The bacteriological, biochemical, and epidemiologic data were compared to the molecular analysis. Sequences of the upstream regions of the β -lactamase genes were determined, and RT-PCR methodology was developed in order to study the level of transcription of genes and to connect the phenotypes to the genotypes. Mutations were detected in the Pribnow box of the promoter of the *ampC* gene from *E. coli* and *bla_{SHV-1}* of *K.pneumoniae*, leading to an increase in the level of transcription of the gene. On the other hand, the overproduction of the chromosomal enzyme of *A. baumannii* seems to be related to the presence of an insertion sequence of 1200 bp upstream of the gene. For both *K. pneumoniae* and *A. baumannii*, the chromosomal β -lactamase hyperproduction was often related to other resistance mechanisms, enzymatic or not. Thus, this study investigated, by specific transcript analysis, the impact of two types of genetic events on the increase in β -lactam resistance.

Discipline : Bactériologie

MOTS CLES : β -lactamases, séquences d'insertion, mutations, régulation génétique, RT-PCR, transcription, ARNm.

Laboratoires de Bactériologie - Faculté de Pharmacie - CHU - Nantes.
1 rue G. Veil, 44035 Nantes Cedex 01 - Institut de Biologie, 9 quai Moncoussu, 44093 Nantes Cedex 01.