

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE NANTES - Santé	
SUDOC	
NOTE	09 NANT 43-VS
LOC.	EXCLU
HOR.	

**ETUDE CHEZ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
DE L'IMPACT DU SYSTEME D'EFFLUX
MEXAB-OPRM SUR LES TRAITEMENTS
ANTIBIOTIQUES ET SUR L'EXPRESSION DE
LA VIRULENCE**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale BIOLOGIE SANTE

Discipline SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Présentée

et soutenue publiquement par

David BOUTOILLE

Le 21 avril 2009, devant le jury ci-dessous

M. le Pr G. POTEL

Président

M. le Pr B. GUERY

Rapporteur

M. le Pr P. PLESIAT

Rapporteur

M. le Pr P. CHAVANET

Examineur

M. le Pr F. RAFFI

Examineur

Directeur de thèse : Mme le Dr J. CAILLON

SOMMAIRE

RESUME / ABSTRACT	8
I- INTRODUCTION	9
II- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	10
1- Rappels sur la pathogénie des infections respiratoires à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
1a- Facteurs de virulence de la surface bactérienne	11
1b- Facteurs de virulence sécrétés	13
2- Résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux antibioti- ques et mécanismes en cause	17
3- Mécanismes d'efflux	18
4- Apports des modèles expérimentaux animaux	35
III- TRAVAUX PERSONNELS	39
PLAN D'ETUDE	40
MATERIELS ET METHODES	40
1- Antibiotiques	40
2- Etudes bactériologiques <i>in vitro</i>	40
3- Animaux	41
4- Modèles animaux expérimentaux	42

5 - Etude du système de sécrétion de type III (SSTT) : cultures cellulaires, biologie moléculaire	46
6- Etude du quorum sensing	49
7- Mise au point d'une technique de mesure de la perméabilité endothéliale utilisant l'albumine-FITC	55
8- Analyse statistique	57
9- Résultats	
1 ^{ère} étude : Impact <i>in vivo</i> du système d'efflux MexAB-OprM sur l'efficacité des β -lactamines dans un modèle expérimental d'endocardite à <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	60
Article	71
2 ^{ème} étude : Impact <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i> du système d'efflux MexAB-OprM sur l'expression de la virulence chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	84
Article	109
3 ^{ème} étude : Mise au point d'une technique d'étude de la perméabilité endothéliale utilisant l'albumine FITC	128
Article	138
 IV- PERSPECTIVES	 153
V- CONCLUSION	156
VI- REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	157

Ce travail a été réalisé en 2 phases : la première (2006-2007) au sein du laboratoire de l'EA 3826 de la Faculté de Médecine de Nantes, la seconde dans le laboratoire de l'EA 2689 de la Faculté de Médecine de Lille.

Il a donné lieu aux publications suivantes :

- 1- Boutoille D, Jacqueline C, Le Mabecque V, Potel G, Caillon J. ***In-vivo* impact of the MexAB-OprM efflux system on β -lactams efficacy in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* infection.** *Int J Antimicrob Agents*. 2009. Epub ahead of print.
- 2- Boutoille D, Marechal X, Pichenot M, Chemani C, Guery B, Faure K. **FITC-albumin as a marker for assessment of endothelial permeability in mice: comparison with 125 I-albumin.** *Exp Lung Res*.
Sous presse.
- 3- David Boutoille, Julien Buyck, Jocelyne Caillon, Gilles Potel, Patrick Plésiat, Benoît Guery, Karine Faure. **MexAB-OprM-overproduction and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: assessment *in vitro* and in experimental models of lung infection.**
Soumis à publication.

RESUME

Les systèmes d'efflux, chez les bactéries, rejettent un large éventail de substrats du milieu intracellulaire vers le milieu extérieur, dont les antibiotiques. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, MexAB-OprM entre en synergie avec les autres mécanismes de résistance naturels ou acquis. Ces effets sont bien caractérisés *in vitro*, mais leur impact *in vivo* est moins clair. Comment doit-on interpréter sur l'antibiogramme l'expression de l'efflux sur les antibiotiques concernés : restent-ils efficaces dans les infections sévères ? Sur la virulence, MexAB-OprM interfère en rejetant vers l'extérieur les homosérine-lactones, auto-activateurs transcriptionnels impliqués dans la régulation du quorum-sensing, et diminuerait l'expression des facteurs de virulence. Cet effet a été montré jusqu'ici essentiellement *in vitro*, sur des souches de laboratoire. Qu'en est-il en pratique clinique : les souches concernées sont-elles réellement moins virulentes ? Cette thèse a eu pour buts d'éclaircir ces interrogations. Dans une première partie, nous avons observé l'impact de MexAB-OprM sur plusieurs β -lactamines anti-*Pseudomonas* dans un modèle d'endocardite expérimentale chez le lapin, en simulant la pharmacocinétique humaine de ces molécules. Dans la deuxième partie, nous avons étudié la relation entre MexAB-OprM et la virulence, à la fois *in vitro* par l'étude d'un certain nombre de déterminants de la virulence et des auto-inducteurs impliqués dans le quorum-sensing, et *in vivo* dans différents modèles murins d'agression bactérienne pulmonaire.

ABSTRACT

Bacterial efflux systems extrude antibiotics, amongst a wide range of substances from the intracellular middle toward the outside. In *Pseudomonas aeruginosa*, MexAB-oprM acts synergistically with other natural or acquired mechanisms of resistance. Efflux is well characterized *in vitro*, but its *in vivo* effects are less clear. In particular, how must they be interpreted on the antibiogram : are the implicated antibiotics still efficient in severe infections ? MexAB-oprM interferes with virulence by extruding the homoserine lactones, *i.e.* the transcriptional autoactivators that regulate quorum-sensing, and then might decrease expression of bacterial virulence determinants. This was shown essentially *in vitro* on laboratory strains. But in clinical practice, are the concerned strains really less virulent ? In this work, we tried to bring a few elements of answers to these questions. In a first part, we studied the impact of MexAB-OprM on antipseudomonal β -lactams, in an experimental model of rabbit endocarditis, using a simulation of human pharmacokinetics. In a second part, we studied the supposed relationship between MexAB-OprM and the expression of virulence, *in*

vitro by assessing several virulence factors and quorum-sensing autoinducers, and *in vivo* in different murine models of pulmonary aggression.

I- INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa est la bactérie pathogène opportuniste la plus fréquemment impliquée dans les infections nosocomiales : elle est responsable de 16 % des pneumopathies, 12 % des infections urinaires et 10 % des bactériémies acquises en milieu hospitalier. *P. aeruginosa* est une des bactéries pathogènes les plus fréquemment responsables de pneumopathies acquises sous ventilation mécanique, avec une mortalité directement attribuable atteignant 38 %. Les patients souffrant de mucoviscidose payent également un lourd tribut à cette bactérie, par le biais d'infections respiratoires qui font le pronostic de cette maladie.

La gravité des infections à *P. aeruginosa* est liée d'une part à sa capacité de cumuler de multiples mécanismes de résistance aux antibiotiques, dont les systèmes d'efflux, et d'autre part à un large arsenal de facteurs de virulence. Les systèmes d'efflux ont été bien caractérisés *in vitro*, mais peu de données ont été publiées quant à leur impact sur la thérapeutique *in vivo*. Par ailleurs, l'expression des facteurs de virulence fait l'objet d'une régulation complexe mettant en jeu, entre autres, un mécanisme de communication intercellulaire : le quorum-sensing. Une relation semble exister entre MexAB-OprM et l'expression de la virulence par le biais d'une interaction de l'efflux avec le quorum-sensing.

Les buts de ce travail ont été d'étudier l'impact du système d'efflux MexAB-OprM sur les infections à *P. aeruginosa*, à la fois sur les traitements antibiotiques et sur l'expression des facteurs de virulence.

II- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

P. aeruginosa est un bacille à Gram négatif, aérobie, long de 1 à 3 µm, mobile grâce à un flagelle polaire. C'est une bactérie retrouvée dans l'environnement, dans les sols humides (eau, égouts) et les végétaux, où elle vit à l'état saprophyte. Cette bactérie est dotée d'une grande adaptabilité nutritionnelle et métabolique, qui lui permet de survivre dans un environnement hostile. *P. aeruginosa* peut coloniser l'homme, aux niveaux de la peau (plis cutanés, plaies), du conduit auditif externe, du nasopharynx, du tractus digestif et/ou génital. Elle se comporte comme une bactérie opportuniste, à l'occasion de la diminution des défenses, de la rupture des barrières cutanéomuqueuses, de manœuvres instrumentales invasives (cathéter intravasculaire, sondage urinaire, prothèse endotrachéale), passant de la colonisation à l'infection essentiellement sur des terrains dits débilisés : malades dénutris, brûlés, cancéreux, patients d'hématologie, polytraumatisés, polyopérés, etc...

Chez le patient atteint de mucoviscidose, la concentration élevée en NaCl, la déshydratation locale et l'hyperviscosité du mucus entravent les mécanismes de défense de l'épithélium respiratoire et favorisent l'adhésion, puis l'infection par *P. aeruginosa*.

1- Rappels sur la physiopathologie des infections respiratoires à *P. aeruginosa*

P. aeruginosa est impliqué dans 16 à 34,6 % des infections bronchopulmonaires acquises en milieu de réanimation,^{1,2} et dans 39 % des pneumopathies acquises dans un contexte postopératoire.

La première étape, qui consiste en la pénétration de la bactérie au niveau des voies aériennes inférieures, peut se réaliser de multiples façons : fausses routes, inhalation d'aérosols infectés, dissémination hématogène, inoculation

directe à travers la sonde trachéale au cours des manœuvres d'aspiration, micro-inhalations répétées de sécrétions pharyngées. Chez les patients sous ventilation mécanique, la sonde d'intubation endotrachéale ou la canule de trachéotomie court-circuitent les défenses mécaniques respiratoires et altèrent la fonction mucociliaire.

Lors des bronchopneumopathies à *P. aeruginosa* acquises sous ventilation artificielle, la mortalité est comprise entre 42 et 69 %.³

Ce succès épidémiologique d'une part, et ce mauvais pronostic d'autre part sont liés pour une grande part aux nombreux facteurs de virulence décrits chez *P. aeruginosa*. Bien qu'intimement intriqués, deux groupes sont souvent individualisés :

- les facteurs de virulence liés à la paroi bactérienne, intervenant en particulier dans l'attachement et la colonisation : pili de type IV, lipopolysaccharide, flagelle...
- les facteurs de virulence sécrétés hors de la bactérie et provoquant des lésions cellulaires ou tissulaires : exotoxine A, toxines du système de sécrétion de type III, élastase, pyocyanine, rhamnolipides...

1a- Facteurs de virulence de la surface bactérienne

Ils jouent un rôle crucial lors de l'adhésion puis la colonisation de la surface de l'épithélium respiratoire. Leur action est résumée dans la **figure 1**, p. 12.

Flagelles

Outre leur action de propulsion, qui en fait le principal instrument de mobilité de la bactérie, les flagelles ont un rôle critique dans la pathogénie de l'infection, permettant l'adhésion à la cellule épithéliale grâce à sa liaison avec un constituant de la membrane cellulaire, l'asialoganglioside gangliotétraosylcéramide (asialoGM1).⁴ Ils sont responsables d'une réponse

inflammatoire par leur interaction avec les récepteurs Toll TLR5 et TLR6. Enfin, ils induisent la production d'IL-8 par activation d'une voie des kinases.^{5,6}

Enfin, de manière totalement indépendante de sa fonction motrice là encore, le flagelle protège la bactérie de la clairance par la protéine A du surfactant, en jouant le rôle de stabilisateur des charges électriques au niveau de la membrane externe, ainsi qu'en interagissant avec la densité du LPS.⁷

Figure 1 : Interactions des facteurs de virulence de surface de *P. aeruginosa* avec la cellule épithéliale respiratoire. D'après Kipnis *et al.*⁸

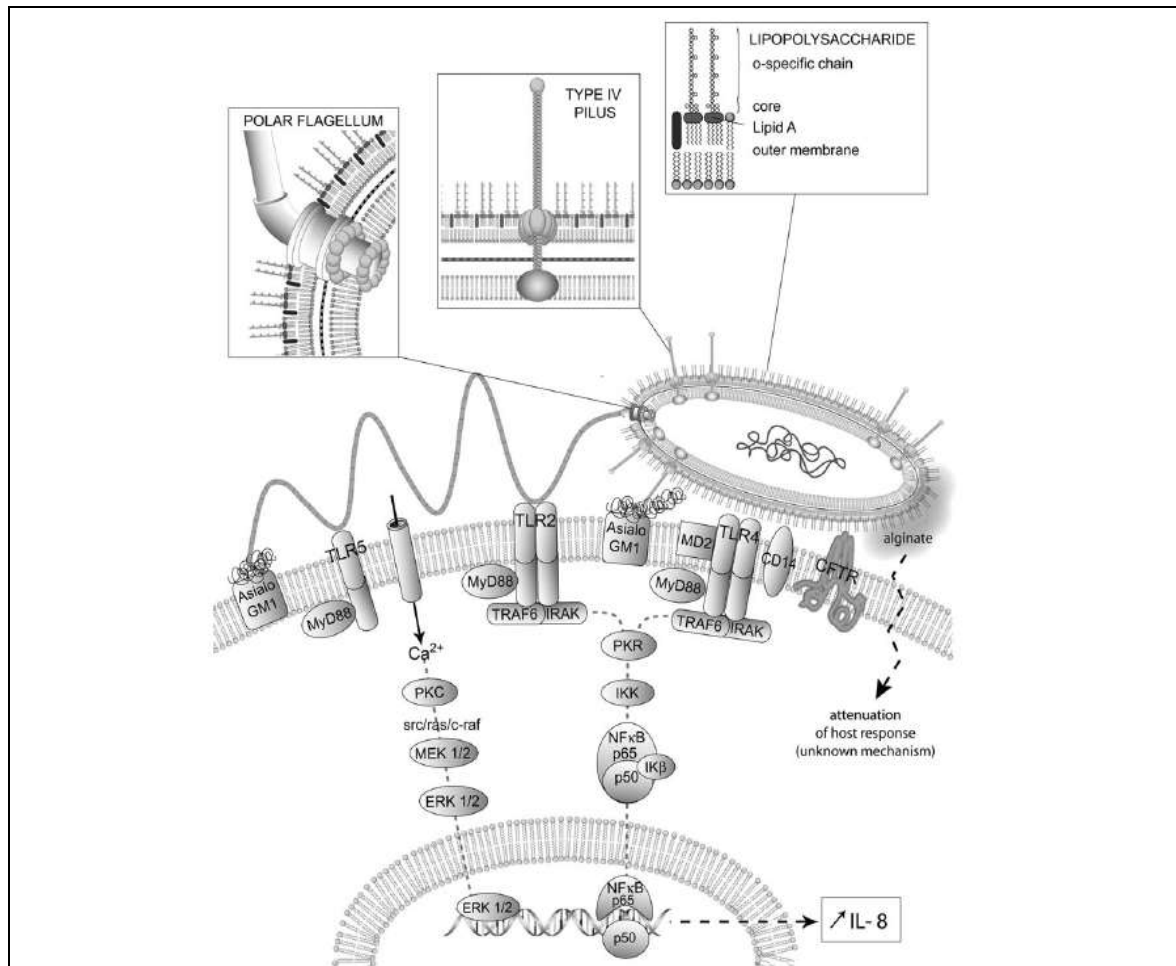


Fig. 1. Overview of *P. aeruginosa* cell-surface virulence factors.

Fig. 1. Schéma des facteurs de virulence de surface cellulaire de *P. aeruginosa*.

After reaching the respiratory epithelium through flagellum-dependent "swimming" and spreading along the epithelium through pili-dependent "twitching" *P. aeruginosa* is tethered to respiratory epithelial cells through binding of flagellum and pili to asialoGM1. Further adherence is conferred by interactions between LPS and asialoGM1, CD14 and/or CFTR. Flagellar interaction with TLR5 activates a Calcium entry-dependent MAP-kinase pathway leading to increased IL-8 transcription. Both flagellar interaction with TLR4 and LPS interaction with TLR4/MD2 activate MyD88-dependent NFκB pathways leading to increased IL-8 transcription. In cystic fibrosis patients, alginate increases adhesion and through an unknown mechanism depresses host response.

LPS: lipopolysaccharide, asialoGM1: asialoganglioside gangliotetraosylceramide, CD14: cluster of differentiation receptor 14, CFTR: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, TLR: toll-like receptor, MAP-kinase: mitogen-activated protein kinase, IL-8: interleukin 8, PKC: protein kinase C, c-ras: src/ras-dependent kinase, MEK1/2: dual specificity MAP kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase, ERK 1/2: dual specificity extracellular signal-regulated kinase, PKR: protein kinase regulated by RNA, IKK: I-kappa-B kinase, NFκB: nuclear factor kappa B, MyD88: myeloid differentiation primary response 88, TRAF6: tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, IRAK: IL-1 receptor-associated kinase.

Pili

Egalement impliqués dans la mobilité de la bactérie, ils lui permettent de se propager rapidement le long des voies respiratoires.⁹ Ils jouent eux aussi un rôle important dans l'adhésion de la bactérie à l'épithélium, par liaison à la mucine respiratoire ainsi qu'aux glycolipides asialoGM1 de la membrane cellulaire.^{10,11}

Sur le plan immunologique, ils induisent également le relargage d'IL-8 par activation d'une voie de signalisation cellulaire Src-Ras-ERK1/2-NF- κ B.¹²

LPS

Le LPS se lie également à l'asialo-GM1, ainsi qu'aux CD14 et aux canaux CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator). Par sa liaison aux récepteurs TLR4/MD2, le LPS provoque l'activation du NF κ B par la voie dépendante de MyD88, aboutissant à l'augmentation de la transcription d'IL-8.

Alginate

Exopolysaccharide mucoïde constitué d'une répétition de polymères d'acides mannuroniques et glucuroniques, l'alginate fonctionne également comme une adhésine, permettant à la bactérie de s'ancrer à l'épithélium respiratoire. Cet alginate est particulièrement abondant et épais chez les souches hyperproductrices retrouvées chez les patients atteints de mucoviscidose, par le biais de mutations du facteur anti-sigma *mucA*.^{13,14} Cet alginate isole également la bactérie des antibiotiques et de la réponse immunitaire de l'hôte.^{15,16}

1b- Facteurs de virulence sécrétés

Pyocyanine

P. aeruginosa sécrète des quantités importantes de cette phénazine. Responsable de la pigmentation bleutée de *P. aeruginosa*, la pyocyanine a de nombreux effets pathogènes : elle induit l'augmentation de production d'IL-8,^{17,18} diminue la réponse immunitaire,¹⁹⁻²¹ et induit l'apoptose des polynucléaires neutrophiles. Elle participe également aux dégâts provoqués à l'épithélium

respiratoire par le stress oxydatif, en oxydant le glutathion et en activant les catalases au niveau de l'épithélium respiratoire.

Pyoverdine

Il s'agit d'un sidérophore, mais qui joue également un rôle dans la virulence de la bactérie, en régulant la sécrétion d'autres facteurs de virulence, tels que l'exotoxine A et une endoprotéase.

Protéase alcaline

Il s'agit d'une fibrinolysine sécrétée par un système de sécrétion de type I. Son rôle a surtout été mis en évidence dans les infections de la cornée, mais elle pourrait également participer à la genèse des lésions respiratoires.²²

Protéase IV

Elle est impliquée dans la dégradation des protéines A, B et D du surfactant.²³

Elastase (lasB)

Métalloprotéase sécrétée par un système de sécrétion de type II, l'élastase induit des ruptures des jonctions serrées de l'épithélium respiratoire, provoquant ainsi une augmentation de la perméabilité épithéliale et la facilitation du recrutement des polynucléaires au siège de l'infection.²⁴⁻²⁶ L'élastase active la voie des MAP-kinases, responsable d'une augmentation de la synthèse d'IL-8.²⁷ Enfin, l'élastase diminue la réponse immunitaire en clivant les protéines A et D du surfactant et en inactivant le récepteur 2 protéinase-active.²⁸⁻³⁰ Néanmoins, le rôle de l'élastase dans la virulence reste hypothétique.

Phospholipase C

Cette phospholipase sécrétée par un système de sécrétion de type II joue un rôle dans l'inactivation du surfactant,²⁷ et est capable de supprimer le « burst » oxydatif des polynucléaires neutrophiles en réponse à l'infection.²⁸ Son substrat, la phosphatidylcholine, est abondant dans le surfactant pulmonaire. La présence de mutants sécrétant de grandes quantités de phospholipase C est généralement associée à un mauvais pronostic. Inversement, dans des modèles murins

d'infection pulmonaire, des mutants ne sécrétant pas de phospholipase ont une virulence atténuée.^{29,30}

Exotoxine A (ExoA)

ADP-ribosyl transférase sécrétée par un système de sécrétion de type II, l'exotoxine A inhibe la synthèse du facteur d'élongation 2 (EF-2) indispensable aux synthèses protéiques, provoquant ainsi la mort cellulaire.³¹ Elle joue également un rôle majeur dans la virulence, bien que moindre que celui joué par les effecteurs du système de sécrétion de type III tels qu'ExoS et ExoU.³²

Système de sécrétion de type III

Il s'agit d'un système permettant l'injection directe de toxines à l'intérieur des cellules de l'hôte, grâce à une structure ressemblant à une seringue qui forme un pore dans la membrane des cellules eucaryotes. Quatre toxines sont ainsi injectées dans la cellule hôte, de manières diverses selon les souches bactériennes : ExoY, ExoS, ExoT, et ExoU. Le système de sécrétion de type III est schématisé en **Figure 2**, p. 16.

ExoS : Cette cytotoxine comprend deux domaines actifs : un domaine C-terminal ADP-ribosyltransférase et un domaine N-terminal Rho GTPase-activating protein (GAP). Le rôle pathogène d'ExoS est essentiellement lié à l'activité ADP-ribosyltransférase qui aboutit à la désorganisation du cytosquelette.^{37,38} ExoS module également la réponse immunitaire en se liant aux TLR2 et TLR4.³⁹ ExoS est habituellement moins cytotoxique qu'ExoU.⁴⁰ La sécrétion de l'une exclue l'autre.

ExoT : ExoT ressemble à ExoS avec deux domaines actifs ADP-ribosyltransférase et GAP. ExoT a des effets similaires à ExoS sur le cytosquelette mais moindres, du fait de cibles différentes.

ExoY : ExoY est une adénylcyclase augmentant la production cytosolique d'AMPc, ce qui aboutit à une augmentation de la perméabilité endothéliale pulmonaire.³³

ExoU : ExoU est considérée comme la toxine majeure du système de sécrétion de type III. Elle possède une activité phospholipase/lysophospholipase aboutissant à la désorganisation de la membrane des cellules eucaryotes.³⁴⁻³⁶

2- Résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques : mécanismes en cause

Les derniers chiffres hexagonaux concernant la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques ont été publiés en 2007 par le GERPA (Groupe d'Etude de la Résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux Antibiotiques), mais s'appuient sur une enquête multicentrique menée en 2004.⁴⁵

Cette étude avait porté sur 450 souches, isolées chez des patients hospitalisés dans 15 établissements répartis sur le territoire, à partir des sites suivants : urines (31,6 %), crachats (20,2 %), peau et tissus mous (19,1 %), lavage broncho-alvéolaire (7,5 %), sang (3,5 %)...

Les pourcentages de sensibilité des souches aux différents antibiotiques testés sont rapportés dans le **tableau 1**.

Tableau 1 : Sensibilité de *P. aeruginosa* aux antibiotiques, lors d'une enquête menée dans 15 hôpitaux français en 2004. D'après Cavallo *et al.*⁴⁵

Antibiotique	Pourcentage de souches sensibles (%) (n = 450)
Ticarcilline	62
Ticarcilline – acide clavulanique	61
Pipéracilline	78
Pipéracilline – tazobactam	80
Ceftazidime	78
Céfépime	64
Imipénème	83
Amikacine	86
Tobramycine	80
Ciprofloxacine	68
Levofloxacine	57

Parmi les souches résistantes à la ticarcilline, les mécanismes en cause étaient : une β -lactamase acquise dans 17 % des cas, une surproduction de la céphalosporinase chromosomique AmpC dans 44,4 % des cas, et une surproduction du système d'efflux MexAB-OprM dans 22,3 % des cas. MexAB-OprM représentait la part la plus importante des résistances non-enzymatiques dans notre pays.

3- Mécanismes d'efflux

Présentation générale des systèmes d'efflux :

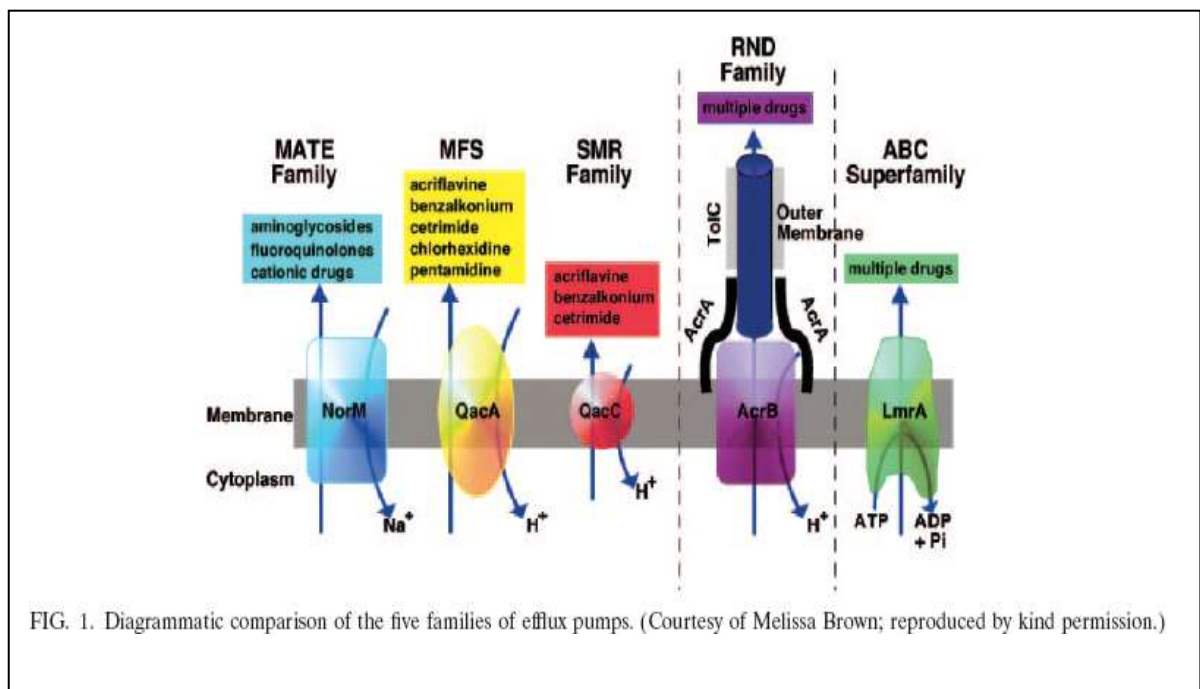
Les systèmes d'efflux sont ubiquitaires non seulement dans le monde bactérien, aussi bien chez les bactéries à Gram négatif que chez les bactéries à Gram positif,^{46,47} mais aussi universels quel que soit le type de cellule, procaryote ou eucaryote.⁴⁸ Ils sont regroupés en 5 super-familles, essentiellement sur la base d'homologies entre leurs séquences d'acides-amino (Figure 3, p. 19) : MFS (Major Facilitator Superfamily),⁴⁹ ABC (ATP-Binding Cassette),⁵⁰ RND (Resistance-Nodulation-Division),⁵¹ SMR (Small Multidrug Resistance),⁵² et MATE (Multidrug and Toxic compound Extrusion).⁵³

Les systèmes d'efflux de la famille RND sont constitués de pompes organisées en 3 parties (Figure 4, p. 20) : une protéine transporteuse située au niveau de la membrane interne, une protéine de liaison périplasmique, et une protéine-canal au niveau de la membrane externe (Outer Membrane Protein : OMP).⁵⁴ La protéine transporteuse capture son substrat soit au niveau de la bicouche phospholipidique de la membrane interne, soit au niveau du cytoplasme,⁵⁵ et le transporte vers le milieu extérieur par la protéine-canal de la membrane externe.⁵⁶

La pompe (protéine cytoplasmique) est une protéine à douze segments hydrophobes. L'énergie est amenée par le gradient électrochimique régnant de part et d'autre de la membrane cytoplasmique : à chaque fois qu'une molécule est exportée vers le milieu extérieur, elle est échangée contre un proton qui pénètre dans le cytoplasme,⁵⁷ selon le principe du fonctionnement des mécanismes

antiporteurs, ce qui a été démontré par l'utilisation du carbonyl cyanide m-chlorophényl hydrazone (CCCP) qui, en dépolarisant la membrane cytoplasmique, bloque l'efflux.⁵⁸ Les protéines de la membrane externe, quant à elles, ont une structure similaire à celle des porines, mais avec une inversion des boucles séparant les portions transmembranaires, qui sont ici périplasmiques, contrairement à celles des porines ; ce qui confère à leur canal interne une orientation vers le milieu extérieur.

Figure 3 : Représentation schématique des 5 super-familles de pompes d'efflux. D'après Piddock *et al.*⁴⁸

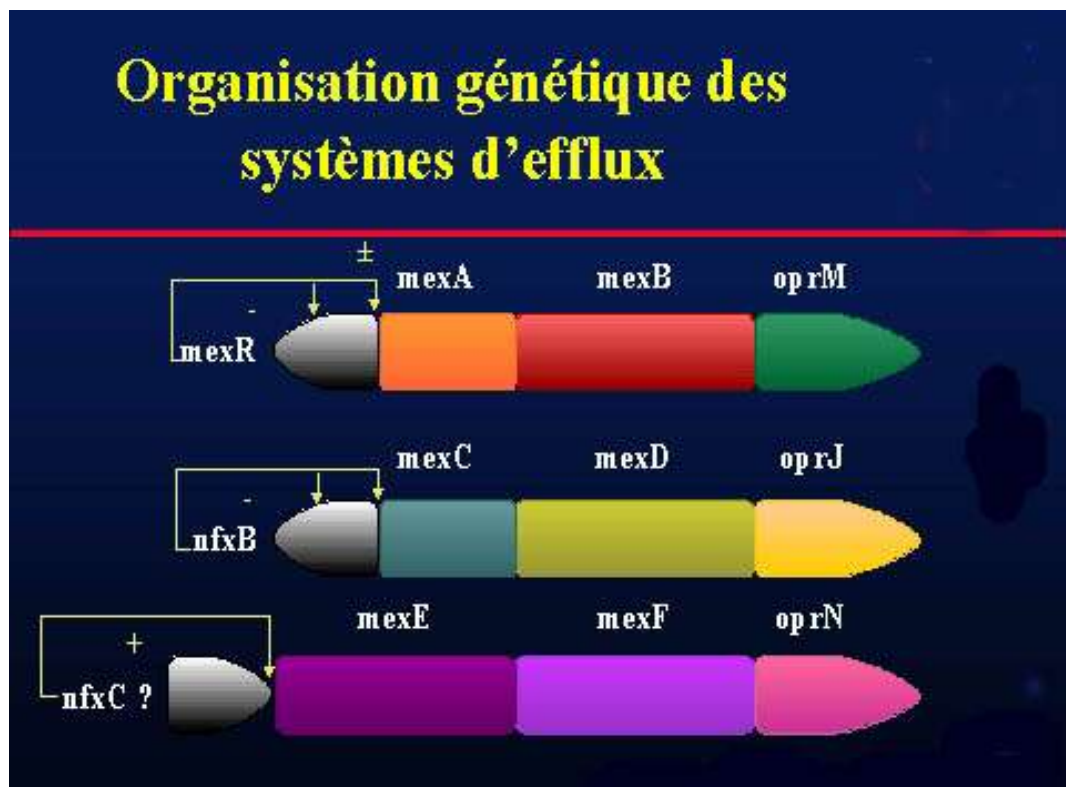


souches isolées chez des patients ne souffrant pas de mucoviscidose, où MexAB-OprM concernait 46 % des isolats et MexXY 58 %.⁶¹

Organisation génétique des systèmes d'efflux

Les gènes qui codent pour ces protéines sont organisés en opérons. Les différents systèmes d'efflux sont codés par des opérons distincts, situés à des endroits différents sur le chromosome bactérien. Cependant, ils ont une organisation similaire, dans laquelle les gènes de structure de chacun de ces systèmes se trouvent sous le contrôle d'un gène répresseur. Le gène régulateur est adjacent au gène codant pour la protéine périplasmique, lui-même adjacent à celui codant pour la protéine transporteuse, lui-même adjacent au gène codant pour la protéine-canal (**Figure 5**).

Figure 5 : Organisation génétique schématique des systèmes d'efflux chez *P. aeruginosa* (d'après S. Tigaud).



Si l'on considère l'opéron *mexAB-oprM*, le plus fréquemment impliqué en pratique clinique dans la survenue de résistances par efflux, et le plus étudié à ce jour, son contrôle négatif est assuré par le gène *mexR*, un gène de 441 paires de

bases, situé à 274 paires de bases en amont de l'opéron, orienté en sens opposé, codant pour une protéine MexR appartenant à la famille des protéines de régulation MarR.⁶² Cette protéine MexR va se fixer dans la région intergénique *mexA-mexR*, en amont des promoteurs de *mexR* (25 paires de bases en amont) et de *mexA*, sur des sites spécifiques caractérisés par la présence de séquences inversées répétées GTTGA. Or, le gène *mexA* possède en fait deux promoteurs : P2_{mexA}, sur lequel MexR peut se fixer, mais aussi P1_{mexA} qui, lui, est dépourvu de site de fixation pour la protéine MexR. Ainsi, P1_{mexA} est responsable de l'expression constitutionnelle de *mexAB-oprM*, à un faible niveau, chez les souches sauvages.⁶³ Les mutations entraînant l'inactivation de *mexR* sont responsables de la surexpression de l'opéron. Le niveau d'expression est variable selon le site de la mutation : ainsi, les mutations survenant sur l'extrémité 5' du gène sont responsables d'une augmentation limitée de cette expression, contrairement à celles de l'extrémité 3'. Le niveau de transcription de l'opéron peut ainsi être de deux à sept fois plus élevé que chez les souches sauvages.⁵⁸ Certains auteurs ont suggéré que l'extrémité 5' de *mexR* était indispensable au bon fonctionnement des promoteurs de *mexA-mexB-oprM*.⁶⁴

De nombreuses mutations (insertions, délétions, substitutions) ont été recensées au sein de *mexR*.⁶⁵ Cependant, près de la moitié des souches surexprimant *mexAB-oprM* ne présentent pas de mutation dans le gène répresseur, mais au niveau de deux autres loci régulateurs : *nalC*,^{66,67} et *nalD*.^{66,68}

L'expression de ces différents systèmes fait probablement l'objet d'une régulation globale. En effet, ils dépendent les uns des autres : la disparition ou la diminution de l'expression de MexA-MexB-OprM, par rapport à son niveau d'expression basal, entraîne l'expression des systèmes MexC-MexD-OprJ et MexE-MexF-OprN ; ce qui suggère que la cellule est capable de moduler l'expression des différents systèmes d'efflux, en compensant les défaillances éventuelles du système principal par la mise en fonction des autres. D'ailleurs, la régulation négative de MexAB-OprM par MexT, la protéine activatrice de MexEF-OprN, est un élément tendant à prouver l'existence de cette régulation globale.⁶⁹

Il semble évident que ce dispositif de régulation intégrée des différents systèmes d'efflux existe. Par ailleurs ceux-ci jouent probablement un rôle

primordial dans la physiologie bactérienne, indépendamment de la résistance aux antibiotiques.

Rôles naturels des systèmes d'efflux

Les systèmes d'efflux jouent manifestement un rôle majeur dans l'adaptation des bactéries à un environnement hostile, comme l'atteste le large éventail de substances rejetées vers le milieu extérieur, et dont les antibiotiques ne constituent qu'une partie.⁷⁰ Ainsi il a été montré que la délétion de certaines pompes à efflux a un effet délétère sur les capacités de colonisation et de virulence des bactéries⁷¹ : la délétion de MexAB-OprM supprime la capacité de *P. aeruginosa* à pénétrer les épithélia, capacité qui est restaurée par la recomplémentation du système. Le même effet de restauration était obtenu grâce à la supplémentation des souches délétées avec le surnageant d'une culture de *P. aeruginosa* sauvage, attestant de la capacité de MexAB-OprM à exporter des facteurs de virulence. Mais le rôle naturel de ces systèmes d'efflux reste en grande partie méconnu. La présence de 11 opérons codant pour des systèmes d'efflux sur le génome de *P. aeruginosa* prouve que la fonction première de ces systèmes n'est pas la résistance aux antibiotiques. Par exemple, des analyses du transcriptome de la bactérie après 12 heures d'interaction avec des cellules épithéliales respiratoires, en l'absence d'antibiotiques, ont révélé une augmentation substantielle, de 10 à 15 fois, du niveau d'expression à la fois de *mexEF-OprN* et PA2491, de manière parallèle avec l'accentuation des dégâts cellulaires.⁷² Les cellules épithéliales généreraient des substances qui sont des substrats pour MexEF-OprN et PA2491 : ces substances pourraient être des nutriments pour la bactérie, ou générer une réponse, de stress par exemple, de la part de celle-ci.

Quelle que soit l'explication, ces résultats suggèrent que *P. aeruginosa* rencontre *in vivo* des conditions où MexEF-OprN est nécessaire, en-dehors de toute pression antibiotique. De même, dans un modèle de pneumonie chez le rat, en l'absence de pression antibiotique, des mutants surexprimant MexEF-OprN sont retrouvés spontanément, suggérant un avantage *in vivo* chez ces mutants, indépendamment de l'exportation d'antibiotiques.⁷³

Enfin, l'inactivation du régulateur de quorum-sensing et de virulence VsqR compromet l'expression de MexEF-OprN lorsque les bactéries sont soumises à un stress oxydatif, suggérant une implication de ce système dans la réponse à ce stress.⁷⁴ Ceci est accrédité par la découverte récente que deux résidus cystéine présents sur la protéine mexR forment des ponts disulfures à l'état de base et permettent sa fixation sur l'ADN du gène promoteur et donc sa répression. Par contre, ces ponts disulfures sont brisés par les stress oxydatifs, empêchant alors la fixation de la protéine MexR sur le promoteur, ce qui conduit à la dérégulation de l'opéron *mexAB-oprM*.⁷⁵

Il a été également montré un impact négatif de MexEF-OprN sur le système de sécrétion de type III,⁷⁶ soit par une action sur le métabolisme cellulaire soit par le biais de l'exportation de molécules de signalisation intracellulaire.⁷⁷ Les mêmes rapports ont été montrés entre MexCD-OprJ et le système de sécrétion de type III.⁷⁷

Mise en évidence en pratique clinique des systèmes d'efflux

Le phénotype typique des mutants « efflux » apparaît comme l'expression d'une sensibilité diminuée ou d'une résistance à au moins trois classes différentes d'antibiotiques, désinfectants ou détergents : ce qui inclut en général une quinolone (acide nalidixique, ciprofloxacine, norfloxacine), les tétracyclines, le chloramphénicol, le bromure d'éthidium, l'acriflavine, le sodium dodecyl sulfate, le Triton X-100 et le triclosan, avec des différences propres à chaque pompe (**Tableau 2**, p. 25). Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) de ces substrats sont augmentées d'un facteur 2 à 8 par rapport aux souches isogéniques « mères ». Cette augmentation est certes modérée, comparée aux autres mécanismes bactériens de résistance aux antibiotiques (résistance enzymatique notamment), mais agit en synergie avec la faible perméabilité constitutionnelle des porines de *P. aeruginosa* ainsi qu'avec les autres mécanismes de résistance constitutionnels ou acquis de la bactérie.

Tableau 2 : Principaux substrats antibiotiques des systèmes d'efflux chez *P. aeruginosa*.

Systèmes d'efflux	Principaux antibiotiques concernés
MexAB-OprM	β -lactamines, fluoroquinolones
MexCD-OprJ	β -lactamines zwitterioniques (céfépime, cefpirome), fluoroquinolones, triméthoprim, chloramphénicol, tétracyclines, érythromycine
MexEF-OprN	fluoroquinolones, chloramphénicol, triméthoprim, tétracyclines, triclosan
MexHI-OprD	bromure d'éthidium, norfloxacin, acriflavine
MexJK-OprM	ciprofloxacine, tétracyclines, érythromycine, triclosan
MexVW-OprM	fluoroquinolones, chloramphenicol, tétracyclines, érythromycine, bromure d'éthidium, acriflavine
MexXY-OprM	aminosides, tigécycline, céfépime, cefpirome

Mise en évidence de la surexpression du système MexAB-OprM

MexAB-OprM est le plus important en termes de répercussion thérapeutique. Son organisation moléculaire est très proche de la pompe AcrAB-TolC d'*Escherichia coli*, avec 71 % de similarité entre MexA et AcrA, 89 % entre MexB et AcrB, et 35 % entre OprM et TolC.⁷⁸ L'éventail des substrats concernés par ce système est large, concernant certes des antibiotiques très divers (quinolones, macrolides, tétracyclines, lincomycine, chloramphénicol, novobiocine et les β -lactamines à l'exception de l'imipénème),⁷⁹⁻⁸³ mais aussi des détergents,⁸³⁻⁸⁵ des solvants organiques,⁸³ des désinfectants,⁸⁶ et les homosérine-lactones impliquées dans le quorum-sensing.^{87,88} Dans un certain nombre de cas, l'analyse phénotypique peut aisément faire suspecter ce mécanisme : à la lecture

de l'antibiogramme, les souches concernées ont une sensibilité diminuée ou une résistance à la ticarcilline et l'aztréonam, alors que la pipéracilline et la ceftazidime ont une activité bactériostatique conservée.⁸⁹ L'activité de la ceftazidime reste supérieure à celle de l'aztréonam, ce qui permet de faire la différence avec le phénotype de surexpression de la céphalosporinase. Mais ce cas de figure est finalement peu fréquent, en situation clinique, où la pression de sélection exercée par les antibiotiques aboutit au cumul des mécanismes de résistance. L'analyse précise de ces mécanismes a longtemps reposé sur les techniques de western-blot⁹⁰ et de northern-blot⁹¹ analysant essentiellement l'expression des protéines de la membrane externe (OprM dans le cas de MexAB-OprM). Plus récemment, des approches combinées, associant une détection phénotypique (étude de la sensibilité à la carbénicilline en présence et en l'absence d'un inhibiteur de pompe à efflux, le Phe-Arg- β -naphtylamide) suivie d'une confirmation par RT-PCR, ont été développées.⁹²

Les phénotypes de résistance conférés par la perte de la porine OprD2 et la surexpression des principaux systèmes d'efflux chez *P. aeruginosa* sont résumés dans le **Tableau 3**.

Tableau 3 : Conséquence de la perte de la porine OprD et de la surexpression d'un système d'efflux sur la sensibilité aux β -lactamines de *P. aeruginosa*.

Mécanisme	TIC	PIP	CAZ	FEP	ATM	IMP	MEM
Sensible	S	S	S	S	S	S	S
Perte d' OprD2	S	S	S	S	S	R	I/R
MexAB-OprM	I/R	S	S	S	I/R	S	S/I
MexCD-OprJ	S	S	S	I/R	S	S	S
MexEF-OprN	S	S	S	S	S	I	I
MexXY-OprM	S	S	S	I/R	S	S	S

TIC : ticarcilline ; PIP : pipéracilline ; CAZ : ceftazidime ; FEP : céfépime ;

ATM : aztréonam ; IMP : imipénème ; MEM : méropénème.

I : intermédiaire ; R : résistant ; S : sensible.

Impact de MexAB-OprM sur les traitements des infections à *P. aeruginosa*

L'efflux seul entraîne une augmentation modérée des CMI pour les antibiotiques concernés, de l'ordre de 2 à 8 fois.⁹³ Cela peut suffire à mettre en échec les antibiotiques concernés, notamment dans les situations cliniques les plus difficiles. Il s'agit d'un mécanisme non sélectif : pour ce qui concerne par exemple MexAB-OprM, à la fois les bêta-lactamines et les fluoroquinolones vont être affectées, même en l'absence d'exposition préalable à l'une ou l'autre de ces classes. L'efflux rentre en synergie avec d'autres mécanismes de résistance, comme les mutations de cibles et les mécanismes enzymatiques, pour conférer de hauts niveaux de résistance à la bactérie.⁹⁴⁻⁹⁶ Enfin, les faibles concentrations intrabactériennes des antibiotiques qui subissent l'efflux favorisent l'émergence de mutations de cibles.⁹⁷

Le traitement des infections à *P. aeruginosa* repose habituellement sur des associations - en pratique combinant β -lactamines, fluoroquinolones et aminosides – sensées agir en synergie et prévenir l'émergence de mutants résistants.

Les fluoroquinolones jouent un rôle particulier pour plusieurs raisons. D'une part, cette classe d'antibiotiques constitue un substrat commun à l'ensemble des systèmes d'efflux de *P. aeruginosa*.⁹⁸ Par ailleurs, la sélection de mutants surexprimant les mécanismes d'efflux par les fluoroquinolones, notamment en cas d'utilisation en monothérapie, a été mise en évidence à plusieurs reprises.⁹⁹⁻¹⁰³ On estime ainsi que 60 à 70 % des souches concernées apparaissent après une exposition à cette classe d'antibiotiques, comme l'a montré une étude avec inhibiteur de pompe portant sur 119 souches isolées chez des patients ne souffrant pas de mucoviscidose, où l'efflux était présent chez 61 % des souches résistantes aux fluoroquinolones contre 9 % seulement chez les souches sensibles.¹⁰⁴

Toutes les bêta-lactamines sont affectées par la surexpression de MexAB-OprM, mais pas toutes au même niveau. L'étude des CMI permet de constater que les plus touchées sont la ticarcilline et l'aztreonam pour lesquels la bactérie

devient intermédiaire ou résistante, tandis qu'elle reste sensible, en l'absence de l'acquisition d'autres mécanismes de résistance, à la pipéracilline et la ceftazidime.⁸² Parmi les carbapénèmes, l'imipénème n'est pas affecté par l'efflux MexAB-OprM,^{102,105} alors qu'il est affecté par le phénomène de corégulation aboutissant à l'association fréquente d'un efflux MexEF-OprN et de la perte d'OprD.¹⁰⁶ Le méropénème, quant à lui, voit ses CMI passer de 0,125-0,5 en l'absence d'efflux et de mutation d'OprD, à 2-4 mg/L en cas de surexpression isolée de MexAB-OprM.^{107,108} Cette différence est attribuée à la présence d'une chaîne latérale hétérocyclique hydrophobe sur le méropénème permettant sa captation, alors qu'elle est absente sur l'imipénème.¹⁰⁹ Le doripénème, qui est dérivé du méropénème, est, pour les mêmes raisons, également concerné par MexAB-OprM.¹¹⁰

On ne dispose pas de travaux étudiant directement l'impact de ces mécanismes sur les thérapeutiques antibiotiques, carbapénèmes ou autres, *in vivo*. Même s'il apparaît évident que les antibiotiques les plus touchés tels que la ticarcilline, l'aztreonam, ont un risque très élevé d'être inactifs en clinique sur ces souches, qu'en est-il des substances moins touchées, telles que la pipéracilline et la ceftazidime ? De même, quel est l'impact comparé de ces mécanismes sur les différents carbapénèmes en situation clinique ?

Pourtant, une étude à large échelle menée sur 15 hôpitaux français, a montré que sur 170 isolats de *P. aeruginosa* résistant à la ticarcilline, 46 % surexprimaient MexAB-OprM, 58 % MexXY-OprM, et 28 % les deux systèmes d'efflux à la fois.⁶¹

Impact de MexAB-OprM sur la virulence bactérienne

Plusieurs travaux ont démontré les liens existant entre MexAB-OprM et la virulence chez *P. aeruginosa*. En 1998, sur des mutants dérivés de PAO1, Evans *et al* avaient montré que les mutants *nalB* produisaient significativement moins de pyocyanine et d'élastase, et que la suppression de la pompe MexAB-OprM ramenait la production de ces deux facteurs de virulence quasiment au même niveau que celui de la souche PAO1 sauvage.⁸⁷ De même, en 2002, Hirakata *et al* ont montré que les mutants surexprimant MexAB-OprM avaient un potentiel

d'invasion à travers un épithélium de cellules MDCK (Madin-Darby canine kidney) significativement diminué par rapport à la souche PAO1 d'origine, et que cela se traduisait également par une mortalité moindre des souris infectées avec ces mutants.⁷¹ Ces données furent confirmées dans d'autres travaux réalisés également sur des souches de laboratoire, sur un modèle d'infection du nématode *Caenorhabditis elegans*.¹¹¹

Rappels sur le quorum sensing chez *Pseudomonas aeruginosa*

Les facteurs de virulence chez *P. aeruginosa*, ainsi que la synthèse du biofilm, sont exprimés de manière variable, en fonction des conditions environnementales et métaboliques. La régulation de la plupart de ces facteurs de virulence est basée sur les systèmes de signalisation intercellulaire dépendant de la densité bactérienne, appelés quorum-sensing.^{112,113} La plupart des fonctions contrôlées par le quorum sensing sont rappelées dans le **Tableau 4**, p. 32.

Ces systèmes répondent à des molécules signaux de natures chimiques différentes, N-acyl-homosérine-lactones (de nature similaire à celles initialement décrites chez *Vibrio fischeri*¹¹⁴) et 4-quinolones. Les circuits dépendant des homosérine-lactones (HSL) sont le système *las*, qui consiste en l'activateur transcriptionnel LasR (homologue de LuxR) et l'HSL-synthétase LasI, qui dirigent la synthèse de la 3-oxo-C12-HSL, et le système *rhl*, qui comprend l'activateur transcriptionnel RhIR et l'HSL-synthétase RhII qui dirigent la synthèse de la C4-HSL.

Le système basé sur les 4-quinolones (PQS) est quant à lui intercalé entre les systèmes Las et Rhl,¹¹⁵⁻¹¹⁷ en modulant l'expression de *rhlRI* et *lasRI*.^{115,117}

Les **Figures 6 et 7**, p. 31, représentent l'organisation schématique de ces trois systèmes de quorum-sensing.

Le système *las* exerce une boucle de régulation positive sur lui-même, via la régulation de *lasI*. Certains gènes régulés par le quorum-sensing sont dépendants des 2 systèmes, tandis que d'autres sont sous la dépendance spécifique de l'un ou l'autre système. Cependant les 2 systèmes n'opèrent pas de manière indépendante l'un de l'autre : il existe une hiérarchie entre les systèmes,

Las contrôlant le système Rhl.¹¹⁸ Néanmoins, le système Rhl peut-être mis en action indépendamment de Las, via le système PQS.¹¹⁷

Un troisième homologue de LuxR, QscR, module le timing de l'expression des gènes sous contrôle du quorum-sensing, en réprimant la transcription de *lasI*.¹¹⁹ Enfin, un quatrième homologue de LuxR, VqsR, est impliqué dans la régulation de l'expression de certains gènes sous contrôle du quorum-sensing.⁷⁴

Un certain nombre de régulateurs globaux exercent également un contrôle, positif ou négatif en fonction des molécules, sur ces systèmes : Vfr,¹²⁰ GacA-GacS,¹²¹ RsaL,¹²² MvaT,¹²³ RsmA,¹²⁴ DksA,¹²⁵ RpoS et RpoN. Cette régulation globale est schématisée **Figure 6**, p. 31.

Ces facteurs de régulation globale peuvent être des systèmes à deux composants comme GacA-GacS, ou des facteurs sigma comme RpoS (σ^{38}), RpoN, AlgT, PsrA. Ce sont des facteurs majeurs de l'adaptation de la bactérie à l'environnement, coordonnant l'expression de très grands nombres de gènes à la hausse ou à la baisse en réponse aux variations environnementales : milieux pauvres en nutriments, stress osmotique, stress acide, stress oxydatif, stress thermique.^{126,127} Par exemple le facteur VqsM va influencer l'expression de 302 gènes, dont la promotion de 203 parmi lesquels la moitié sont régulés à la hausse par le quorum-sensing.¹²⁸

Etant donné que 9 % du génome de *P. aeruginosa* est constitué de gènes régulateurs connus ou supposés, il est probable que de nombreux autres facteurs interviennent également dans la régulation de ces systèmes de quorum-sensing.¹²⁹

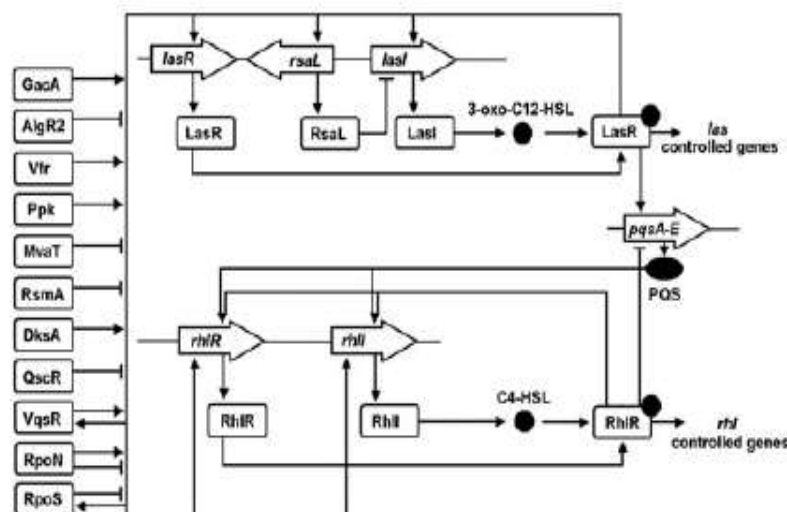


Fig. 2. The quorum sensing network in *P. aeruginosa*. The two hierarchically arranged *las* and *rhl* quorum sensing circuits are subject to modulation by a number of additional regulators, which finetune the quorum sensing response of the organism (activation, $\rightarrow$; inhibition $\dashv$).

© 2005 Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd, *Environmental Microbiology*, 7, 459–471

Tableau 4 : Rappel des fonctions contrôlées par les différents systèmes de quorum-sensing. (D'après ¹³¹).

Contrôle par <i>las</i>	Contrôle par <i>rhl</i>	Contrôle par PQS
Synthèse du PQS	Synthèse du PQS	Système <i>rhl</i>
Système <i>rhl</i>	Rhamnolipides	Rhamnolipides
Formation du biofilm		Formation du biofilm
Protéase alcaline	Protéase alcaline	
Elastase	Elastase	Elastase
	Pyocyanine	Pyocyanine
Lipase	Lipase	
	Lectines A et B	Lectines A et B
Hydrogène cyanide	Hydrogène cyanide	
Sécrétion Xcp	Sécrétion Xcp	
	Chitinase	
	RpoS	
Exotoxine A		
Neuraminidase		

Endoprotéase régulée	Pvds-
Catalase	
Superoxide dismutase	
Aminopeptidase	
Swimming	
	Exoenzyme S
Swarming	Swarming
Twitching	Twitiching

MexAB-OprM et quorum-sensing

Dans le travail de Evans *et al*, les mutants MexAB-OprM produisaient également significativement moins de N-(3-oxododecanoyl) homosérine lactone (3OC12-HSL, anciennement appelé PAI-1), un des deux principaux activateurs transcriptionnels du quorum-sensing, alors qu'aucune différence n'était constatée pour la N-butyryl homosérine lactone (C4-HSL, anciennement appelée PAI-2), l'autre principal activateur transcriptionnel. Ceci suggérait que le C12-HSL, et pas le C4-HSL, est un substrat de MexAB-OprM. L'efflux du C12-HSL empêcherait son accumulation intracellulaire, et donc son rôle d'activateur des gènes codant pour les facteurs de virulence.⁸⁷

Les rapports entre MexAB-OprM et les auto-inducteurs du quorum-sensing ont été précisés par Pearson *et al* en 1999.⁸⁸ Dans ce travail utilisant des homosérine lactones radiomarquées ($[^3\text{H}]3\text{OC}_{12}\text{-HSL}$ et $[^3\text{H}]4\text{-HSL}$), les auteurs avaient exploré les mécanismes de transport actif et d'efflux éventuels pour les deux molécules. Spontanément, l'équilibre entre le milieu intracellulaire et le milieu extracellulaire était atteint en 4 minutes pour le $[^3\text{H}]3\text{OC}_{12}\text{-HSL}$, contre seulement 30 secondes pour le $[^3\text{H}]4\text{-HSL}$ (c'est-à-dire le temps nécessaire pour obtenir l'équilibre avec l'éthylène-glycol marqué, molécule de référence diffusant librement entre les deux compartiments extra- et intracellulaire). L'utilisation du sodium azide (inhibiteur du transport actif) augmentait les taux intracellulaires d'un facteur

10 pour le [^3H]3OC₁₂-HSL, alors que cela ne modifiait pas les concentrations intracellulaires de [^3H]C₄-HSL. Enfin, l'emploi d'un inhibiteur de pompe à efflux, le carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) entraînait une augmentation des taux intracellulaires de [^3H]3OC₁₂-HSL en comparaison avec les cellules non exposées à ce poison et avec les cellules délétées pour MexAB-OprM, sans là encore modifier quoi que ce soit pour le [^3H]C₄-HSL. Ces expériences ont prouvé que le C12-HSL, et non le C4-HSL, faisait l'objet d'un transport actif vers le milieu intracellulaire d'une part, et d'autre part d'un efflux actif vers le milieu extracellulaire par MexAB-OprM.

Dans le travail d'Hirakata *et al*, le potentiel invasif des mutants MexAB-OprM était restauré par l'ajout du surnageant obtenu par la culture des bactéries wild-type obtenue en présence des epithelia cellulaires, tandis que l'ajout du surnageant n'avait qu'une action modeste sur les mutants délétés pour MexAB-OprM, suggérant un rôle majeur de MexAB-OprM par rapport aux autres pompes dans l'efflux des déterminants pour le potentiel invasif de la bactérie.⁷¹

Par ailleurs, Maseda *et al*, en 2004, ont déterminé que le niveau d'expression de MexAB-OprM augmente en phase stationnaire, suggérant une régulation dépendante de la densité bactérienne. De fait l'addition de C4-HSL augmentait l'expression de MexAB-OprM, alors que l'ajout de C12-HSL ne modifiait pas ce niveau d'expression.⁶⁹

Néanmoins, en 2006, Kondo *et al* montrèrent une diminution du potentiel invasif, sur un épithélium cellulaire MDCK, de mutants $\Delta lasI$ et $\Delta rhII$ délétés pour les systèmes de quorum-sensing Las et Rhl, ainsi que pour les mutants ΔABM délétés pour MexAB-OprM, par rapport à une souche sauvage PAO1. L'ajout de C12-HSL ou de C4-HSL ne modifiait pas le potentiel invasif des bactéries sauvages et ΔABM à 3 ou à 6 heures, et seul l'ajout de C4-HSL restaurait partiellement le potentiel invasif des mutants $\Delta rhII$. Les auteurs ne retrouvaient donc qu'un rôle partiel des systèmes de quorum-sensing dans le potentiel invasif des bactéries.¹³²

Ces résultats en apparence contradictoire s'expliquent néanmoins par le fait que le quorum-sensing est un système de régulation dépendant de la densité bactérienne, et qui intervient après la fin de la phase exponentielle de croissance,

pour réguler la production d'un certain nombre de déterminants de la virulence. Le potentiel invasif de la bactérie est quant à lui essentiellement dépendant du système de sécrétion de type III (SSTT) de *P. aeruginosa*, qui est lui déterminant surtout à la phase aiguë de l'infection, en phase exponentielle de croissance.

Linares *et al*, en 2005, ont montré que MexCD-OprJ et MexEF-OprN diminuent l'expression du SSTT, et pas MexAB-OprM et MexXY-OprM. Cette modulation intervient par une diminution de production de la protéine activatrice du SSTT ExsA, elle-même sensible à des facteurs environnementaux, d'où l'hypothèse que cette interaction se ferait par le biais d'un rejet vers le milieu extérieur par les systèmes d'efflux d'activateurs environnementaux du gène *exsA*.⁷⁷

Pour résumer, il ressort de ces travaux que l'expression de MexAB-OprM est modulée par l'auto-inducteur C4-HSL, et MexAB-OprM diminue l'action de C12-HSL en rejetant cette molécule vers le milieu extracellulaire. Cette relation intervient essentiellement une fois la phase de croissance exponentielle terminée, là où le quorum-sensing prend toute son importance.

4- Apports des modèles expérimentaux animaux

Dans notre travail, plusieurs modèles d'infection expérimentale chez l'animal ont été utilisés : un modèle d'endocardite expérimentale chez le lapin, et des modèles murins de pneumonie aiguë et chronique. Ces différents modèles présentent des avantages et des inconvénients variables, détaillés ci-après, et se sont avérés complémentaires dans notre démarche qui a porté sur l'influence de MexAB-OprM à la fois sur la thérapeutique antibiotique et sur la virulence.

4a- Modèle d'endocardite bactérienne du lapin

Le modèle d'endocardite du lapin est celui décrit en 1970, par Garrison et Freedman,¹³³ modifié ensuite par Durack et Beeson en 1972,¹³⁴ puis Sande et Irwin en 1974.¹³⁵

Avantages du modèle

Les lapins infectés développent des manifestations cliniques et biologiques très proches de celles observées chez les humains. Le paramètre le plus important pour l'évaluation de ce modèle est le compte de bactéries formant unités (CFU) rapporté au poids de la végétation en grammes.

Ce modèle est extrêmement utile pour l'évaluation *in vivo* de l'efficacité des antibiotiques. Le modèle de lapin permet d'étudier différentes voies d'administration, et de moduler les doses, intervalles entre les doses, durées d'administration, en fonction des paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques (PK/PD) des antibiotiques étudiés.

La simulation des pharmacocinétiques humaines chez le lapin a considérablement amélioré la significativité des résultats obtenus pour leur extrapolation à l'homme.¹³⁶

Enfin, d'un point de vue immunologique, la végétation constitue un milieu protecteur pour la bactérie vis-à-vis des défenses de l'hôte.¹³⁷ Malgré une multiplication bactérienne rapide *in situ*, les études histologiques ont montré l'absence quasi-complète de cellules de la phagocytose dans la végétation, au moins aux stades précoces de l'infection.

Inconvénients du modèle

Des différences notables existent avec l'endocardite observée chez l'être humain. Tout d'abord, le traumatisme valvulaire induit par un cathéter en polyéthylène est très différent des conditions qui prédisposent l'être humain à la survenue d'une endocardite. Ce cathéter est laissé en place dans le cœur jusqu'à ce que l'animal soit euthanasié, ce qui rapproche plutôt ce modèle d'une infection sur valves prothétiques.

D'autre part, l'inoculum bactérien injecté par voie intraveineuse est considérablement plus important que les bactériémies amenant à la genèse de l'endocardite chez l'être humain.

De même, les titres de bactéries dans les végétations peuvent atteindre des niveaux extrêmement élevés, pouvant excéder 10^8 UFC par gramme de végétation, ce qui peut engendrer une baisse de l'activité de l'antibiotique en rapport avec l'effet inoculum.

L'activité des bactéries au cœur de la végétation est réduite par rapport à celle de bactéries plus périphériques, pouvant également expliquer une baisse de l'activité des antibiotiques étudiés.¹³⁸

Enfin, la diffusion des antibiotiques au sein des végétations n'est pas homogène, avec un gradient décroissant de la périphérie vers le centre, avec des variations constatées en fonction des antibiotiques.¹³⁹

Au total, le modèle d'endocardite du lapin est un modèle d'infection sévère, extrêmement exigeant pour l'antibiotique étudié du fait des conditions physicochimiques de la végétation. Il permet d'apprécier l'efficacité d'un antibiotique dans les conditions les plus sévères d'infection, sans interférence quasiment de la part du système immunitaire de l'hôte.

4b- Modèles murins de pneumonie

Les modèles murins de pneumonie sont largement utilisés, avec de nombreuses variations selon les bactéries étudiées, le mode d'inoculation, la durée d'infection et les artifices employés pour obtenir la persistance de cette infection.

Avantages du modèle

La taille de l'animal permet l'obtention rapide, et relativement peu onéreuse, de cohortes génétiquement semblables.

Des études de mortalité sont facilement réalisables sur des cohortes suffisamment importantes d'animaux.

Plusieurs paramètres d'agression pulmonaire peuvent être étudiés, y compris chez le même animal :

- La réponse inflammatoire à l'infection : par l'étude de la cellularité du lavage broncho-alvéolaire ou par l'anatomopathologie, ainsi que par l'analyse des cytokines et autres protéines de l'inflammation présentes soit dans le lavage soit dans le parenchyme pulmonaire.
- La charge bactérienne par gramme de tissu pulmonaire, et sa persistance au fil du temps.
- Les mouvements liquidiens entre le milieu endothélial et le milieu alvéolaire, évalués par la mesure du rapport wet-to-dry pulmonaire, ainsi que par les mesures de perméabilité endothéliale pratiquées à l'aide de protéines marquées (en général albumine marquée par un isotope).

Inconvénients du modèle

Le principal inconvénient, lié à la taille de l'animal, est l'impossibilité de simuler des administrations de thérapeutiques proches des paramètres PK/PD obtenus chez l'homme. Ce modèle ne peut donc être utilisé en thérapeutique que pour des interprétations grossières et préliminaires.

Au total, les modèles murins d'infection pulmonaire permettent l'obtention de cohortes suffisamment importantes pour analyser les variations induites par la modification d'un facteur sur la mortalité et les lésions pulmonaires induites. L'existence de modèles aigus et chroniques d'infection permet également l'analyse de l'influence d'un facteur donné au cours du temps. Ces modèles sont donc particulièrement bien adaptés à l'étude de la virulence, alors qu'ils ne conviennent que mal aux études de thérapeutique.

III- TRAVAUX PERSONNELS

PLAN D'ETUDE

Le but de cette thèse a été d'explorer les conséquences, pour la pratique clinique, de la surexpression du système d'efflux MexAB-OprM, d'une part sur la thérapeutique antibiotique, et d'autre part sur la virulence des souches concernées.

Le travail s'est articulé en deux grandes phases :

- Dans la première, nous avons étudié l'impact de MexAB-OprM sur le traitement antibiotique par β -lactamines, dans un modèle d'endocardite expérimentale à *P. aeruginosa*.
- Dans la seconde, nous avons étudié, sur un ensemble de couples bactériens, constitués de souches sauvages et de leurs mutants surexprimant

MexAB-OprM, isolés en clinique avant et après traitement antibiotique, l'influence de ce système d'efflux sur l'expression de la virulence d'abord *in vivo* dans des modèles murins d'infections pulmonaires aiguë et chronique, puis *in vitro* grâce à l'analyse d'un certain nombre de déterminants de la virulence.

- Par ailleurs, dans le cadre de l'étude des troubles de la perméabilité endothéliale pulmonaire induits par l'infection à *P. aeruginosa* dans les modèles murins, nous avons été amenés à mettre au point une nouvelle technique d'évaluation de ce paramètre physiopathologique, utilisant l'albumine marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine (albumine-FITC). Cette nouvelle technique de mesure a été comparée à une technique de référence utilisant l'albumine marquée à l'iode 125.

Après une présentation des différentes méthodes utilisées, nous détaillerons les différents travaux réalisés dans le cadre de cette thèse, ainsi que les publications qui en ont découlé.

MATERIELS ET METHODES

Les méthodes utilisées pour ce travail de thèse étant multiples, nous les décrirons toutes dans la partie qui suit, et n'y reviendrons pas ensuite.

1- Antibiotiques

Les antibiotiques utilisés dans le modèle expérimental d'endocardite étaient des formulations utilisées en clinique humaine, fournies par les laboratoires : Wyeth-Lederle (Catania, Italie) pour le pipéracilline/tazobactam, GSK (Marly-le-Roi, France) pour la ticarcilline et la ceftazidime.

2- Etudes bactériologiques *in vitro*

Déterminations des concentrations minimales inhibitrices (CMI)

Les déterminations des CMI pour la ticarcilline (TIC), la pipéracilline (PIP), la pipéracilline/tazobactam (PTZ), la ceftazidime (CAZ), l'aztréonam (ATM), le céfépime (FEP), l'imipénème (IPM), le méropénème (MEM), et l'acide nalidixique (Nal) ont été réalisées en bouillon de Mueller-Hinton (supplémenté avec 25 mg/L de Ca^{2+} et 12,5 mg/L de Mg^{2+}) par la technique de microdilution. Les souches ont été cultivées la nuit en milieu de Mueller-Hinton, puis des inocula de 10^5 UFC/mL ont été préparés. La CMI était définie par la plus faible concentration d'antibiotique pour laquelle le bouillon était clair après 24 heures d'incubation à 37°C.

Bactéries

Différentes souches de *P. aeruginosa* ont été utilisées.

PAO1 est une souche de référence de laboratoire.

PAO4098E et **PAO4098ET** sont deux mutants isogéniques de **PAO4098WT** (FP-met-9020 pro-9024 bla P9208) qui ont déjà été décrits.^{80,140} Ces souches nous ont été gracieusement fournies par M. le Pr Plésiat. Ils présentent la particularité de ne produire qu'un faible niveau, non inductible, de β -lactamase. PAO4098E surexprime le système d'efflux MexAB-OprM, tandis que le mutant PAO4098ET est délété pour OprM.

Les couples **PA 14/12**, **PA 70/92**, **PA 96/109**, et **PA 141/128** sont des paires de souches cliniques isogéniques isolées, chez un patient donné pour un couple donné, avant et après antibiothérapie. Ces couples nous ont été gracieusement fournies par le Professeur Patrick Plésiat du CHU de Besançon. Chaque couple est constitué d'une souche sauvage initiale et de son mutant isogénique surexprimant MexAB-OprM sélectionné sous antibiothérapie.¹⁴¹ Sur les profils électrophorétiques de leur membrane externe et de leur LPS, les souches ne différaient au sein de chaque couple que par la quantité de protéine OprM produite.

Les couples 14/12 et 141/128 ont été isolés à partir de plaies chirurgicales, le couple 96/109 d'aspiration trachéale, et le couple 70/92 de selles. Les antibiotiques reçus ont été : pipéracilline + nétromycine pour 14/12, ticarcilline-acide clavulanique + péfloxacin pour 70/92, amoxicilline-acide clavulanique + péfloxacin pour 141/128 et ceftazidime + ciprofloxacine pour 96/109.

Les souches **PAO-JP2 (pECP61.5)** et *Escherichia coli* **MG4 (λI.4) (pPCS.1)**, permettant les dosages respectifs de C4-HSL et C12-HSL, ont gracieusement été fournies par le Pr Van Delden (Département de Génétique et de Microbiologie, Centre Médical Universitaire de Genève).

3- Animaux

Modèle d'endocardite

Les animaux étudiés sont certifiés indemnes d'infection. Ils ont été hébergés à la faculté de Médecine de Nantes, avec un accès libre à l'eau et à la nourriture, en cage individuelle, pendant toute la durée des expériences. Tous les protocoles ont reçu l'approbation du comité d'éthique de la Faculté de Médecine de Nantes. Il s'agit de lapins femelles blanches New Zealand (Cegav, St Mars d'Egrenne, France) pesant 2,5 kg environ.

Modèles de pneumonie

Les animaux étudiés sont certifiés indemnes d'infection. Ils ont été hébergés à la faculté de Médecine de Lille, avec un accès libre à l'eau et à la nourriture, pendant toute la durée des expériences. Tous les protocoles ont reçu l'approbation du comité d'éthique de la Faculté de Médecine de Lille. Il s'agit de souris Balb/c mâles âgées de 8 à 12 semaines, et pesant 20 grammes environ (Charles River Laboratories, St Germain/l'Arbresle, France).

4- Modèles animaux expérimentaux

4a- Modèle d'endocardite

Le modèle expérimental d'endocardite sur lapin a été décrit par Perlman et Freedman en 1971.¹⁴² Vingt-quatre heures après cathétérisme, un inoculum de 10^8 bactéries, obtenu à partir d'une culture de 24 heures en bouillon trypticase

soja (TS), était administré par voie intraveineuse (par la veine marginale de l'oreille). Les animaux étaient assignés après randomisation à un groupe (contrôle ou régime antibiotique). Les traitements antibiotiques étaient démarrés 20 heures après administration de l'inoculum bactérien, et les antibiotiques administrés par le biais d'un cathéter inséré dans une veine marginale d'oreille, durant 48 heures.

Les animaux étaient euthanasiés, par administration de 100 mg de thiopental par voie intraveineuse, avant la période de traitement pour le groupe contrôle, ou 48 après le début du traitement pour les autres groupes.

Simulation de la pharmacocinétique humaine pour les antibiotiques

L'administration discontinue des antibiotiques s'est faite par l'intermédiaire de seringues autopulsées contrôlées par un logiciel reproduisant la pharmacocinétique de l'antibiotique choisi chez l'Homme en fonction du temps. Cette simulation, mise au point par Bugnon et al, est une spécialité du laboratoire de l'EA 3826 de la Faculté de Médecine de Nantes.¹³⁶ Pour l'administration continue, la quantité totale d'antibiotique administrée par 24 heures en discontinu par simulation de la pharmacocinétique humaine a été, cette fois, administrée sur 24 heures à débit constant.

Détermination des concentrations sériques d'antibiotiques

Au moment du sacrifice, des échantillons de sang ont été prélevés pour chaque régime antibiotique et immédiatement centrifugés. Le sérum a été conservé à – 80 °C. Les concentrations de β -lactamines ont été déterminées par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). Pour la ceftazidime, la limite inférieure de détection est 0,5 $\mu\text{g/mL}$, et 1 $\mu\text{g/mL}$ pour la ticarcilline et la pipéracilline. La précision de la technique a été analysée en vérifiant la reproductibilité des déterminations de concentrations sériques : elle était de 4,6 % pour la ceftazidime, et entre 3,5 et 4,7 % pour la ticarcilline et la pipéracilline.

4b- Modèle murin de pneumonie aiguë

1^{ère} étape : Préparation et administration de l'inoculum bactérien

Les souches de *P. aeruginosa* étudiées étaient mises en culture à 37°C, sous agitation, en bouillon trypticase-soja (Laboratoires Biomérieux, Lyon, France) pendant 8 heures. La culture obtenue était alors centrifugée à 1000 x g pendant 10 minutes, le surnageant évacué, et le culot lavé au sérum physiologique, à deux reprises. L'inoculum était ensuite calibré à 10⁹ UFC/mL par spectroscopie. Les souris étaient anesthésiées par inhalation de sevoflurane (Abbott, UK) et placées en décubitus dorsal. Une sonde de gavage 24-G était utilisée pour administrer un inoculum de 70 µL de préparation bactérienne.

2^{ème} étape : Courbes de survie

La survie de groupes de 10 animaux était évaluée au jour le jour pendant 7 jours, après instillation de 70 µL de préparation bactérienne.

3^{ème} étape : Evaluation lésionnelle

Seize heures après instillation de *P. aeruginosa*, les souris étaient euthanasiées par injection intrapéritonéale de pentobarbital (Cerva Santé Animale, Libourne, France).

Pour l'évaluation des lésions pulmonaires, nous avons mesuré les troubles de la perméabilité endothéliale par une technique de référence utilisant une albumine radiomarquée à l'iode 125. Nous avons également déterminé l'importance de l'œdème pulmonaire engendré par l'infection via la mesure du ratio poids mouillé sur poids sec de poumon (ratio wet-to-dry).

Mesure de la perméabilité endothéliale par albumine marquée à l'iode 125

Deux heures avant le sacrifice, les souris recevaient une injection intrapéritonéale de 0,05 µCi d'albumine marquée à l'iode 125. Pour déterminer les proportions respectives d'albumine marquée dans les poumons et le plasma au moment du sacrifice, le maximum de sang était collecté par ponction ventriculaire droite, et les poumons étaient excisés et homogénéisés dans 1 mL de sérum

physiologique. La radioactivité dans le sang et les poumons était déterminée par un compteur gamma (Packard, Meriden, CT, USA).

La perméabilité endothéliale était calculée grâce à la formule suivante :

$$(1) \text{ Perm (\%)} = [(RP - (QS \times RS)) / (RS \times 0,07 \times Pds)] \times 100$$

où :

RP est la radioactivité mesurée (en coups / minute) dans les deux poumons excisés.

QS correspond à la proportion de sang intrapulmonaire (sang intravasculaire résiduel, plus celui introduit dans l'interstitium pulmonaire par saignement ou lésion endothéliale).

RS est la radioactivité mesurée (en coups / minute) dans le total du sang obtenu par ponction intraventriculaire droite.

Pds est le poids de la souris (en grammes).

0,07 x Pds est la masse sanguine totale.

Et QS est calculé de la façon suivante :

$$(2) QS = Hb_{SH} \times Pds \times 0,07 \times (1 - Hte) / Hb$$

où :

Hb_{SH} est le taux d'hémoglobine résiduelle mesurée (en g / dL) dans le surnageant d'homogénat pulmonaire.

Hb est le taux d'hémoglobine (en g / dL) mesuré dans le sang total.

Hte est l'hématocrite.

Pds x 0,07 x (1 - Hte) est le volume plasmatique total.

Mesure du ratio poids mouillé sur poids sec de poumon (wet-to-dry ratio)

Les poumons étaient excisés, pesés, et homogénéisés après mesure de la radioactivité. Le sang était collecté par ponction ventriculaire droite. Une portion de l'homogénat pulmonaire était centrifugé (10 000 tours par minute pendant 10 minutes) pour mesurer la concentration d'hémoglobine résiduelle dans le surnageant. D'autres portions respectivement de l'homogénat pulmonaire, du surnageant d'homogénat, et du sang, étaient pesées et séchées à 120 °C pendant 72 heures, pour calculer la proportion d'eau extravasculaire. Le ratio poids mouillé sur poids sec était alors calculé. Il constitue un reflet du trouble de perméabilité endothéliale.

4^{ème} étape : Bactériologie quantitative

Au moment du sacrifice, du sang était collecté dans une seringue héparinée pour réalisation d'hémoculture. Des cultures quantitatives étaient également réalisées après dilutions en série, à partir de l'homogénat de poumons, sur des géloses au bromocrésol pourpre, mises à incuber à 37°C pendant 24 heures.

4c- Modèle murin de pneumonie chronique

Pour le modèle chronique, la préparation de l'inoculum bactérien était différente. Elle est adaptée de celle décrite par Cash *et al.*¹⁴³ Après culture de *P. aeruginosa* dans du bouillon trypticase soja, 8 heures, sous agitation, à 37°C, la culture était lavée deux fois et resuspendue dans du PBS (phosphate-buffered saline). La suspension bactérienne était calibrée à 10⁹ UFC/mL. Un échantillon d'1 mL de cette suspension était homogénéisé dans un mélange d'agarose et d'huile minérale (Sigma Diagnoses, St-Louis, USA) à 56°C. L'émulsion qui en résultait était ensuite refroidie pour obtenir des billes d'agar emprisonnant les bactéries. Des cultures quantitatives de l'émulsion finale étaient réalisées pour vérification de l'inoculum. Des groupes de trente souris recevaient une instillation endotrachéale

de 60 µL de cette suspension, selon le même principe que pour le modèle de pneumonie aiguë.

Des groupes de 10 souris étaient sacrifiés à 24 heures, 4 jours et 6 jours, pour évaluation des lésions pulmonaires selon les mêmes modalités que pour le modèle d'infection aiguë.

5- Etude du système de sécrétion de type III (SSTT)

5a- Détermination de la cytotoxicité des souches bactériennes sur cultures cellulaires

La cytotoxicité dépendante du système de sécrétion de type III a été déterminée sur cultures de cellules épithéliales pulmonaires humaines de lignée A549 (Biovalley, Marne-la-Vallée, France). La culture cellulaire était amenée à confluence dans du Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) contenant 10 % de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté et filtré, avec 1 % d'acides aminés non essentiels et 1 % de pénicilline-streptomycine, dans une étuve à 37°C en atmosphère humide (5 % CO₂ / 95 % air). Les cellules étaient ensuite co-incubées avec les bactéries étudiées, en plaque 96 puits, à raison de 20 000 cellules par puits, et d'un rapport de 100 bactéries par cellule (MOI = 100), dans du DMEM non complémenté.

La cytotoxicité cellulaire a été évaluée par mesure en densité optique, à la longueur d'onde de 490 nm (DO_{490 nm}), de la quantité de LDH libérée 8 heures après l'infection (Cytotox 96, Promega, Charbonnières, France). Elle était exprimée en pourcentage de cytotoxicité, selon la formule suivante :

$$\% \text{ cytotoxicité} = \frac{(\text{DO}_{490 \text{ nm}} (\text{cellules} + \text{bactéries}) - \text{DO}_{490 \text{ nm}} (\text{cellules seules}))}{(\text{DO}_{490 \text{ nm}} (\text{cellules} + \text{Triton}) - \text{DO}_{490 \text{ nm}} (\text{cellules seules}))} \times 100$$

Le pourcentage de 100 % de cytotoxicité correspond au niveau de LDH relargué par les cellules lysées par du Triton X-100 à 0,8 % pendant 45 minutes.

5b- Détermination du phénotype du SSTT par technique de Western-Blot.

1^{ère} étape : préparation des échantillons.

A partir de cultures incubées pendant 14 heures dans du milieu Luriani Broth (LB), la population bactérienne est évaluée par densité optique. Avant ensemencement dans le milieu d'induction, le nombre de bactéries nécessaires pour ensemercer le volume de milieu donné à une DO_{600} égale à 0,2 a été lavé une fois en milieu frais. Le SSTT a été activé dans un milieu d'induction composé de LB, d'EGTA (éthylène glycol tétra-acétique acide) à 5 mM, et de $MgCl_2$ à 20 mM.

2^{ème} étape : extraction et concentration des protéines du surnageant.

Après 5 heures de culture en milieu inducteur, les cultures ont été centrifugées 5 min à 14 000 x g. Compte-tenu de la faible concentration de protéines du SSTT dans le surnageant, on a réalisé une concentration du surnageant. Le surnageant a été concentré environ 50 fois par ultrafiltration (Vivapore ; Sartorius, République Fédérale Allemande).

3^{ème} étape : électrophorèse en SDS-PAGE

La solution concentrée en protéines obtenue par ultrafiltration a été mélangée au tampon de solution dénaturante (eau distillée, Tris-HCl 0,5 M, pH=6,8, glycérol, SDS 20 %, bleu de bromophénol 1 %, EDTA à 500 mM, pH 8, et β -mercaptoéthanol). La migration en gel vertical de polyacrylamide à 12 %, en présence de sodium dodecyl sulfate (SDS), a permis de séparer les protéines en

fonction de leur masse moléculaire. Le tampon d'électrophorèse employé était composé de Tris-base à 50 mM, glycine à 380 mM, et SDS à 0,5 %.

4^{ème} étape :Western-blot

Après séparation des protéines par migration électrophorétique SDS-PAGE, les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose. Ce transfert se fait dans un appareil de transfert semi-sec. Entre des feuilles de papier Wattman imbibées de tampon de transfert (Tris 25 mM, Glycine 192 mM, méthanol 20 %, eau distillée), le gel d'acrylamide contenant les protéines a été déposé sur une membrane de nitrocellulose. Ce « sandwich » est réalisé entre deux électrodes. Un courant de 350 mA pendant 2 heures fait migrer les protéines du gel sur la membrane.

Après le transfert, la membrane a été mise à incuber pendant 60 min dans une solution de TBS (Tris 50 mM, NaCl 200 mM, pH 7,5) contenant 0,05 % de Tween 20 % et 1 % de lait concentré en poudre. L'action détergente du Tween 20 et l'action saturante des protéines du lait préparent la membrane pour l'immuno-détection par un anticorps primaire spécifique. La membrane a ensuite été lavée à plusieurs reprises par du TBS. Les anticorps primaires utilisés étaient des anticorps purifiés polyclonaux de lapin dirigés contre ExoS ou ExoU (antibodies-online, République Fédérale d'Allemagne). Ils ont été utilisés à la concentration de 1/2000^{ème} dans du TBS et incubés sur la membrane pendant 1 heure. La membrane a été lavée à plusieurs reprises par du TBS pour éliminer l'excès d'anticorps primaire. La localisation du site de fixation de l'anticorps primaire sur la membrane s'est faite avec un anticorps secondaire de poulet dirigé contre le fragment constant de l'immunoglobuline et coupé à la peroxydase (Sigma, France). Il a été utilisé à la concentration de 1/4000^{ème} dans du TBS et incubé pendant 30 min.¹⁴⁴ La révélation a été réalisée par autoradiographie.

6- Etude du quorum sensing

6a- Dosage de la pyocyanine

Après 20 h de culture en milieu PB (Bacto-peptone 20 g/L, MgCl_2 : 1,4 g/L, K_2SO_4 : 10 g/L), la population bactérienne était mesurée par densité optique à 600 nm. Les cultures étaient centrifugées 10 min à 10 000 x g et 2,5 mL du surnageant de culture étaient prélevés pour l'extraction. L'extraction était réalisée en ajoutant 1,5 mL de chloroforme (CHCl_3). Après avoir éliminé la phase supérieure, l'extraction de la phase organique était réalisée en ajoutant 0,5 mL de HCl 0,2 M : un pigment rose se forme en présence de pyocyanine. La concentration de pyocyanine était évaluée par mesure de la densité optique à 520 nm. L'activité de la pyocyanine était exprimée comme la DO_{520} rapportée à la DO_{600} de la population bactérienne, et multipliée par 100. Les mesures ont été effectuées en triplicate.¹⁴⁵

6b- Dosage de l'activité élastase

A partir d'une culture incubée pendant 14 heures dans du milieu LB à 37°C, la population bactérienne était évaluée en fonction de la densité optique à 600 nm. Le nombre de bactéries nécessaires pour ensemencer un même volume de milieu LB à une DO_{600} égale à 0,05 était prélevé, et remis à incuber dans du LB pendant 7 heures à 37 °C. Après contrôle de la densité optique à 600 nm, la culture bactérienne était centrifugée 5 min à 3500 x g, et 500 μL du surnageant étaient prélevés et mis en contact avec une solution contenant 1 mL de tris-maléate (0,1 M, pH 8), 10 mg d'élastine Congo red (Sigma-Aldrich) et 1 μL de CaCl_2 1M, pendant 18 heures sous agitation constante à 37°C. En présence d'élastase, l'élastine Congo red était dégradée, et l'activité élastase évaluée par mesure de la DO_{495} du produit de dégradation. L'activité élastase était exprimée comme la DO_{495} rapportée à la DO_{600} de la population bactérienne sur laquelle a été réalisée la technique, et multipliée par 100. Les mesures ont été effectuées en triplicate.¹⁴⁶

6c- Production de rhamnolipides

Il s'agit d'un dosage semi-quantitatif réalisé sur milieu M9 dans lequel le NH_4Cl est remplacé par du glutamate à 0,1 %, et supplémenté par du glucose à 0,2 % et du MgSO_4 (2 mM en concentration finale).¹⁴⁷ A partir d'une culture

bactérienne calibrée à 10^6 UFC/mL, des spots de 3 μ L étaient placés de manière équidistante sur les géloses réalisées. Après une incubation de 24 h à 37 °C, puis 24 h à 25 °C, la production de rhamnolipides était estimée en mesurant les plages bleutées formées autour des spots, en les comparant à une souche de référence.

6d- Dosage de phospholipase C

Ce dosage est réalisé par spectrophotométrie sur les surnageants obtenus de cultures en phase stationnaire.^{147,148} Les bactéries étaient cultivées dans 2 mL de milieu Tryptose minimal (contenant 120 mM de tris(OH-méthyl)aminomethane(Tris)-hydrochloride buffer, 0,1 % de tryptose, 20mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,6 mM CaCl_2 , 10 mM de KCl, 50 mM de glucose ou 24 mM de succinate de sodium) pendant 24 heures, sous agitation. Au terme de ces 24 h, la DO_{540} de la culture était déterminée. La culture était alors centrifugée. On traitait 1 mL de surnageant avec 10 mg de charbon actif. Le tout était centrifugé. Des fractions de 10 μ L de surnageant étaient alors ajoutées à une mixture comprenant 250 mM tris-HCl (pH 7,2), 10 mM de NPPC (p-nitrophenyl-phosphorylcholine), 60 % de glycerol (wt/vol), et 1 μ M de ZnCl_2 . Les échantillons étaient disposés sur une plaque 96 puits. La mesure de l'absorbance à 405 nm était réalisée au bout d'une heure d'incubation à 37°C. La production de phospholipase C était évaluée par le ratio $\text{DO}_{405} / \text{DO}_{540}$.

6e- Détermination de la production des acyl homosérine lactones (HSL)

A partir d'une culture incubée pendant 14 heures dans du milieu LB à 37 °C, la population bactérienne était évaluée en fonction de la densité optique à 600 nm. Le nombre de bactéries nécessaires pourensemencer un même volume de milieu LB à une DO_{600} égale à 0,05 était prélevé, et remis à incuber dans du LB pendant 7 heures à 37 °C. Après contrôle de la DO_{600} , la culture bactérienne était centrifugée 5 min à 3500 x g.

L'extraction des HSL était réalisée à partir du surnageant en ajoutant un volume égal d'acétate d'éthyle. La partie supérieure était prélevée et déposée dans un microtube. Une deuxième extraction était réalisée par la même méthode

sur la phase inférieure. Le microtube était hermétiquement scellé et conservé à – 20 °C.

Préparation de la gamme étalon de C4-HSL et de 3-oxo-C12-HSL

Pour la gamme étalon de C4-HSL, des dilutions en cascade de 5.10^{-2} à 5.10^{-9} M ont été réalisées à partir d'une solution mère de C4 à 5.10^{-2} M dans de l'acétate d'éthyle. Pour la gamme étalon de C12, des dilutions en cascade de 5.10^{-5} à 5.10^{-11} M ont été réalisées à partir d'une solution mère de 5.10^{-5} M dans de l'acétate d'éthyle. Puis les tubes étaient parafilmés pour éviter l'évaporation de l'acétate d'éthyle et conservés à – 20 °C.

Dosage de C4-HSL

Le dosage de C4-HSL est réalisé de manière indirecte à partir de la « souche reporter » PAO-JP2 (pECP61.5). La souche PAO-JP2 est une souche PAO1 déficiente en *lasI* et *rhII*, qui ne produit donc pas de HSL. Le plasmide pECP61.5 contient *rhIR* sous le contrôle d'un promoteur *tac*, ainsi que *rhIA'-lacZ*, produisant une activité β -galactosidase liée à la quantité de C4-HSL.

Préparation de la « souche reporter » pour le dosage de C4-HSL : la souche PAO-JP2 (pECP61.5) était mise à incuber à 37 °C pendant 14 heures dans 2 mL de bouillon TS contenant 200 μ g /mL de carbénicilline. Un lavage de 1 mL de la culture était réalisé : centrifugation à 3000 x g pendant 2 min, puis resuspension dans 1 mL de bouillon TS sans antibiotique. La population bactérienne était alors calibrée par mesure de la DO_{600} . Le nombre de bactéries nécessaires pour obtenir une DO_{600} égale à 0,3 après 2 h 30 de culture était remis à incuber à 37 °C dans le volume de bouillon TS désiré. Cette culture bactérienne était déposée ultérieurement sur les échantillons à tester et la gamme étalon pour doser le C4-HSL.

Dosage de C4-HSL par mesure de l'activité β -galactosidase : après évaporation de l'acétate d'éthyle des différentes extractions (échantillons et gamme étalon), un aliquot de 1 mL de la culture de la « souche reporter »

préparée comme ci-dessus était déposé dans chaque tube et mis à incuber à 37 °C jusqu'à obtention d'une DO_{600} de 0,9 à 1. Puis la culture était centrifugée à 3000 x g pendant 2 min, et resuspendue dans 1 mL de milieu A (K_2HPO_4 : 10,5 g/L, KH_2PO_4 : 4,5 g/L, $(NH_4)_2SO_4$: 1 g/L, $Na_3citrate.2H_2O$: 0,5 g/L, extrait de levure 0,5 g/L). La DO_{600} de chaque culture était alors mesurée. Le dosage de C4-HSL se fait en duplicata (échantillons et gamme étalon). Sur chaque échantillon étaient versés 100 µL de la culture resuspendue, 10 µL de SDS 10%, 20 µL de $CHCl_3$, et 700 µL de tampon Z ($Na_2HPO_4.7H_2O$: 16,1g/L, $NaH_2PO_4.H_2O$: 5,5g/L, KCl : 0,75g/L, $MgSO_4.7H_2O$: 0,246g/L et β -mercaptoethanol : 2,7mL/L), puis les tubes étaient placés dans un bain-marie à 28°C.

Pour la gamme étalon chaque mesure se fait à partir d'une quantité de culture définie ($X \mu L$), avec $800 - X \mu L$ de tampon Z, 10 µL de SDS 10 % et 20 µL de $CHCl_3$, selon le tableau ci-dessous, et les tubes étaient placés dans un bain-marie à 28°C.

concentrations de C4 à analyser	Volume de culture à rajouter au tampon Z (µL)
0	200
10^{-9} M	200
10^{-8} M	200
5.10^{-8} M	100
10^{-7} M	50
5.10^{-7} M	20
10^{-6} M	20
10^{-5} M	20

Enfin, dans chaque microtube, on versait 200 µL de solution d'ONPG (tampon Z avec 4 mg/mL d' ONPG). L'ONPG (2 nitrophényl β -D galactopyranoside, Sigma-Aldrich, France) est le substrat chromogène de la β -galactosidase. Quand la solution devenait jaune pâle, la réaction était stoppée en ajoutant 500 µL de carbonate de sodium (solution contenant 0,53 g de Na_2CO_3 pour 5 mL d'eau) et

en plaçant les microtubes dans la glace. Après centrifugation à 3000 x g pendant 5 mn, la DO₄₂₀ était déterminée pour chaque échantillon.

La mesure de l'activité β -galactosidase est donnée en unités Miller par la formule suivante :

$\frac{1000 \times DO_{420}}{\text{Temps entre dépôt ONPG et arrêt de la réaction (mn)} \times \text{vol. culture (mL)} \times DO_{600}}$

Dosage de C12-HSL

Le dosage de 3-oxo-C12-HSL est réalisé de manière indirecte à partir d'une souche d'*E.coli* MG4 (λ I.4) (pPCS.1). Le bactériophage λ I.4 contient lasI-lacZ, et pPCS.1 contient le gène codant pour lasR et un gène de résistance à l'ampicilline. En présence de 3-oxo-C12-HSL, lasR va activer l'expression de lasI-lacZ, produisant une activité β -galactosidase liée à la quantité de 3-oxo-C12-HSL.

Préparation de la « souche reporter » pour le dosage de C12-HSL : La souche d'*E.Coli* MG4 (λ I.4) (pPCS.1) était mise à incuber à 37°C pendant 20 heures dans 2 mL de milieu A supplémenté en glucose 0,4% et MgSO₄ 1mM, et contenant 100 μ g/mL d'ampicilline. La population bactérienne était alors calibrée par la densité optique à 600 nm. Les bactéries étaient diluées pour obtenir une DO₆₀₀ à 0,3 dans le volume de milieu A supplémenté nécessaire aux mesures. Cette culture bactérienne était déposée ultérieurement sur les échantillons à tester et la gamme étalon pour doser le 3-oxo-C12-HSL.

Dosage de 3-oxo-C12-HSL par mesure de l'activité β -galactosidase : après évaporation de l'acétate d'éthyle des différentes extractions (échantillons et gamme étalon), un aliquot de 1mL de la culture de la « souche reporter » préparée ci-dessus était déposé dans chaque tube et mis à incuber à 37°C jusqu'à obtention d'une DO à 0,7. Puis la culture était centrifugée à 3000 x g pendant 2 minutes, et resuspendue dans 1 mL de milieu A. La DO 600 de chaque culture

était alors déterminée. Les étapes étaient ensuite identiques à celles suivies pour le dosage de C4-HSL.

Pour la gamme étalon chaque mesure s'est faite à partir d'une quantité de culture définie selon le tableau (X μL) suivant :

Concentrations de C12-HSL à analyser	Volume de culture à rajouter au tampon Z (μL)
0	200
10^{-12} M	200
10^{-11} M	200
$5 \cdot 10^{-11}$ M	100
10^{-10} M	50
$5 \cdot 10^{-10}$ M	20
10^{-9} M	20
$5 \cdot 10^{-9}$ M	20

7- Mise au point d'une technique de mesure de la perméabilité endothéliale par albumine-FITC

Nous avons mis au point une technique de mesure de la perméabilité endothéliale utilisant de l'albumine marquée à la fluorescéine isothiocyanate (FITC), que nous avons comparée à la technique de mesure de référence par albumine marquée à l'iode 125. Deux heures avant le sacrifice, les souris ont reçu une injection intrapéritonéale d'une solution de 2 mL associant 1 mL d'albumine-FITC à 2 mg/mL (soit une concentration finale de 1 mg/mL) et 1 mL soit 0,05 µCi d'albumine marquée à l'iode 125. Comme pour la technique utilisant les isotopes, au moment du sacrifice, le maximum de sang a été collecté par ponction intraventriculaire droite et les deux poumons ont été excisés et homogénéisés dans 1 mL de sérum physiologique stérile. Ensuite, le sang a été centrifugé à 10 000 x g pendant 10 min afin de récupérer le plasma, ainsi que l'homogénat de poumon pour récupérer le surnageant. Un même volume de plasma et de surnageant ont alors été prélevés, en l'occurrence 100 µL de chaque, pour y mesurer les concentrations respectives d'albumine-FITC. L'émission de fluorescence a été calculée par le logiciel Metamorph (Molecular Imagine) et a nécessité l'utilisation d'un microscope de fluorescence Nikon 50I connecté à une caméra de fluorescence coolSNAP (Roper sc.). L'onde excitatrice a été obtenue par une lampe métal Halide, les longueurs d'onde étant sélectionnées par filtre interférentiel (480 nm +/- 40 pour l'onde excitatrice, 530 nm +/- 40 pour l'onde d'émission).

La perméabilité endothéliale a alors été calculée par la formule suivante :

$$(1) \text{ Perm-FITC (\%)} = \frac{((FP_{SH} - FP_N) \times P_{PH}) - QFS}{(F_{PI} - F_{PIN}) \times P_{ds} \times 0,07 \times (1 - Hte)} \times 100$$

Où :

FP_{SH} correspond à la fluorescence mesurée dans le surnageant d'homogénat de poumon.

FP_N est la fluorescence émise naturellement par le surnageant d'homogénat de poumon, en l'absence de d'administration d'albumine-FITC.

F_{PI} est la fluorescence mesurée dans le plasma.

F_{Pin} est la fluorescence émise naturellement par le plasma, en l'absence d'administration d'albumine-FITC.

P_{PH} correspond au poids de l'homogénat obtenu par homogénéisation des deux poumons dans 1 mL de sérum physiologique.

P_{ds} est le poids de l'animal testé.

Hte est le taux d'hématocrite calculé dans le sang total.

P_{ds} x 0,07 x (1 – Hte) correspond à la masse plasmatique de l'animal.

QFS est la proportion de fluorescence correspondant au sang intrapulmonaire (c'est-à-dire le sang intravasculaire résiduel plus celui introduit dans l'interstitium pulmonaire par saignement ou lésion).

QFS est calculé de la manière suivante :

$$(2) \text{ QFS} = \frac{(\text{FP}_{\text{SH}} - \text{FP}_{\text{N}}) \times \text{Hb}_{\text{SH}}}{\text{Hb}}$$

Où :

Hb_{SH} (en g/dL) correspond au taux d'hémoglobine mesuré dans le surnageant d'homogénat.

Hb (en g/dL) est le taux d'hémoglobine mesuré dans le sang total.

8- ANALYSES STATISTIQUES

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, USA).

8a- Comparaison des différents protocoles de traitement dans le modèle d'endocardite

Le critère de jugement principal était le nombre de bactéries survivantes dans les végétations, exprimées en $\log_{10}$ UFC/g. L'efficacité des différents groupes thérapeutiques a été comparée par analyse de variance (ANOVA) suivie d'un test de Scheffe pour les comparaisons entre deux groupes. Une valeur de $p \leq 0,05$ était considérée comme significative.

8b- Etudes de survie dans le modèle murin de pneumonie aiguë

La comparaison des taux de survie cumulée entre groupes a été réalisée à l'aide d'un test de log-rank. Un niveau de 5 % était considéré comme statistiquement significatif.

8c : Comparaisons des lésions pulmonaires dans les modèles murins de pneumonie

Pour les mesures de perméabilité endothéliale, de ratio wet/dry, et les niveaux de charge bactérienne sanguine et pulmonaire, un test de Mann-Whitney a été utilisé pour les comparaisons entre deux groupes.

Une valeur de $p \leq 0,05$ était considérée comme significative.

8d- Etudes de cytotoxicité sur milieux cellulaires

Pour les mesures de cytotoxicité, les dosages des différents déterminants de la virulence et des auto-inducteurs, une analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour les comparaisons entre 3 groupes ou plus. Un test de Mann-Whitney a été utilisé pour les comparaisons entre deux groupes.

8e- Etude du quorum-sensing

Une corrélation éventuelle entre les niveaux de production des auto-inducteurs C4-HSL et C12-HSL entre eux et avec les différents déterminants de la virulence a été recherchée par calcul du coefficient de Spearman entre les différents tests pris deux à deux.

Une valeur de $p \leq 0,05$ était considérée comme significative

8f- Mise au point de la technique de mesure de perméabilité endothéliale utilisant l'albumine-FITC

Pour les comparaisons des niveaux de perméabilité endothéliale entre le groupe contrôle et le groupe infecté, un test de comparaison des moyennes de Mann-Whitney a été utilisé.

La corrélation entre les deux méthodes de mesure a été réalisée par le calcul du coefficient de Spearman, et par le diagramme de dispersion de Bland-Altman.¹⁴⁹ Cette méthode de comparaison entre deux techniques de mesure utilise une représentation graphique. On représente graphiquement la différence ou le ratio entre les deux techniques de mesure comme une fonction de la moyenne des deux mesures de chaque sujet. Le graphique résultant est appelé graphique de Bland-Altman, et représente la dispersion des valeurs. Le biais calculé (différence ou ratio entre les moyennes) doit être compris entre les limites 95 % de l'intervalle de confiance.

RESULTATS

1^{ère} étude : Impact *in vivo* du système d'efflux MexAB-OprM sur l'efficacité des β -lactamines dans un modèle expérimental d'endocardite à *Pseudomonas aeruginosa*

Ce travail a donné lieu à la publication suivante :

Boutoille D, Jacqueline C, Le Mabecque V, Potel G, Caillon J. *In-vivo* impact of the MexAB-OprM efflux system on β -lactams efficacy in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Int J Antimicrob Agents*. Sous presse.

La résistance aux antibiotiques chez *P. aeruginosa* est la résultante de l'intrication de différents facteurs, dont notamment l'inactivation enzymatique des

β -lactamines par les β -lactamases, et les altérations de la perméabilité de la membrane externe. De plus, les pompes à efflux entrent en synergie avec les deux facteurs précédents en rejetant vers le milieu extra-cellulaire un large éventail d'antibiotiques, ce qui a pour effet de diminuer leurs concentrations intracellulaires jusqu'en-dessous du seuil d'efficacité, et expose à l'émergence rapide de résistances. Les mutants nalB, qui surexpriment le système d'efflux MexAB-OprM, ont le plus large éventail de substrats, parmi lesquels les fluoroquinolones, les β -lactamines, les tétracyclines et le triméthoprime. Ces mutants représentent dans les hôpitaux français, jusqu'à 46 % des souches cliniques de sensibilité intermédiaire ou résistantes à la ticarcilline.⁶¹

Pourtant, on sait peu de choses sur l'impact de ce système d'efflux sur la thérapeutique, notamment sur l'action des principales β -lactamines anti-pseudomonas (ticarcilline, pipéracilline, ceftazidime, carbapénèmes). Or, l'obtention de ces informations prend toute son importance dans le cadre de la lecture interprétative de l'antibiogramme.

L'objectif de ce travail a été d'étudier l'impact *in vivo* de MexAB-OprM sur différentes β -lactamines anti-*Pseudomonas* : ticarcilline, pipéracilline/tazobactam, et ceftazidime. Nous avons simulé la pharmacocinétique humaine de plusieurs posologies et modes d'administration de ces antibiotiques, et comparé leur efficacité, dans un modèle d'endocardite expérimentale du lapin, sur deux mutants isogéniques : PAO4098E qui surexprime MexAB-OprM, et PAO4098ET qui est délété pour OprM. Le modèle expérimental d'endocardite est considéré comme représentatif des infections les plus difficiles à traiter.

1- PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Vingt-quatre heures après cathétérisation carotidienne, 10^8 UFC des souches PAO4098E et PAO4098ET ont été administrées par voie intraveineuse aux animaux, répartis de manière aléatoire dans les différents groupes étudiés. Vingt heures après administration de l'inoculum bactérien, les antibiotiques ont été

débutés par voie intraveineuse, pour une administration de 48 heures. Les animaux témoins ont été sacrifiés juste avant le début de l'administration des antibiotiques. Au bout de 48 heures de traitement, les animaux inclus dans les différents groupes thérapeutiques ont été sacrifiés.

Pour chaque souche bactérienne, 10 animaux témoins ont été testés, et 6 animaux ont été incorporés dans chaque groupe thérapeutique pour chacune des deux souches étudiées.

Les différents groupes étudiés ont été les suivants pour PAO4098E et PAO4098ET :

- Témoins sans antibiotiques.
- Ticarcilline 15 g/d CI : simulation de ticarcilline 15 g/j en administration continue.
- Ticarcilline 15 g/d PD : simulation de ticarcilline 15 g/j en administration discontinue.
- Ticarcilline 18 g/d PC : simulation de ticarcilline 15 g/j en administration continue.
- Pipéracilline/tazobactam 12 g/d PC : simulation de 12 g/j en administration continue.
- Pipéracilline/tazobactam 16 g/d PC : simulation de 16 g/j en administration continue.
- Pipéracilline/tazobactam 16 g/d PD : simulation de 16 g/j en administration discontinue.
- Ceftazidime 3 g/d PC : simulation de 3 g/j en administration continue.
- Ceftazidime 6 g/d PC : simulation de 6 g/j en administration continue.
- Ceftazidime 6 g/d PD : simulation de 6 g/j en administration discontinue.

Pour des raisons éthiques, certains régimes thérapeutiques n'ont pas été étudiés, parce qu'il a été considéré qu'ils n'amèneraient rien à la discussion ou que les résultats se déduisaient de ceux obtenus avec les autres groupes. Il s'agit de la ticarcilline en discontinu à 18 g/j, de la pipéracilline/tazobactam en discontinu à 12 g/j, et de la ceftazidime en discontinu à 3 g/j.

Les paramètres suivants ont été étudiés :

Afin de contrôler l'adéquation des posologies employées chez les animaux avec celles utilisées en clinique, les concentrations sériques des antibiotiques obtenues par simulation de la pharmacocinétique humaine ont été vérifiées.

Pour comparer l'efficacité des différents régimes thérapeutiques testés, le critère de jugement était la numération des bactéries dans les broyats de végétations obtenues au moment du sacrifice, après 48 heures de traitement.

2- RESULTATS

Influence de MexAB-OprM sur les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des β -lactamines.

Les CMI de la ticarcilline, de la pipéracilline/tazobactam et de la ceftazidime pour PAO4098E et PAO4098ET sont rapportées dans le **Tableau 5**, et comparées à celles obtenues pour la souche de référence PAO1, dont sont issus ces deux mutants.

Tableau 5 : CMI (en $\mu\text{g/mL}$) des bêta-lactamines.

	PAO1	PAO4098E	PAO4098ET
Ticarcilline	16	64	0,5
Pipéracilline/tazobactam	4	8	0,5
Ceftazidime	1	2	1

Les mutants PAO4098E et PAO4098ET n'expriment qu'un niveau basal de la céphalosporinase chromosomique AmpC. On apprécie donc directement dans ce tableau l'effet direct de MexAB-OprM sur les CMI des bêta-lactamines. La ticarcilline est l'antibiotique le plus touché avec une multiplication de la CMI par un facteur 4. La pipéracilline/tazobactam et la ceftazidime apparaissent moins touchées, avec néanmoins un doublement de leurs CMI par rapport à celles obtenues pour PAO1. *A contrario*, la délétion d'OprM rend PAO4098ET extrêmement sensible aux β -lactamines avec des CMI de 0,5 à 1 $\mu\text{g/mL}$.

Impact de MexAB-OprM sur l'efficacité des traitements antibiotiques par β -lactamines *in vivo*.

Pour chacun des trois antibiotiques étudiés, deux posologies ont été utilisées, correspondant pour les plus faibles aux posologies recommandées dans les RCP (Recommandations de Bonne Pratique) des molécules et le dictionnaire Vidal, et pour les plus élevées à celles qui ont tendance à être utilisées dans les infections les plus sévères suite à la progression des connaissances sur les paramètres PK/PD (pharmacocinétiques et pharmacodynamiques) des β -lactamines. Par ailleurs, deux régimes d'administration, à savoir administration discontinue et perfusion continue ont été utilisés pour chacune des posologies, sauf dans les cas où on était sûrs qu'aucune efficacité n'était attendue, pour raisons éthiques. Le critère principal de jugement était le nombre de bactéries survivantes par gramme de végétation. L'efficacité comparée de ces différents régimes thérapeutiques est rapportée dans le **Tableau 6**, p. 65.

Les posologies de 15 grammes et 18 grammes ont été simulées pour la ticarcilline, 12 et 16 grammes pour la pipéracilline/tazobactam, et 3 et 6 grammes pour la ceftazidime. Pour raisons éthiques, les régimes suivants n'ont pas été étudiés : ticarcilline 18 g/j en administration discontinue, pipéracilline/tazobactam 12 g/j en administration discontinue, et ceftazidime 3 g/j en administration

discontinue. Sur le mutant PAO4098ET, de manière attendue, tous les régimes thérapeutiques se sont avérés très efficaces, avec stérilisation des végétations en 48 heures seulement.

Par contre, sur PAO4098E, la ticarcilline (CMI 64 µg/mL) n'a eu aucun effet, y compris à forte dose et en administration continue. La pipéracilline/tazobactam, malgré une CMI de seulement 8 µg/mL, n'a également eu aucune efficacité, même en utilisant des fortes posologies en administration continue. La ceftazidime, quant à elle, a été certes inefficace à 3 g/j que ce soit en administration discontinue ou continue, mais elle a été efficace à la forte posologie de 6 g/j, quel que soit le mode d'administration, avec néanmoins une efficacité significativement supérieure pour la perfusion continue ($p = 0,0022$) par rapport à la perfusion discontinue.

Tableau 6 : Activités comparées des antibiotiques, selon la posologie et le mode d'administration, dans le modèle expérimental d'endocardite du lapin, après 48 heures d'administration.

Régime antibiotique	Log ₁₀ UFC/g de végétation	
	(moyenne ± DS [n. de lapins])	
	PAO4098E	PAO4098ET
Témoins	7.17 ± 0.2 [10]	6.6 ± 0.8 [10]
Ticarcilline 15 g/d PC	6.2 ± 0.4 [6]	Stérile [6]
Ticarcilline 15 g/d PD	6.4 ± 0.5 [6]	Stérile [6]
Ticarcilline 18 g/d PC	6.1 ± 1.2 [6]	Stérile [6]
Pipéracilline/tazobactam 12 g/d PC	6.0 ± 1.2 [6]	Stérile [6]
Pipéracillin/tazobactam 16 g/d PC	6.0 ± 1.2 [6]	Stérile [6]

Pipéracilline/tazobactam 16 g/d PD	6.2 ± 1.2 [6]	Stérile [6]
Ceftazidime 3 g/d PC	5.9 ± 0.8 [6]	Stérile [6]
Ceftazidime 6 g/d PC	2.7 ± 0.4 [6] ^{*§}	Stérile [6]
Ceftazidime 6 g/d PD	4.8 ± 0.7 [6] *	Stérile [6]

*p<0,01 vs groupe témoin

[§]p<0,01 vs administration discontinue

PC : perfusion continue / PD : perfusion discontinue

Concentrations sériques des antibiotiques

Les concentrations obtenues *in vivo*, en perfusion continue, ont été déterminées, par HPLC, sur les prélèvements de sang obtenus immédiatement après euthanasie des animaux. Ces concentrations sont rapportées dans le **Tableau 7**.

A part pour la ticarcilline à 15 g/j, tous les régimes thérapeutiques ont permis d'obtenir des concentrations sériques d'antibiotiques en permanence au-dessus des CMI obtenues pour PAO4098E. Dans ce modèle d'infection sévère et difficile à traiter, l'obtention d'un rapport concentration sérique sur CMI le plus élevé possible semble primordial.

Tableau 7 : Concentrations d'antibiotiques obtenues à l'état d'équilibre (en µg/mL), en perfusion continue, pour les différentes posologies des β-lactamines étudiées.

Régime antibiotique	Concentration sérique (en µg/mL)
---------------------	----------------------------------

Ticarcilline 15 g/j	53 ± 13,5
Pipéracilline/tazobactam 12 g/j	50 ± 22,6
Pipéracilline/tazobactam 16 g/j	122 ± 58,4
Ceftazidime 3 g/j	22,7 ± 12,2
Ceftazidime 6 g/j	34,8 ± 15,5

3- DISCUSSION

In vitro, l'hyperexpression de MexAB-OprM diminue la sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* aux β -lactamines.^{140,150} Mais on sait peu de choses sur le retentissement *in vivo*, sur les traitements antibiotiques, notamment des infections les plus sévères, là où les paramètres PK/PD ont le plus d'importance : réanimation, onco-hématologie, patients atteints de mucoviscidose. Comme les essais comparatifs chez l'humain sont difficiles dans ces types de pathologies, du fait de leur sévérité, le modèle d'endocardite expérimentale du lapin est considéré comme un modèle discriminant d'infection sévère.

En pratique clinique, la surexpression de MexAB-OprM est fréquente.¹⁴¹ Cependant, du fait de la pression de sélection exercée par les antibiotiques, ce mécanisme est le plus souvent associé à d'autres mécanismes de résistance, avec lesquels il entre en synergie. Ainsi, la surexpression de MexAB-OprM concerne dans les hôpitaux français jusqu'à 46 % des souches de *P. aeruginosa*, comprenant celles ne présentant qu'une résistance à la ticarcilline à celles avec haut niveau de résistance à la famille des β -lactamines.⁶¹

Nous avons comparé l'activité de trois antibiotiques anti-*Pseudomonas* de référence (ticarcilline, pipéracilline/tazobactam, et ceftazidime), sur deux mutants de PAO1, PAO4098E et PAO4098ET choisis du fait de leur niveau basal d'expression de la céphalosporinase chromosomique, permettant de se concentrer sur l'effet de MexAB-OprM uniquement. Etant donné les très basses CMI des antibiotiques étudiés sur PAO4098ET (la souche dépourvue de système MexAB-OprM), tous les traitements étudiés se sont avérés capables de stériliser les végétations dans ce modèle d'endocardite expérimentale. A l'inverse, pour la souche PAO4098E qui surexprime MexAB-OprM à l'exception de tout autre mécanisme de résistance, les seuls régimes thérapeutiques capables de diminuer significativement la charge bactérienne dans les végétations ont été ceux utilisant la ceftazidime à fortes doses (6 grammes par jour), que ce soit en perfusion discontinue ou en perfusion continue, avec une nette supériorité pour la perfusion continue.

Pour PAO4098E, la CMI de la ticarcilline (64 µg/mL) était trop élevée pour espérer obtenir une quelconque efficacité dans ce modèle d'endocardite extrêmement exigeant pour les antibiotiques testés. Par contre, la CMI de l'association pipéracilline/tazobactam n'étant que de 8 µg/mL (c'est-à-dire que la souche est cliniquement sensible selon les critères de l'EUCAST), faisaient escompter une efficacité significative dans ce modèle. Pourtant aucun effet bactéricide n'a été observé, même avec le régime thérapeutique simulant la posologie humaine de 16 grammes par 24 heures en perfusion continue, et ce malgré les concentrations sériques élevées d'antibiotiques obtenues à l'état d'équilibre ($122 \pm 58,4$ µg/mL), c'est à dire bien au-dessus des CMI de la bactérie (en l'occurrence 15 fois). Or, on considère que le critère PK/PD principal d'efficacité des β -lactamines est le paramètre $T > CMI$, c'est-à-dire le temps où la concentration sérique de l'antibiotique est supérieure à la CMI de la bactérie. Mais ce critère a été validé essentiellement dans les infections pulmonaires à pneumocoques. En fait, dans les infections les plus sévères, notamment lorsque le foyer infectieux est difficile à atteindre pour l'antibiotique (système nerveux central, végétation d'endocardite, os...), le rapport concentration / CMI est également important.¹⁵¹ Les concentrations sériques obtenues dans ce modèle sont conformes à celles obtenues chez l'humain aux doses correspondantes.

Peut-être des doses plus importantes eussent-elles été efficaces pour la pipéracilline/tazobactam, mais de telles posologies ne sont pas actuellement utilisées en pratique clinique.

Par ailleurs, la faible durée de l'expérience (48 heures) a peut-être désavantagé la pipéracilline/tazobactam. Cette durée de 48 heures a été choisie parce qu'elle correspond au délai critique pour l'efficacité des antibiotiques dans les infections à bactéries à Gram négatif : le délai nécessaire pour apprécier l'effet sur l'infection, et éventuellement adapter ou modifier le traitement en fonction.^{152,153}

Finalement, alors que les CMI n'explorent que l'effet bactériostatique d'un antibiotique, une perte d'activité bactéricide ne peut être exclue *in vivo*, du fait de la surexpression du système d'efflux MexAB-OprM.

En routine, l'hyperexpression de MexAB-OprM peut être facilement suspectée dès la lecture de l'antibiogramme, lorsque ce mécanisme n'est pas associé avec une hyperexpression de la céphalosporinase chromosomique AmpC ou avec une β -lactamase acquise. La souche concernée présente alors une sensibilité diminuée ou une résistance à la ticarcilline et l'aztréonam, alors qu'elle reste sensible à la pipéracilline et à la ceftazidime.⁸⁹ Notre travail montre qu'il s'agit de la situation où cette détection est particulièrement importante, pour le traitement des infections les plus sévères.

La détection de l'hyperexpression de MexAB-OprM est plus délicate en présence de plusieurs mécanismes de résistance affectant partiellement ou totalement les mêmes antibiotiques, notamment les β -lactamines et les fluoroquinolones. Mais l'efflux joue en général alors un rôle négligeable par rapport à d'autres mécanismes de résistance très puissants, comme les mécanismes enzymatiques par exemple.

La détection précise de ce mécanisme a été longtemps basée sur les techniques de Western-blot¹⁵⁴ ou de Northern-blot,⁹¹ qui ne sont pas des techniques pouvant être employées en routine dans un laboratoire de bactériologie. Plus récemment, une approche combinée a été mise au point, associant une analyse phénotypique de la sensibilité à la carbénicilline en

présence ou en l'absence d'un inhibiteur des pompes d'efflux (Phe-Arg- β -naphthylamide) pour la détection, suivie d'une confirmation par technique de PCR quantitative en temps réel du gène *mexA*.⁹²

Des travaux récents ont montré par ailleurs l'amélioration du pronostic pouvant être obtenue dans les infections sévères à *P. aeruginosa* avec des perfusions continues de β -lactamines, aussi bien de pipéracilline/tazobactam^{155,156} que de ceftazidime.^{157,158}

Au total, les discordances existant entre des CMI relativement basses de la pipéracilline/tazobactam en présence de surproduction de MexAB-OprM et l'absence d'effet clinique constaté sur ce modèle expérimental simulant les infections humaines les plus sévères plaident pour une lecture interprétative de l'antibiogramme en présence de ce mécanisme de résistance. Il est probablement recommandé de considérer que la pipéracilline/tazobactam est également concernée par ce mécanisme, et que cet antibiotique ne doit pas être utilisé dans les infections les plus sévères occasionnées par les bactéries présentant ce phénotype, au profit d'antibiotiques peu ou pas touchés comme la ceftazidime et l'imipénème.

Ces données confortent par ailleurs l'utilisation de la perfusion continue pour la ceftazidime dans les infections sévères à *Pseudomonas aeruginosa*.

***In-vivo* impact of the MexAB-OprM efflux system on β -lactams efficacy in
an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* infection**

David Butoille*, Cédric Jacqueline, Virginie Le Mabecque, Gilles Potel, Jocelyne Caillon

Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales
des Infections, EA 3826, Faculté de Médecine, Nantes F-44000, France

* Corresponding author :

Dr David Butoille, MD,

Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des Maladies Infectieuses, EA 3826, Faculté de Médecine, Nantes F-44000, France

david.boutoille1@aliceadsl.fr

david.boutoille@chu-nantes.fr

Phone and fax : (33) 240-41-2854

Abstract:

Objective: We studied the *in vivo* impact of the MexAB-OprM efflux system on antipseudomonal β -lactams.

Methods: In an experimental rabbit endocarditis model, we evaluated the respective activities of human simulated regimens of ticarcillin, piperacillin/tazobactam and ceftazidime on two isogenic mutants of PAO1: PAO4098E, overexpressing MexAB-OprM, and PAO4098ET which is OprM-depleted. Human daily doses of 15 and 18 grams were simulated for ticarcillin, as well as 12 and 16 grams for piperacillin/tazobactam, and 3 and 6 grams for ceftazidime, by intermittent administration or continuous infusion.

Results: Ticarcillin, piperacillin/tazobactam, and ceftazidime exhibited MICs on PAO4098E of respectively 64, 8 and 2 $\mu\text{g/mL}$, and 0.5, 0.5 and 1 $\mu\text{g/mL}$ on PAO4098ET. On PAO4098E, only the

high-dose regimens of ceftazidime were effective, with the most important effect being achieved by continuous infusion. In contrast, all the tested regimens were effective on PAO4098ET.

Conclusion: In the most difficult-to-treat infections due to *Pseudomonas aeruginosa* exhibiting the efflux system MexAB-OprM, ceftazidime, at high doses and by continuous infusion, should be preferred to ticarcillin and piperacillin/tazobactam.

Key words: MexA-MexB-OprM, *P. aeruginosa*, β -lactams

Running title: *in vivo* impact of efflux system on β -lactam efficacy in *Pseudomonas aeruginosa*

1. Introduction

Antibiotic resistance in *P. aeruginosa* is a consequence of interrelated factors including enzyme-mediated inactivation of β -lactam antibiotics via β -lactamases and alterations in the outer membrane permeability. Moreover, efflux pumps may play a critical role in the antibiotic resistance seen with *P. aeruginosa* [1,2]. Efflux pumps can extrude a broad range of antibiotic compounds from the bacterial cell, consequently decreasing their intracellular concentrations below those necessary for antibacterial efficacy. *NalB* mutants, overexpressing MexA-MexB-OprM efflux pumps, are associated with the broadest range of extruded antibiotics, including fluoroquinolones, tetracyclines and trimethoprim, but also β -lactams. According to recent works, these mutants may represent up to 46 % of the clinical strains of *P. aeruginosa* with reduced susceptibility to ticarcillin [3]. Nevertheless, little is known about the therapeutic impact of efflux pumps. Likewise, the risk of their *in vivo* emergence remains unclear, even if selection of *nalB* mutants has been reported after exposure to fluoroquinolones [4].

The aim of this work was to study the *in vivo* impact of efflux systems on different antipseudomonal β -lactams: ticarcillin, piperacillin/tazobactam, and ceftazidime. We compared the activity of different simulated human doses of ticarcillin, piperacillin/tazobactam and ceftazidime on two isogenic mutants: PAO4098E overexpressing MexAB-OprM, and PAO4098ET

depleted for OprM. The drugs were administered by intermittent bolus (ID) or by continuous infusion (CI). In this work, we used an experimental model of endocarditis, that is usually considered to be representative of the most severe-to-treat infections.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms

PAO4098E and PAO4098ET, two isogenic mutants of PAO1 have already been described [5,6]. These strains were obtained from Pr P. Plésiat. The mutants PAO4098E and PAO4098ET were obtained from PAO4098 (FP- met-9020 pro-9024 bla P9208), which produces a low, non-inducible level of β -lactamase. PAO4098E overexpresses the *mexA-mexB-oprM* operon, whereas PAO4098ET is OprM-deficient.

2.2. *In vitro* susceptibility testing

Minimal inhibitory concentrations (MIC) for ticarcillin, piperacillin, piperacillin/tazobactam and ceftazidime, were determined in Mueller-Hinton broth (supplemented with Ca^{2+} 25 $\mu\text{g/mL}$ and Mg^{2+} 12,5 $\mu\text{g/mL}$) by the microdilution technique. Overnight Mueller-Hinton broth cultures were used to prepare inocula of 10^5 CFU/mL. The MIC was defined as the lowest concentration of an antimicrobial agent preventing turbidity after 24 h of incubation at 37°C. According to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), clinical breakpoints are 16 $\mu\text{g/mL}$ for ticarcillin and piperacillin/tazobactam, and 8 $\mu\text{g/mL}$ for ceftazidime, on *Pseudomonas aeruginosa*.

2.3. Antibiotics

Clinical forms of antibiotics were used and supplied by: Wyeth-Lederle Laboratories (Catania, Italy) for piperacillin-tazobactam, GSK Laboratories (Marly-le-Roi, France) for ticarcillin and ceftazidime.

2.4. Endocarditis model

In vivo studies were performed on New Zealand white female rabbits (Cegav, St Mars-d'Egrenne, France) weighing ~ 2,5 kg, and were approved by the animal study committee of the University of Nantes. The animals were kept in individual cages and allowed free access to food and water throughout the experiment. Aortic valve endocarditis was induced as described previously [7]. After 24 h catheterisation, each animal was inoculated intravenously with 10^8 CFU of PAO4098E or PAO4098ET.

Animals were randomly assigned to a control group (i.e. no antibiotic) or treatment groups. Therapies were started 20 hours after bacterial inoculation, and antibiotics were given by catheter inserted into a marginal ear vein during 48 hours.

Then, animals were killed using a 100 mg intravenous (iv) bolus of thiopental before the treatment period (control group) or 48 hours after the onset of treatment.

2.5. Treatment groups

2.5.1. Human simulated antibiotic regimen

Human daily doses were simulated for ticarcillin at 15 and 18 grams per day, piperacillin/tazobactam at 12 and 16 grams per day, 3 and 6 grams for ceftazidime, by CI. The same total daily doses as those used for continuous infusion were also administered by ID: bolus administered every 8 hours by computer-controlled pumps that allowed flows to be adjusted to a profile mathematically defined in time. For ethical considerations (number of rabbits sacrificed), certain regimens were not assessed (ticarcillin 18 g/d ID, piperacillin/tazobactam 12 g/d ID, ceftazidime 3 g/d ID).

2.5.2. Antibiotic concentrations in sera

When animals were killed, blood samples were taken for each regimen and immediately centrifuged. Serum was frozen at -80°C until assay. Concentrations of ticarcillin, piperacillin, and ceftazidime were determined by HPLC. For ceftazidime, the lower limit of detection was 0.5

µg/mL. For ticarcillin and piperacillin, the lower limit of detection was 1 µg/mL. Precision was assessed by investigating the between-day reproducibility of drug concentrations: it was 4.6% for ceftazidime, and between 3.5 and 4.7% for ticarcillin and piperacillin.

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with StatView software (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). The main judgment criterion was the number of surviving bacteria in vegetations, expressed in log₁₀ cfu/g. The efficacies of the different groups were compared by analysis of variance (ANOVA) followed by a Scheffe's test for inter-group comparison. A *P* value of ≤ 0.05 was considered significant.

3. Results

3.1. *In vitro* susceptibility testing

Ticarcillin, piperacillin/tazobactam, and ceftazidime exhibited MICs of respectively 64, 8 and 2 µg/mL on PAO4098E, and 0.5, 0.5 and 1 µg/mL on PAO4098ET. MICs on the reference strain PAO1 are: 16 µg/mL for ticarcillin, 4 µg/mL for piperacillin/tazobactam, and 1 µg/mL for ceftazidime.

Animal studies and antibiotic assays

Comparative activities of each regimen on PAO4098E and PAO4098ET are shown in the table. *In vivo* efficacy of each regimen was assessed by measuring the number of surviving bacteria per gram of vegetation. Comparisons are valuable only between the different treatment groups and the controls for a given strain. For each antibiotic, the lower doses simulated the usual regimen recommended in human therapeutics. The higher doses were equivalent to regimen sometimes used in severe infections, as those due to *P. aeruginosa*, especially in neutropenic patients and/or in intensive care units.

The most striking result is that, on PAO4098E, overexpressing the efflux system MexAB-OprM, ceftazidime, provided it was administered at high doses, was the only regimen able to achieve a bactericidal activity, in this endocarditis model. Despite the significant efficacy of ceftazidime by intermittent dosing, continuous infusion appeared superior, when both regimens were compared with each other ($p = 0.0022$).

3.2. Antibiotic concentrations in sera

We determined *in vivo* concentrations for ticarcillin, piperacillin and ceftazidime, on blood samples obtained at steady state by continuous infusion, immediately after killing the animals, by intracardiac puncture. Concentrations were $53 \pm 13.5 \mu\text{g/mL}$ for ticarcillin simulated at 15 g/d, $50 \pm 22.6 \mu\text{g/mL}$ for piperacillin/tazobactam simulated at 12 g/d, $122 \pm 58.4 \mu\text{g/L}$ for piperacillin/tazobactam at 16 g/d, $22.7 \pm 12.2 \mu\text{g/mL}$ for ceftazidime at 3 g/d, and $34.8 \pm 15.5 \mu\text{g/L}$ for ceftazidime at 6 g/d. For intermittent administration, we used a computer-controlled infusion simulating human pharmacokinetics, taking into account the serum concentrations obtained in previous clinical studies [8,9].

4. Discussion

Although MexAB-oprM overexpression has been shown to reduce the *in vitro* susceptibility of *P.aeruginosa* to β -lactams [6,10], little is known about its therapeutic *in vivo* impact, in terms of bactericidal activity, especially in the most difficult-to-treat infections, e.g. in intensive care units, in onco-haematology departments, or in patients with cystic fibrosis. Comparative trials in humans are difficult because of the severity and the high mortality rate of these infections. So, experimental endocarditis, considered to be a discriminative model for severe septicaemic infections, is appropriate to approach these critical settings. Our purpose was to compare the *in vivo* activity of three antipseudomonal agents in severe infections due to MexAB-OprM-overproducing mutants. For this, we chose the mutants PAO4098E and PAO4098ET, because the

low basal expression of the chromosomal cephalosporinase permitted to study only the effect of MexAB-OprM, without interferences from the other mechanisms of resistance to antibiotics. In clinical settings, overproduction of MexAB-OprM is frequent [11]. In hospitalization conditions, where a selective pressure due to broad spectrum antibiotics is high, this mechanism acts synergistically with others, e.g. β -lactamases. MexAB-OprM-overproducing strains may concern up to 46 % of *Pseudomonas aeruginosa* isolates, from those exhibiting only a reduced susceptibility to ticarcillin to those with high-level resistance to β -lactams [3]. The mutants used in this study accurately illustrate the specific effect of MexAB-OprM on *Pseudomonas aeruginosa* resistance to β -lactams.

Since for PAO4098ET MICs of the studied drugs were very low, because of the deletion of genes encoding for OprM and AmpC, every therapeutic regimen achieved the sterilization of the vegetations. For the PAO4098E strain, overexpressing MexAB-OprM, the only effective antibiotic was ceftazidime at a high daily dose (6 g/d). The most efficacious regimen was the continuous infusion. The MIC of ticarcillin (64 μ g/mL) was too high to obtain any effect in this difficult model of rabbit endocarditis. On the other hand, since the MIC of piperacillin/tazobactam was 8 μ g/mL (in the range of “susceptible” strains), an *in vivo* effect could be expected, according to the clinical breakpoints of EUCAST. Nevertheless, no effect was observed, even when administering high doses, and/or by continuous infusion, and despite high blood steady-state concentrations (122 ± 58.4 μ g/mL, i.e. 15 times the MIC). It has been shown that, on severe infections due to *P. aeruginosa*, for penicillins and cephalosporins, not only the $T > MIC$ but also the antibiotic concentration/MIC are important criteria for improving survival [12]. In our work, only a high dosage (6 g/d) of ceftazidime was able to achieve bactericidal activity, and the best regimen was the continuous infusion. The concentrations obtained in our model are in accordance with those observed in human blood samples. Hence, in severe infections and in intensive care units, blood concentrations are more and more realized to monitor the antibiotic administration, since these determinations are now routinely performed. Maybe higher doses could have been efficient for

piperacillin/tazobactam: we didn't study such regimens, since there are no data in human therapeutics for doses above 18 grams per day. Furthermore, the short duration of the experiment (48 h) was possibly an additional limitation. Since this model illustrates a severe septicemic *Pseudomonas aeruginosa* infection, this duration of treatment was chosen because it appeared to be a critical end-point for prognosis in several clinical prospective studies [13, 14]. Finally, whereas MICs explore the bacteriostatic property of a molecule, a loss of bactericidal activity *in vivo* can not be excluded, due to the overexpression of the efflux system.

In routine, OprM overproduction can be easily suspected at the reading of the antibiogram by the clinician or the clinical microbiologist, when it's not associated with overexpression of chromosomally encoded AmpC cephalosporinase or an acquired β -lactamase: then, the strain exhibits a decreased susceptibility or resistance to ticarcillin and aztreonam whereas it remains susceptible to piperacillin and ceftazidime [15]. This is, according to our work, the situation where this detection is relevant for the choice of antibiotic treatment. Its detection is more difficult in presence of several mechanisms of resistance affecting partly or totally the same drugs, but less relevant in comparison with powerful enzymatic mechanisms of resistance. Accurate detection has long relied on western-blot [16] or northern-blot [17] analysis, which can't be easily performed in the clinical laboratory. A combined method was recently developed, associating a phenotypic analysis of carbenicillin susceptibility in presence or absence of an inhibitor of efflux pumps (Phe-Arg- β -naphthylamide) for detection, followed by a quantitative real-time PCR of *mexA* for confirmation [18].

Recent works have reported that improved outcomes may be achieved by administering continuous infusion of piperacillin-tazobactam therapy to critically ill patients with susceptible *P. aeruginosa* infections [19, 20], as well as for ceftazidime [21, 22]. Our study strongly suggests that an overexpression of the efflux system MexAB-OprM should discourage the use of piperacillin/tazobactam in the most severe infections due to strains of PA exhibiting this

mechanism of resistance. In these situations, high doses of ceftazidime, by continuous infusion, should be preferred.

5. Conclusion:

Our work shows that MexAB-OprM overexpression in *P. aeruginosa* may be responsible for therapeutic failures with standard antipseudomonal treatments, in the most difficult-to-treat infections. It is highly important to recognize these mechanisms since their impact on the antibiotics activity appears to be major. In severe infections due to *P. aeruginosa* expressing this mechanism of resistance, among antipseudomonal penicillins and cephalosporins, high doses, and continuous infusion of ceftazidime should be preferred in critically-ill patients.

Table: Antibacterial activity of drugs in the rabbit endocarditis model after 48 hours of treatment.

<i>Antibiotic regimen</i>	Log₁₀ cfu/g of vegetations	
	(mean ± SD [no. of rabbits])	
	PAO4098E	PAO4098ET
Controls	7.17 ± 0.2 [10]	6.6 ± 0.8 [10]
Ticarcillin 15 g/d CI	6.2 ± 0.4 [6]	Sterile [6]
Ticarcillin 15 g/d ID	6.4 ± 0.5 [6]	Sterile [6]
Ticarcillin 18 g/d CI	6.1 ± 1.2 [6]	Sterile [6]
Piperacillin/tazobactam 12 g/d CI	6.0 ± 1.2 [6]	Sterile [6]
Piperacillin/tazobactam 16 g/d CI	6.0 ± 1.2 [6]	Sterile [6]
Piperacillin/tazobactam 16 g/d ID	6.2 ± 1.2 [6]	Sterile [6]
Ceftazidime 3 g/d CI	5.9 ± 0.8 [6]	Sterile [6]
Ceftazidime 6 g/d CI	2.7 ± 0.4 [6] * [§]	Sterile [6]
Ceftazidime 6 g/d ID	4.8 ± 0.7 [6] *	Sterile [6]
*p<0,01 vs control group §p<0,01 vs intermittent administration		

CI : continuous infusion ID : intermittent administration

References:

- [1] Aeschlimann JR. The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. *Pharmacotherapy* 2003;23:916-24.
- [2] Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:247-50.
- [3] Hocquet D, Roussel-Delvallez M, Cavallo JD et al. MexAB-OprM- and MexXY-overproducing mutants are very prevalent among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to ticarcillin. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1582-3.
- [4] Kohler T, Michea-Hamzehpour M, Plesiat P et al. Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2540-3.
- [5] Kohler T, Kok M, Michea-Hamzehpour M et al. Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2288-90.
- [6] Li XZ, Livermore DM, Nikaido H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1732-41.
- [7] Perlman BB, Freedman LR. Experimental endocarditis. II. Staphylococcal infection of the aortic valve following placement of a polyethylene catheter in the left side of the heart. *Yale J Biol Med* 1971;44:206-13.
- [8] Cousson J, Floch T, Vernet-Garnier V et al. [Pharmacodynamic interest of ceftazidime continuous infusion vs intermittent bolus administration in patients with severe nosocomial pneumonia]. *Pathol Biol (Paris)* 2005;53:546-50.

- [9] Drusano GL, Joshi J, Forrest A et al. Pharmacokinetics of ceftazidime, alone or in combination with piperacillin or tobramycin, in the sera of cancer patients. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;27:605-7.
- [10] Li XZ, Nikaido H, Poole K. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1948-53.
- [11] Zih-Zarifi I, Llanes C, Köhler T et al. In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:287-91.
- [12] Robaux MA, Dube L, Caillon J et al. In vivo efficacy of continuous infusion versus intermittent dosing of ceftazidime alone or in combination with amikacin relative to human kinetic profiles in a *Pseudomonas aeruginosa* rabbit endocarditis model. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:617-22.
- [13] Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ et al. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1306-11.
- [14] Osman S, Ward S, Fraser VJ et al. Hospital mortality for patients with bacteremia due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 2004;125:607-16.
- [15] Cavallo JD, Plesiat P, Couetdic G et al. Mechanisms of β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence of OprM-overproducing strains in a French multicentre study (1997). *J Antimicrob Chemother* 2002;50:1039-43.
- [16] Llanes C, Hocquet D, Vogue C et al. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1792-1802.
- [17] De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ et al. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1761-70.

- [18] Mesaros N, Glupczynski Y, Avrain L et al. J Antimicrob Chemother 2007;59:378-86.
- [19] Lodise TP, Jr., Lomaestro B, Drusano GL. Piperacillin-tazobactam for *Pseudomonas aeruginosa* infection: clinical implications of an extended-infusion dosing strategy. Clin Infect Dis 2007;44:357-63.
- [20] Mattoes HM, Capitano B, Kim MK et al. Comparative pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of piperacillin/tazobactam 3.375G Q4H and 4.5G Q6H. Chemotherapy 2002;48:59-63.
- [21] Alou L, Aguilar L, Sevillano D et al. Is there a pharmacodynamic need for the use of continuous versus intermittent infusion with ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa*? An in vitro pharmacodynamic model. J Antimicrob Chemother 2005;55:209-13.
- [22] Boselli E, Breilh D, Rimmelé T et al. Plasma and lung concentrations of ceftazidime administered in continuous infusion to critically ill patients with severe nosocomial pneumonia. Int Care Med 2004;30:989-91.

Acknowledgements

We thank Pr P. Plésiat for his contributions to this work.

Funding

We did not receive any ongoing funding for this study.

2^{ème} étude : Impact *in vivo* et *in vitro* du système d'efflux MexAB-OprM sur l'expression de la virulence chez *Pseudomonas aeruginosa*

Ce travail a donné lieu à l'article suivant :

David Boutoille, Julien Buyck, Jocelyne Caillon, Gilles Potel, Patrick Plésiat, Benoît Guery, Karine Faure. MexAB-OprM-overproduction and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: assessment *in vitro* and in experimental models of lung infection.

Soumis au Journal of Infectious Diseases.

Après avoir étudié l'influence de MexAB-OprM sur le traitement antibiotique des infections sévères à *P. aeruginosa*, nous avons évalué dans la seconde partie de ce travail l'impact de ce système d'efflux sur l'expression de la virulence bactérienne. Pour cela, nous avons utilisé des couples de souches de *P. aeruginosa* isolées en clinique humaine, chaque couple étant isogénique et comprenant une souche sauvage et une souche surexprimant le système d'efflux MexAB-OprM. Toutes les comparaisons ont été réalisées à chaque fois entre les deux déterminants de chaque couple.

Dans un premier temps, nous avons travaillé *in vivo*. Pour cela, nous avons utilisé le modèle murin de pneumonie. Cette partie du travail a d'abord consisté en des études de survie après création d'une pneumonie aiguë expérimentale. Puis, dans ce modèle de pneumonie aiguë, nous avons évalué l'intensité des lésions pulmonaires par étude de la perméabilité endothéliale et du rapport poids mouillé de poumon sur poids sec (wet / dry). Puis, nous avons évalué l'intensité des lésions pulmonaires cette fois dans un modèle d'infection pulmonaire chronique. La différence entre ces deux modèles tient dans le délai entre l'inoculation bactérienne et le moment de l'évaluation lésionnelle : 16 heures pour le modèle d'infection aiguë, contre 24 heures, 4 jours et 6 jours dans le modèle d'infection

chronique. Il nous a donc semblé important d'utiliser ces deux modèles, de façon à se mettre dans les conditions optimales pour apprécier une éventuelle différence de virulence entre les souches sauvages et les souches surexprimant MexAB-OprM. En effet, lors de la phase aiguë de l'infection, c'est essentiellement le système de sécrétion de type III qui est mis en jeu par la bactérie ; puis seulement ensuite, au bout de 6 à 7 heures, les phénomènes de quorum-sensing entrent en oeuvre.

Ensuite, afin de préciser les résultats obtenus *in vivo*, nous avons travaillé *in vitro*, sur les relations éventuelles entre MexAB-OprM et le système de sécrétion de type III d'une part, et d'autre part entre MexAB-OprM et les facteurs de virulence dépendant du quorum-sensing.

Pour étudier le système de sécrétion de type III, nous avons travaillé sur cultures cellulaires infectées par les différentes souches bactériennes. Nous avons également déterminé par techniques de biologie moléculaire le génotype exotoxinique des souches bactériennes étudiées : *exoS* ou *exoU*. En effet l'intensité de la cytotoxicité peut être variable en fonction du type d'exotoxine sécrétée.

L'étude des relations entre MexAB-OprM et les facteurs de virulence dépendant du quorum-sensing nous a amené à déterminer les niveaux de production, pour chaque souche bactérienne, des facteurs suivants : pyocyanine, élastase, rhamnolipides et phospholipase C. Nous avons également quantifié la production de deux des principales homosérine-lactones impliquées dans le quorum-sensing : la N-(3-oxododecanoyl) homosérine-lactone (3OC12-HSL) et la N-butyryl homosérine-lactone (C4-HSL).

Après l'exposition des résultats obtenus par ces différentes techniques, la discussion portera sur ce qu'on peut en déduire de l'impact du système MexAB-OprM sur la virulence.

1- Influence du système d'efflux MexAB-OprM sur les CMI des antibiotiques.

Les souches testées pour cette deuxième partie du travail de thèse sont les deux souches de laboratoire PAO4098WT et PAO4098E, ainsi que les différents couples isolés en clinique, dont les caractéristiques sont détaillées dans la partie « Matériels et méthodes » pp. 39-40. Les concentrations minimales inhibitrices des différents antibiotiques testés sur les souches utilisées dans ce troisième volet de notre travail sont représentées dans le **Tableau 8**, p. 87. Les concentrations critiques définies par l'EUCAST pour déterminer la sensibilité clinique de *P. aeruginosa* envers chacun des antibiotiques testés sont rappelées également.³⁷ Ces souches ont déjà été caractérisées et publiées.¹⁴¹ Pour chacune des souches de ces paires clonales, le niveau de production de β -lactamase et les protéines de la membrane externe autres qu'OprM sont strictement identiques. Seul le niveau d'expression de MexAB-OprM est différent au sein de chaque paire : basal pour la souche sauvage, surexprimé pour les mutats MexAB-OprM.

Résultats :

Pour chaque couple isogénique, on constate l'influence de MexAB-OprM sur les CMI, tout d'abord des β -lactamines : la ticarcilline et l'aztréonam sont les plus touchées avec une augmentation de CMI d'un facteur 4 à 8, alors que les CMI de la ceftazidime et du céfépime n'augmentent que d'un facteur 2 à 4. L'imipénème qui pénètre la membrane externe de *P. aeruginosa* exclusivement par la porine OprD n'est pas touché par l'efflux, contrairement au méropénème qui voit ses CMI augmenter d'un facteur 8.

Tableau 8 : CMI (en µg/mL) des antibiotiques testés en fonction de la présence (OprM) ou pas (wt) d'un efflux MexAB-OprM.

	CMI (µg/ml)										
	EUCAST breakpoints	PAO4098wt	PAO4098E (OprM)	PA14 (wt)	PA12 (OprM)	PA70 (wt)	PA92 (OprM)	PA96 (wt)	PA109 (OprM)	PA141 (wt)	PA128 (OprM)
TIC	16 µg/ml	16	64	16	128	32	128	16	128	16	128
CAZ	8 µg/ml	0,5	2	2	8	2	4	2	4	2	8
ATM	1 µg/ml	2	8	4	32	4	32	4	32	4	32
FEP	8 µg/ml	2	4	4	8	8	16	8	8	8	8
IPM	4 µg/ml	1	0,5	1	0,5	16	8	1	1	1	0,5
MEM	2 µg/ml	0,5	4	0,5	4	4	32	0,5	4	0,5	1
Nal		128	1024	128	1024	128	1024	128	1024	128	1024

TIC : ticarcilline ; CAZ : ceftazidime ; ATM : aztreonam ; FEP : céfépime ; IMP : imipénème ; MEM : méropénème ; Nal : acide nalidixique

2- Influence de MexAB-OprM sur la survie dans le modèle murin d'infection pulmonaire aiguë à *Pseudomonas aeruginosa*.

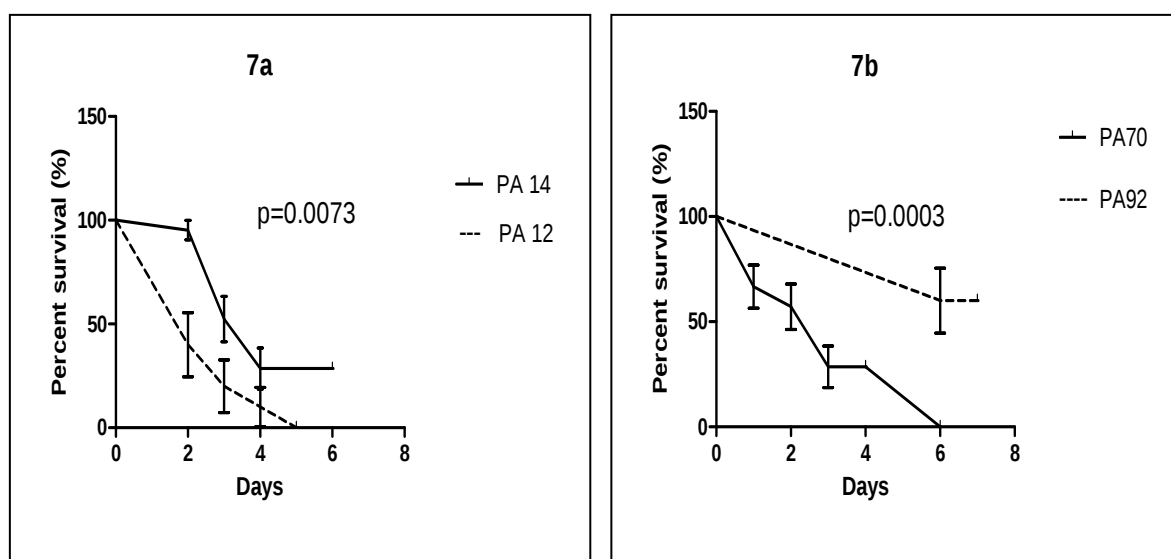
2a- PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Une infection pulmonaire aiguë a été réalisée par instillation endotrachéale de 70 µL d'une solution bactérienne de 10⁹ UFC/mL. Des groupes de 10 souris ont été infectées avec les souches suivantes, décrites dans le **Tableau 8**, p. 87 : PAO4098WT, PAO4098E, PA14 et PA12, PA70 et PA92. Pour chaque groupe, la mortalité a été étudiée au jour le jour, jusqu'à 7 jours après administration de l'inoculum bactérien.

2b- RESULTATS

Les résultats obtenus pour les couples de souches cliniques PA14/12 et PA70/92 sont représentés en **Figures 7a et 7b**, p. 89. Les souches PA12 et PA92 sont les mutants isogéniques surexprimant MexAB-OprM, isolés respectivement à partir des souches sauvages PA14 et PA70. Des différences significatives ont été constatées entre les souches sauvages et leurs mutants isogéniques surexprimant MexAB-OprM, mais les résultats se sont avérés contraires entre le couple PA14/12 et le couple PA70/92. Ainsi, au sein du couple 14/12, le mutant MexAB-OprM PA12 est responsable d'une mortalité plus importante et plus rapide que la souche isogénique sauvage PA14 ($p = 0,0073$), alors qu'on obtient l'inverse entre PA70 et PA92 ($p = 0,0003$).

Figures 7a et 7b : Taux de survie cumulés après instillation endotrachéale de PA14/12 (6a) et PA70/92 (6b).



Les souches sauvages sont représentées en trait plein, tandis que les souches surexprimant MexAB-OprM sont représentées en trait discontinu. Dix souris ont été enrôlées dans chaque groupe. Les taux de survie cumulés ont été comparés en utilisant un test de log-rank.

3- Influence de MexAB-OprM sur l'intensité des lésions pulmonaires dans le modèle murin de pneumonie aiguë

3a- PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Une infection pulmonaire aiguë a été réalisée par instillation endotrachéale de 70 μ L d'une solution bactérienne de 10^9 UFC/mL. Les souris infectées, ainsi que le groupe de souris témoins non infectées, ont été sacrifiées au bout de 16 heures.

Les groupes étudiés, comprenant un effectif de 10 souris chacun, étaient les suivants : un groupe témoin, ainsi que des groupes de souris infectées par les

souches bactériennes PAO4098WT, PAO4098E, PA14, PA12, PA70 et PA92 (décrites dans le tableau 8, p. 89).

Pour chaque groupe d'animaux, pour évaluer l'intensité des lésions pulmonaires, les paramètres suivants ont été étudiés (description de la méthodologie dans la section « Matériels et méthodes », pp. 42-45) :

- Numérations bactériennes dans les prélèvements sanguins et le broyat de poumon.
- Perméabilité endothéliale, déterminée par méthode isotopique, avec de l'albumine marquée à l'iode 125.
- Etude gravimétrique de l'œdème pulmonaire par la méthode du wet/dry (ratio poids mouillé de poumon sur poids sec)

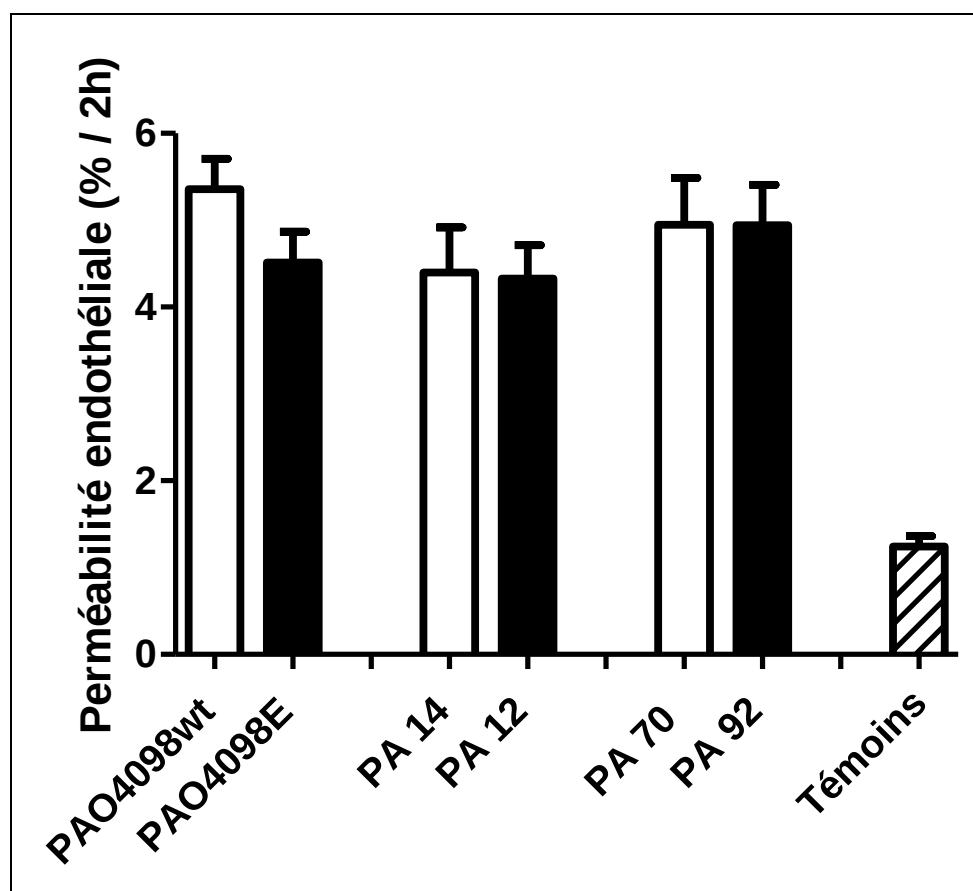
3b- RESULTATS

Les résultats de **perméabilité endothéliale** obtenus 16 heures après instillation bactérienne sont représentés en **Figure 8**, p. 91.

Les résultats sont représentés sous forme de moyennes $\pm$ erreur standard (indiquée par les barres d'erreur). Les barres noires représentent les souris infectées par les souches surexprimant MexAB-OprM, tandis que les barres blanches représentent les souris infectées par les souches sauvages. La perméabilité endothéliale est exprimée comme l'évaluation sur deux heures du flux d'albumine marquée à l'iode 125 à travers la barrière endothéliale, avec le ratio de la fraction alvéolaire sur la fraction plasmatique du marqueur à la fin du protocole.

On constate que le niveau de perméabilité endothéliale était plus important pour toutes les souris infectées que pour les souris témoins. Par contre, aucune différence n'a été constatée au sein de chacun des couples étudiés.

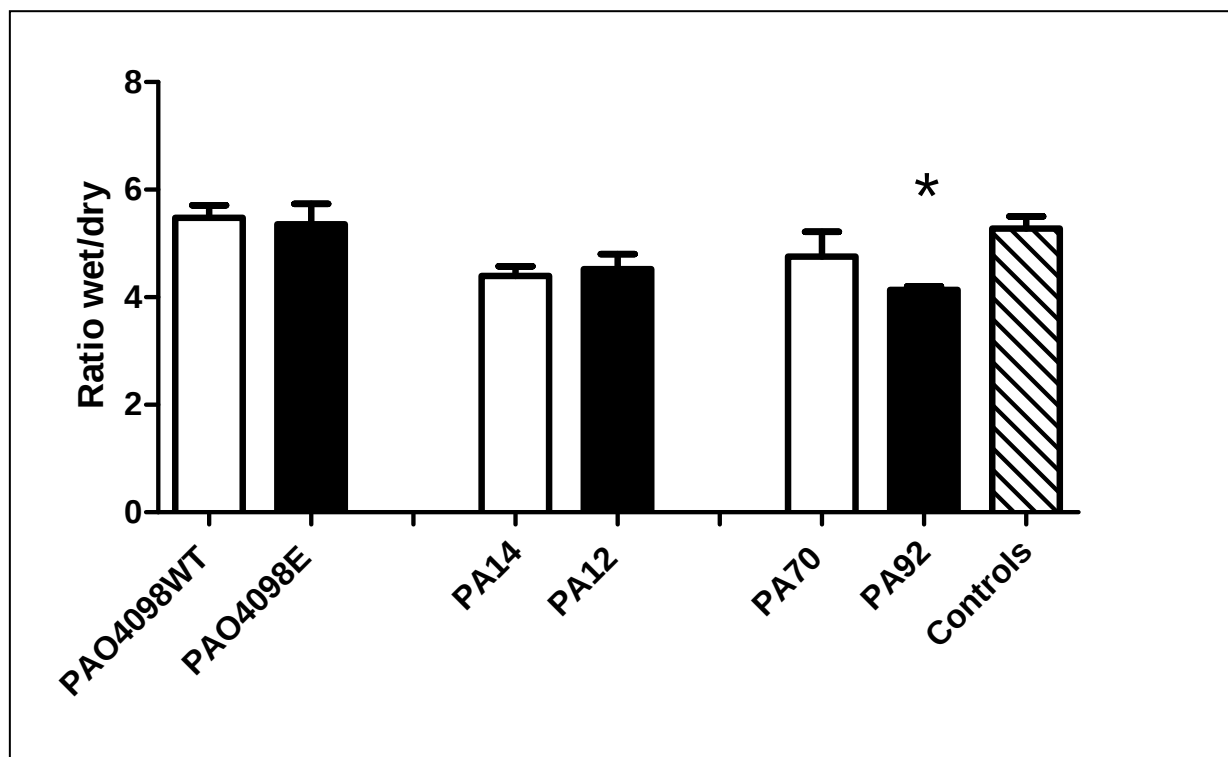
Figure 8 : Perméabilité endothéliale déterminée 16 heures après instillations bactérienne.



Les résultats du rapport poids sec des poumons sur poids mouillé (wet/dry) sont représentés en **figure 9**, p. 92.

L'étude du wet/dry n'a pas permis d'objectiver de différences significatives en 16 heures, d'une part entre les souris infectées et les souris témoins (à l'exception du groupe de souris infectées par PA92), et d'autre part entre les couples isogéniques.

Figure 9 : Rapports wet/dry des poumons obtenus 16 heures après instillation bactérienne

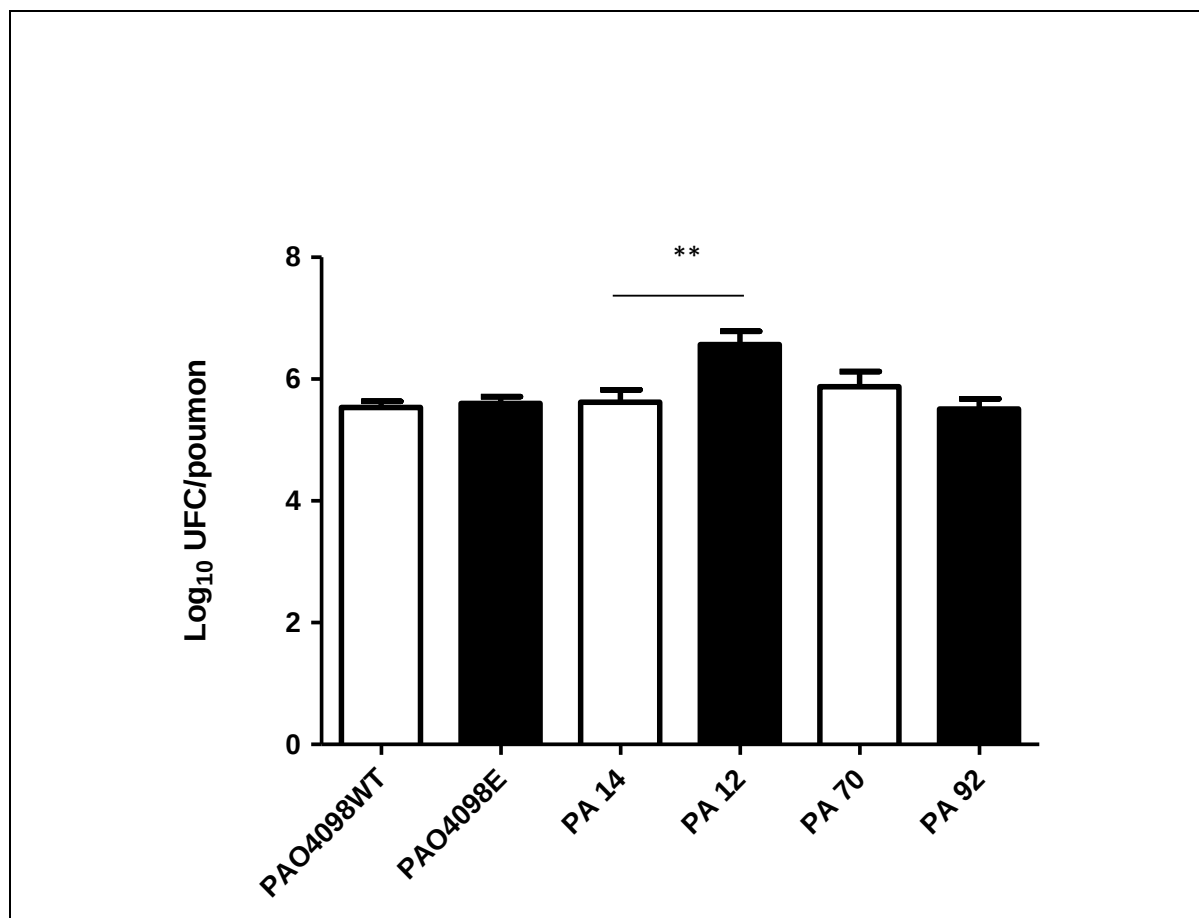


*Rapport wet/dry significativement différent par rapport au groupe contrôle.

Les charges bactériennes obtenues dans les poumons 16 heures après instillation bactérienne sont représentées en **Figure 10**, p. 93.

La seule différence constatée a été l'existence d'une charge bactérienne plus importante dans les poumons des souris infectées par le mutant MexAB-OprM PA12 par rapport à la souche sauvage PA14.

Figure 10 : Charges bactériennes obtenues dans les poumons 16 heures après instillation bactérienne.



** Différence significative entre les souches d'un même couple.

En conclusion : dans ce modèle murin de pneumonie aiguë, le système d'efflux MexAB-OprM n'induit pas de modifications significatives des paramètres lésionnels pulmonaires.

4- Influence de MexAB-OprM sur l'intensité des lésions pulmonaires dans le modèle murin d'infection chronique

4a- PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Des groupes de trente souris ont reçu une instillation endotrachéale de 60 µL d'une suspension de bactéries incorporées en billes d'agarose.

Des groupes de 10 souris ont été sacrifiés à 24 heures, 4 jours et 6 jours, après instillation des bactéries, pour évaluation des lésions pulmonaires selon les mêmes modalités que pour le modèle d'infection aiguë (description dans la section « Matériels et méthodes » pp. 42-46) :

- Numérations bactériennes dans les prélèvements sanguins et le broyat de poumon.
- Perméabilité endothéliale, déterminée par méthode isotopique, à l'albumine 125.
- Etude gravimétrique de l'œdème pulmonaire par la méthode du wet/dry.

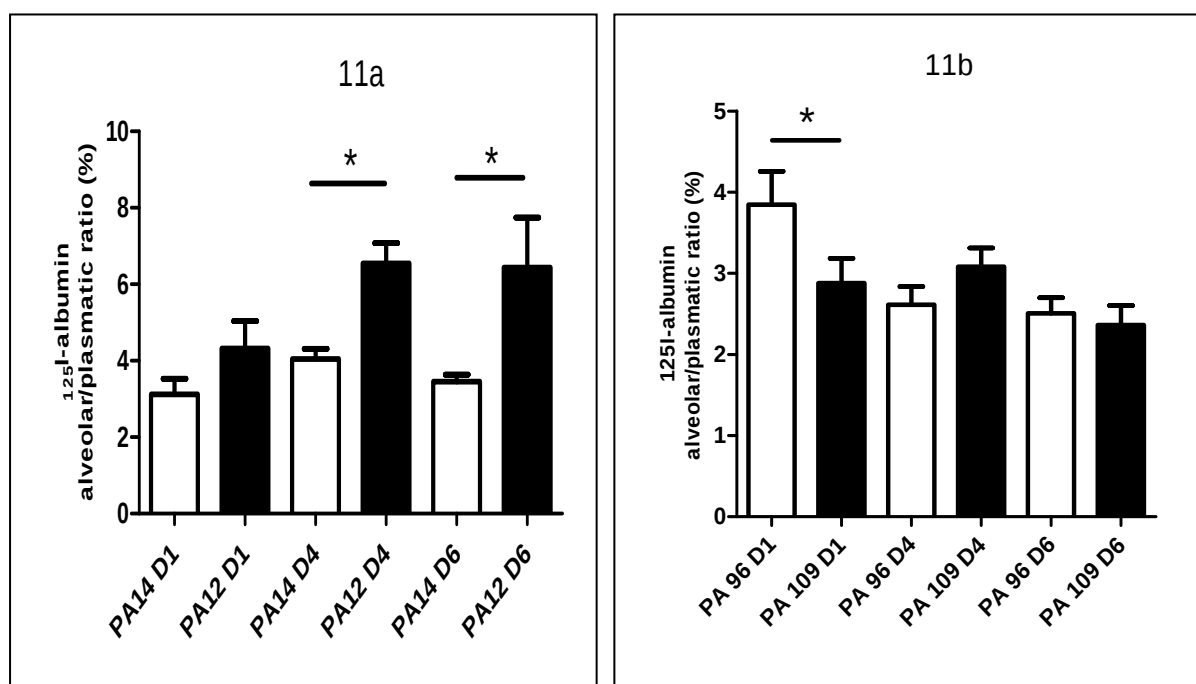
Les groupes suivants ont été étudiés :

- Groupe PA14
- Groupe PA12 : mutant isogénique de PA14 surproduisant MexAB-OprM.
- Groupe PA70
- Groupe PA92 : mutant isogénique de PA70 surproduisant MexAB-OprM.
- Groupe 96
- Groupe 109 : mutant isogénique de PA96 surproduisant MexAB-OprM.

4b- RESULTATS

Les résultats de la perméabilité endothéliale évaluée à 24 heures, puis 4 jours et 6 jours après l'instillation bactérienne sont représentés en **Figures 11a et 11b**.

Figures 11a et 11b : Détermination de la perméabilité endothéliale à J1 (D1), à J4 (D4) et J6 (D6) après instillation bactérienne, pour les souris infectées par le couple de souches PA14 / PA12 (11a) et le couple PA96 / PA109 (11b).



*Différence significative, au jour donné, entre les souris infectées par le mutant MexAB-OprM et celles infectées par la souche sauvage.

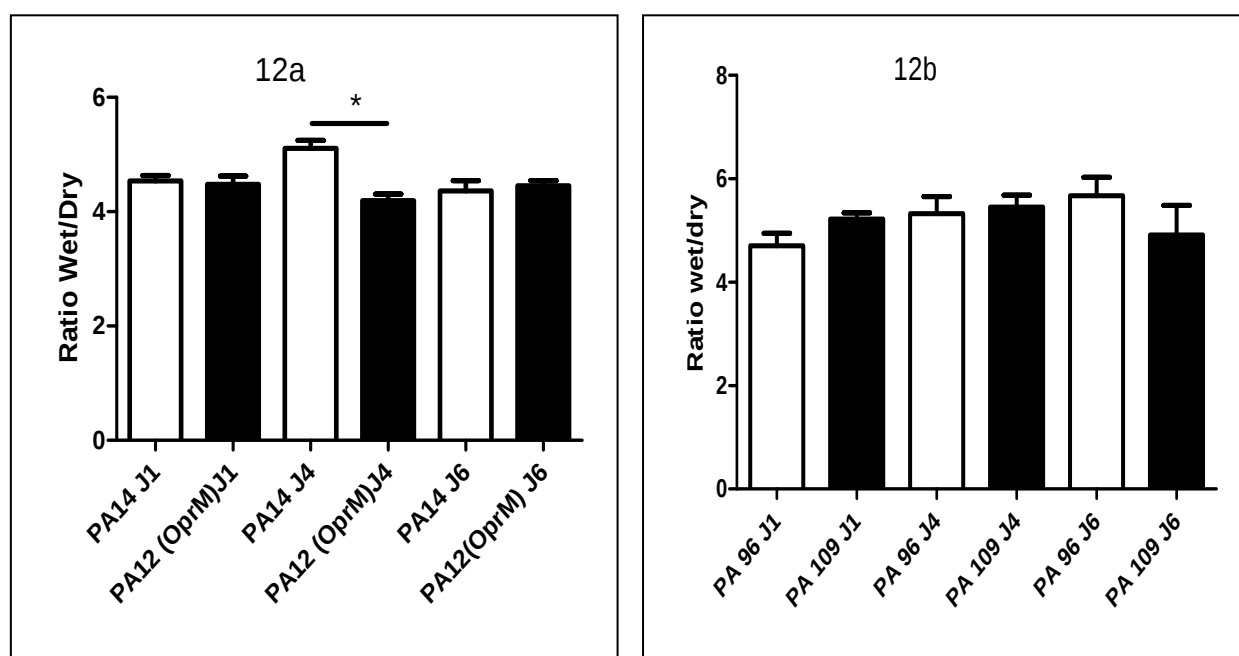
Les données sont exprimées sous forme de moyennes $\pm$ erreur standard (indiquée par les barres d'erreur). Les barres noires représentent les souris infectées par les souches surexprimant MexAB-OprM, tandis que les barres blanches représentent les souris infectées par les souches sauvages. La perméabilité endothéliale est exprimée comme l'évaluation sur deux heures du flux d'albumine marquée à l'iode 125 à travers la barrière endothéliale, avec le ratio de la fraction alvéolaire sur la fraction plasmatique du marqueur à la fin du protocole.

Au sein du couple PA14 / PA12, le mutant PA12 surexprimant MexAB-OprM a généré des troubles de la perméabilité endothéliale significativement plus importants que la souche-mère PA14, à J4 et J6. A l'inverse, la souche sauvage PA96 occasionne des troubles de la perméabilité plus importants que son mutant MexAB-

OprM PA109 à J1, puis les deux souches occasionnent ensuite des troubles équivalents à J4 et J6.

Les résultats du ratio wet/dry évalué à 24 heures, puis 4 jours et 6 jours après l'instillation bactérienne sont représentés en **Figures 12a et 12b**.

Figures 12a et 12b : Détermination du ratio wet/dry des poumons à J1 (D1), à J4 (D4) et J6 (D6) après instillation bactérienne, pour les souris infectées par le couple de souches PA14 / PA12 (12a) et le couple PA96 / PA109 (12b).

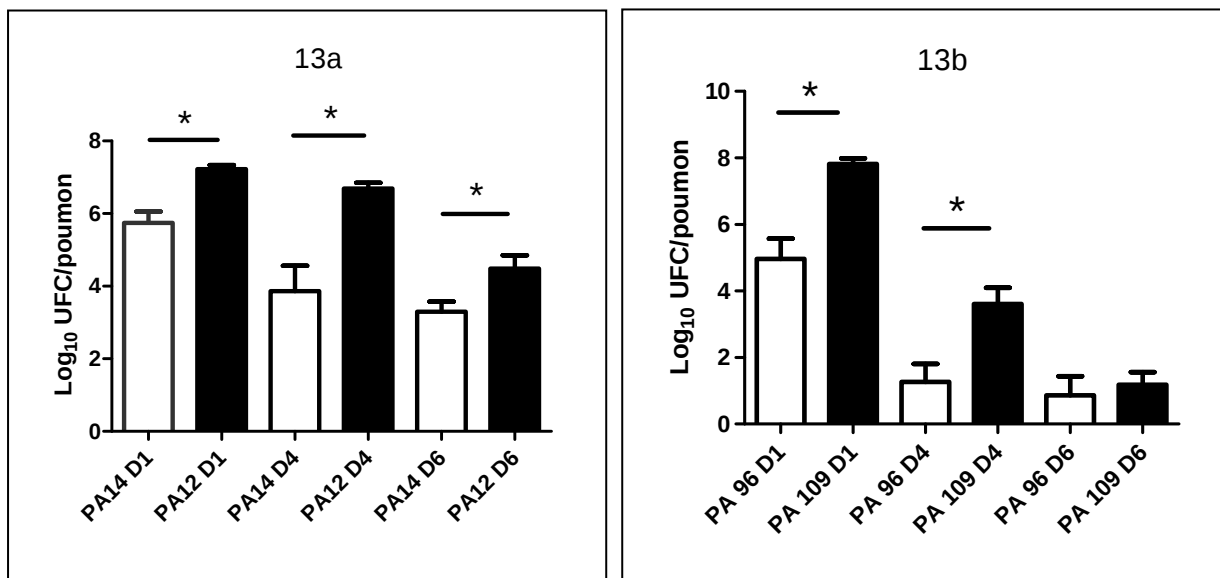


*Différence significative, au jour donné, entre les souris infectées par le mutant MexAB-OprM et celles infectées par la souche sauvage.

A part à J4 où PA14 a été responsable d'un rapport wet/dry des poumons plus important que celui occasionné par son mutant MexAB-OprM PA12, aucune différence n'a été notée au sein des deux couples étudiés.

Les résultats de la charge bactérienne pulmonaire évaluée à 24 heures, puis 4 jours et 6 jours après l'instillation bactérienne sont représentés en **Figures 13a et 13b**.

Figures 13a et 13b : Détermination de la charge bactérienne pulmonaire à J1 (D1), à J4 (D4) et J6 (D6) après instillation bactérienne, pour les souris infectées par le couple de souches PA14 / PA12 (13a) et le couple PA96 / PA109 (13b).



*Différence significative, au jour donné, entre les souris infectées par le mutant MexAB-OprM et celles infectées par la souche sauvage.

PA12, la souche surexprimant MexAB-OprM a généré des charges bactériennes significativement plus importantes tout au long de l'expérience que sa souche apparentée sauvage PA14. Et surtout la charge bactérienne s'est maintenue à un haut niveau tout au long de l'expérience.

Par contre, si PA109, qui surexprime MexAB-OprM, a bien donné des charges bactériennes plus élevées que la souche sauvage PA96 à J1 et J4, ces charges bactériennes ont très rapidement décru à des niveaux faibles dès J4.

Au total, sur ce modèle murin d'infection pulmonaire chronique, nous avons montré qu'il existe une influence de MexAB-OprM sur les différents paramètres lésionnels pulmonaires, puisque de nombreuses différences significatives sont objectivées entre les mutants MexAB-OprM et les souches sauvages dont ces mutants sont issus. Par contre, l'influence de MexAB-OprM ne peut être prédite, et s'exerce soit dans le sens d'une augmentation des lésions, soit au contraire dans le sens d'une diminution de l'intensité lésionnelle, en fonction du couple étudié.

5- Etude *in vitro* de l'impact de MexAB-OprM sur le système de sécrétion de type III

5a- PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Etude de la cytotoxicité induite par les bactéries sur cultures cellulaire

Le niveau de relargage de LDH par les cultures cellulaires co-incubées en présence des différentes bactéries a été déterminé après 8 heures pour l'ensemble des couples isogéniques étudiés. L'ensemble de la technique est décrite dans la section « Matériels et méthodes », pp. 45-46.

Détermination du génotype *exoS* ou *exoU*

Nous avons déterminé, par technique de Western-blot le génotype *exoS* ou *exoU* des souches étudiées, ExoS et ExoU étant les deux principales protéines du système de sécrétion de type III impliquées dans la pneumonie à *P. aeruginosa*.¹⁵⁹ La technique employée est décrite dans la section « Matériels et méthodes » pp. 46-48.

5b- RESULTATS

Les résultats obtenus sont exposés dans le **Tableau 9**, p. 100.

Un seul couple, PA14 / PA12 sécrétait ExoU, tandis que les couples PA96 / PA109 et PA141 / PA 128 sécrétaient ExoS. La souche de référence PAO1, connue pour sécréter ExoS et non ExoU, a servi de contrôle pour la technique. Le couple PAO4098WT / PAO4098E, qui dérive de PAO1, était tout logiquement ExoS+. Enfin, nous n'avons trouvé ni ExoS ni ExoU pour le couple PA70 / PA92.

Ces résultats sont conformes à ceux qu'on retrouve dans la littérature : 62 % des souches sécrètent ExoS, 27 % ExoU, tandis que 9 % sécrètent les deux simultanément, et que 2 % ne sécrètent aucune des deux.³⁸ Cependant, il existe des variations importantes en fonction des sites d'isolement des souches bactériennes.^{160,161}

Parmi les couples de souches cliniques, la cytotoxicité a été systématiquement plus faible pour les mutants MexAB-OprM que pour les souches sauvages. Mais cette différence n'a été significative que pour le couple PA14 / PA12. Les mutants issus de PAO1, PA4098WT et PA4098E, étaient très faiblement cytotoxiques, et aucune différence n'a pu être mise en évidence.

L'exotoxine ExoU est 100 fois plus cytotoxique qu'ExoS.¹⁶² Pourtant cette différence n'est pas apparue dans notre travail entre le couple PA14 / PA12, qui sécrétait ExoU, et les couples ExoS+. Ceci suggère l'existence d'autres facteurs intervenant dans la régulation du pouvoir cytotoxique de *P. aeruginosa*.

Tableau 9 : Génotype *exoS* ou *exoU* des différentes souches étudiées, et pourcentage de cytotoxicité induite, après 8 heures de co-culture avec cellules A549.

Souche	SSTT	
	Génotype	Cytotoxicité
PA01	<i>exoS</i>	51 ± 6
PAO4098wt	<i>exoS</i>	3 ± 1
PAO4098E	<i>exoS</i>	1
PA14	<i>exoU</i>	22 ± 2
PA12 (OprM)	<i>exoU</i>	16 ± 1
PA70	-	44 ± 10
PA92 (OprM)	-	34 ± 7
PA96	<i>exoS</i>	73 ± 7
PA109 (OprM)	<i>exoS</i>	64 ± 9
PA141	<i>exoS</i>	91 ± 11
PA128 (OprM)	<i>exoS</i>	70 ± 10

Les résultats pour la cytotoxicité correspondent aux taux de LDH retrouvés dans le milieu extracellulaire, après 8 heures de co-culture de la souche bactérienne et des cellules A549. La cytotoxicité est exprimée en pourcentage de la lyse totale obtenue en présence de Triton X-100. Les résultats correspondent aux moyennes $\pm$ déviation standard d'au moins 3 expériences indépendantes.

Les chiffres en gras correspondent à une différence significative ($p < 0,05$) entre le mutant MexAB-OprM et la souche sauvage.

En conclusion :

Il semble que les souches surexprimant MexAB-OprM soient moins cytotoxiques que les souches sauvages, mais cette différence n'est significative que pour un seul couple. Les souches ExoU+ n'étaient pas plus cytotoxiques que les souches ExoS+, suggérant l'existence d'autres systèmes de régulation de la cytotoxicité pour les souches cliniques.

6- Influence du système d'efflux MexAB-OprM sur le quorum-sensing

6a- PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Les niveaux de production de différents déterminants de la virulence dépendant du quorum-sensing (pyocyanine, élastase, rhamnolipides, phospholipase C), ainsi que de deux homosérine-lactones (C4-HSL et 3-oxo-C12-HSL) impliquées dans les principales voies de régulation de ce phénomène, ont été déterminés pour chacune des souches bactériennes étudiées, selon les modalités décrites dans la section « Matériels et méthodes » pp. 48-54.

6b- RESULTATS

Les résultats des dosages des rhamnolipides, de la pyocyanine, de l'élastase et de la phospholipase C sont rapportés dans le **Tableau 10**, p. 102.

Les résultats des dosages montrent une grande hétérogénéité, selon le couple de souches étudié.

Pour les rhamnolipides, le niveau de production s'est avéré systématiquement plus bas pour les mutants MexAB-OprM que pour les souches sauvages. Mais cette différence n'a été significative que pour un couple : PA70 / PA92 ($p = 0,0032$).

La production de pyocyanine ne variait pas entre les deux représentants de chaque couple.

La production d'élastase était modifiée à la hausse ou à la baisse, selon les couples. Ainsi, le mutant PA12 produisait significativement plus d'élastase que la souche sauvage PA14 ($p < 0,0001$), tout comme le mutant PA109 par rapport à la souche sauvage PA96 ($p < 0,0001$). Inversement, le mutant PA92 produisait significativement moins d'élastase que la souche sauvage PA70 ($p = 0,0002$).

Pour la phospholipase C, seul le mutant PA109 produisait significativement moins de cette protéine par rapport à la souche sauvage PA96 ($p = 0,0001$), tandis que les niveaux de production étaient similaires au sein des autres couples de souches.

Tableau 10 : Production des différents facteurs de virulence sécrétés par les souches bactériennes étudiées.

Souches	Production (%) ^a de :			
	Rhamnolipides ^b	Pyocyanine ^b	Elastase ^b	Phospholipase C ^c
PAO1	100	100	100	100
PAO4098wt	0	27	37	415
PAO4098E	0	22	16	462
PA14	53	20	20	42
PA12 (OprM)	42	20	77	58
PA70	56	21	90	83
PA92 (OprM)	40	25	53	69
PA96	102	24	14	61
PA109 (OprM)	91	28	98	256
PA141	79	28	38	64
PA128 (OprM)	62	17	25	125

^a : résultat exprimé en pourcentage du niveau de production de la souche de référence PAO1.

^b : Résultats de 3 expériences indépendantes

^c : Résultats de 4 expériences indépendantes

Les valeurs en gras correspondent aux différences significatives chez les souches surexprimant MexAB-OprM par rapport aux souches sauvages.

Au total : l'influence de MexAB-OprM sur les différents facteurs de virulence sécrétés est variable selon les couples étudiés. Cette variabilité est constatée à la fois au sein d'un couple donné, selon les facteurs de virulence étudiés, et entre les différents couples.

Les dosages des deux auto-inducteurs étudiés, la 3-oxo-C12-HSL et la C4-HSL, sont rapportés dans le **Tableau 11**.

Le niveau de production de 3-oxo-C12-HSL n'a pas été influencé par MexAB-OprM, sauf dans un cas : celui du mutant PA92, qui en produisait significativement plus que la souche sauvage PA70 ($p = 0,0001$). On note au passage que ceci n'est pas corrélé avec les résultats des dosages de rhamnolipides et d'élastase, dont la production était significativement moindre chez ce mutant que chez la souche sauvage dont il est issu. Pour la C4-HSL, les niveaux de production étaient semblables entre les deux composantes de chaque couple. Une corrélation positive a été démontrée entre les niveaux de production de 3-oxo-C12-HSL et de C4-HSL ($r = 0,83$, $p = 0,0154$).

Tableau 11 : Production des auto-inducteurs du quorum-sensing par les souches bactériennes étudiées.

Souches	Production (%) ^a de :	
	3-oxo-C12-HSL ^b	C4-HSL ^b
PAO1	100	100
PAO4098wt	94	77
PAO4098E	105	78
PA14	89	73
PA12 (OprM)	90	79
PA70	80	64
PA92 (OprM)	110	77
PA96	105	78
PA109 (OprM)	96	88
PA141	92	72
PA128 (OprM)	88	59

^a : résultat exprimé en pourcentage du niveau de production de la souche de référence PAO1. ^b : Résultats de 3 expériences indépendantes. Les valeurs en gras correspondent aux différences significatives chez les souches surexprimant MexAB-OprM par rapport aux souches sauvages.

Recherche de corrélation entre les production d'auto-inducteurs du quorum-sensing avec les niveaux de cytotoxicité et de production des facteurs de virulence sécrétés.

Une corrélation négative, bien que non significative, a été retrouvée entre le niveau de production de 3-oxo-C12-HSL et le niveau de cytotoxicité induite ($r = -0,48$, $p = 0,24$).

Par contre, nous n'avons retrouvé aucune corrélation entre le niveau de production de 3-oxo-C12-HSL et le niveau de production d'élastase, ainsi qu'avec les autres facteurs de virulence sécrétés étudiés.

Au total, nous avons retrouvé de nombreuses différences entre les mutants MexAB-OprM et les souches sauvages dont ils sont issus, tant *in vivo* en ce qui concerne l'intensité des lésions pulmonaires induites dans le modèle de pneumonie chronique, qu'*in vitro* par l'étude de la cytotoxicité et des facteurs de virulence sécrétés. Par contre, l'influence de MexAB-OprM s'est avérée extrêmement hétérogène, voire contraire, en fonction des paramètres étudiés pour une même souche, et entre les couples de souches.

L'hyperexpression de MexAB-OprM seule ne rend pas une souche plus ou moins virulente par rapport à la souche sauvage. D'autres facteurs sont manifestement impliqués.

7- Discussion

Le but de ce travail était de vérifier ou d'infirmer sur des souches isolées en clinique, la théorie, établie à partir de mutants de laboratoire tous dérivés de PAO1, que l'hyperexpression de MexAB-OprM diminue la virulence des souches concernées. Ceci nous est apparu extrêmement important pour l'exercice clinique, puisque les problèmes de résistance engendrés par ce système d'efflux pouvaient peut-être être contre-balancés par une virulence moindre. A l'inverse, les

thérapeutiques futures visant à une inhibition de ces systèmes d'efflux ne vont-elles pas s'accompagner d'un regain de virulence des bactéries concernées chez les patients traités ?

Le premier problème était de disposer de couples isogéniques d'origine clinique, ne différant que par leur niveau d'expression de MexAB-OprM. Or, si ces mutants surexprimant MexAB-OprM sont très fréquents en pratique clinique,⁶¹ l'isolement chez un même patient en cours de traitement d'un mutant MexAB-OprM après une souche sauvage est en fait une opportunité rare. Les couples de souches sur lesquels nous avons travaillé avaient fait l'objet d'une publication précédente par l'équipe du Pr Plésiat, et avaient été bien caractérisées sur le plan génétique, notamment au niveau des mutations acquises dans le gène répresseur *mexR* des mutants *nalB*.¹⁴¹ Ces couples avaient été isolés au cours de traitements antibiotiques essentiellement par fluoroquinolones et/ou β -lactamines. Ces paires avaient été sélectionnées par le fait que l'apparition de résistance aux antibiotiques était due uniquement à l'augmentation du niveau d'expression de MexAB-OprM, à l'exception d'autres mécanismes, notamment enzymatiques.

Différents travaux, portant sur des mutants de PAO1 obtenus en laboratoire, ont montré une baisse de la virulence chez ces derniers par rapport à la souche dont ils sont issus. Ainsi, Sanchez *et al* ont montré une diminution, chez les mutants *nalB* ainsi obtenus, de la production de facteurs de virulence comme la pyocyanine et l'élastase *in vitro*, s'accompagnant *in vivo* sur un modèle utilisant *Caenorhabditis elegans* d'une moindre létalité induite pour l'hôte.¹¹¹ De même, Hirakata *et al* ont mis en évidence le même phénomène sur des cultures cellulaires infectées par les mutants *nalB* ou la souche sauvage.⁷¹

Le rapport entre le système d'efflux et la virulence pourrait être lié à un effet de l'efflux sur les homosérines lactones effectrices du quorum-sensing. En effet, l'efflux gênerait la pénétration intracellulaire des homosérines lactones, diminuant ainsi l'activation des gènes de virulence dépendant de ce système de communication inter-cellulaire.^{69,87,88}

Pourtant l'impact négatif éventuel de ce système d'efflux sur la virulence, lorsqu'on s'intéresse aux souches isolées en clinique, est moins évident, comme l'ont montré Bratu *et al.*¹⁶³

Dans ce travail, nous avons évalué l'influence éventuelle du système d'efflux MexAB-OprM sur la virulence d'un ensemble de couple isogéniques de souches cliniques ne différant que par le niveau d'expression de ce système d'efflux.

La première étape a été d'évaluer cette influence éventuelle, *in vivo*, dans un modèle murin d'infection pulmonaire aiguë. Nous n'avons trouvé aucune différence au sein des couples étudiés, ni en terme de perméabilité endothéliale et de ratio wet-to-dry pulmonaire, ni en ce qui concerne la charge bactérienne dans les poumons. Ces paramètres, dans ce modèle d'infection aiguë, étaient mesurés à 16 heures de l'inoculation bactérienne. Or, si les pompes à efflux ont une influence sur la virulence, c'est par le biais d'une interférence sur la pénétration intracellulaire des auto-inducteurs du quorum-sensing. Or, ce phénomène de quorum-sensing ne s'exprime pas encore à la phase aiguë de l'infection. L'absence de différences mesurables à ce niveau n'était donc pas surprenante.

En utilisant un modèle d'infection chronique, où les lésions pulmonaires et les charges bactériennes étaient mesurées cette fois 24 heures, 4 jours et 6 jours après l'inoculation bactérienne, nous avons objectivé des différences au sein des couples étudiés. Mais ces résultats se sont avérés variables en fonction du couple étudié, soit dans le sens d'une aggravation des lésions soit dans celui d'une diminution pour les mutants surexprimant MexAB-OprM.

Le même constat s'est imposé lors de l'étude de l'influence de MexAB-OprM sur la cytotoxicité, sur la production de pyocyanine, d'élastase, de rhamnolipides et phospholipase C, ainsi que sur les niveaux de production des homosérine-lactones C4-HSL et C12-HSL. A chaque fois, on note un effet indéniable, mais non univoque.

De manière intéressante, on note que l'influence de MexAB-OprM est différente, chez une même souche, en fonction du facteur étudié : certains facteurs sont modifiés à la hausse et d'autres à la baisse. D'ailleurs, dans ce travail, les seuls facteurs dont la production semble corrélée sont les homosérine-lactones. Nous

n'avons pas mis en évidence de corrélation entre l'efflux, le quorum-sensing, et les différents paramètres de virulence étudiés *in vitro* et *in vivo*.

Ces résultats, en apparence en contradiction avec les données publiées sur des souches de laboratoire, sont manifestement liés au fait que, justement, ce travail a été réalisé sur des souches d'origine clinique. En effet, les souches de laboratoires ne reflètent que difficilement les incroyables capacités d'adaptation de *P. aeruginosa* à son environnement. Ceci est corrélé à la quantité incomparable de gènes dévolus chez cette bactérie à ses capacités d'adaptation. Il y a déjà plusieurs décennies, les microbiologistes avaient décrit, dans les sécrétions prélevées du tractus respiratoire de patients souffrant de maladies pulmonaires chroniques, la coexistence de différents morphotypes de la même souche de *Pseudomonas aeruginosa* : ils avaient parlé alors de « dissociative behavior ». ¹⁴⁴ Plus récemment, Rhakimova *et al*, en utilisant une technologie de « Signature Tagged Mutagenesis », ont montré la coexistence d'un grand nombre de mutants « one-step » au sein d'une population bactérienne donnée. Ces mutants ont des fonctions différentes, qui s'expriment plus ou moins selon les cas en fonction des conditions environnementales, mais qui sont indispensable à la survie de la communauté. ¹⁶⁴ Les auteurs concluaient d'ailleurs que la focalisation des travaux scientifiques sur quelques souches de référence, telles que PAO1, ne permet pas de rendre compte de ces comportements dissociés formant des niches adaptatives au sein de la population bactérienne, qui sont probablement déterminants en pathologie. Il est difficile, sur ces souches cliniques, de détecter toutes les mutations pouvant affecter le comportement bactérien, en dehors de celles sur lesquelles nous nous focalisons.

Jeannot *et al*, dans un travail qui a porté sur le système d'efflux MecCD-OprJ, ont aussi montré des effets variables de ce système d'efflux sur la virulence des souches étudiées, dépendantes du reste de leur capital génétique. ¹⁴⁷

De même, Lee *et al* ont montré, dans un travail d'analyse génomique de la virulence, que, selon les souches, la virulence n'est pas directement corrélée à la présence ou l'absence des gènes de virulence. En effet, le transfert d'un îlot de pathogénicité d'une souche à l'autre entraînait des effets très variables selon les souches, suggérant ainsi que ces gènes ne fonctionnent pas de manière autonome,

mais interagissent au sein de combinaisons complexes sur des substrats génétiques différents.¹⁶⁵

Dans le même ordre d'idée, nous avons constaté dans notre travail que les souches PA14/PA12, qui sécrètent l'exotoxine ExoU, n'engendrent pas une cytotoxicité plus importante que les souches sécrétant ExoS, contrairement à ce qui est rapporté dans la littérature sur le pouvoir cytotoxique 100 fois plus important d'ExoU vis-à-vis d'ExoS. Cette donnée n'est pas remise en cause par notre travail, mais celui-ci montre la complexité des régulations chez les souches cliniques : là encore, un seul facteur ne modifie pas à lui seul la virulence de la bactérie.

Enfin, le quorum-sensing lui même n'est pas régulé que par la densité bactérienne, mais aussi par d'autres paramètres environnementaux tels que la concentration en fer du milieu.¹⁶⁶ Ce phénomène de quorum-sensing pouvant être un avantage ou un handicap en fonction des conditions, il a été montré que des populations mixtes, quorum-sensing positives et négatives, peuvent coexister au sein d'une même population bactérienne, afin d'améliorer ses capacités d'adaptation.¹⁶⁷

Dans notre travail, nous ne pouvons pas affirmer qu'il n'existe pas de mutations secondaires venues compenser chez les souches étudiées, l'effet de la surexpression du système d'efflux MexAB-OprM. Par contre nous avons démontré que la dérépression du système d'efflux MexAB-OprM induit des effets sur la virulence qui sont imprévisibles, ou dans le sens d'une augmentation ou dans le sens d'une diminution, du fait d'une régulation multifactorielle de ces facteurs.

**MexAB-OprM-overproduction and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains:
assessment *in vitro* and in experimental models of lung infection**

**David Boutoille^{1*}, Julien Buyck², Jocelyne Caillon¹, Gilles Potel¹, Patrick Plésiat³, Benoît Guery²,
Karine Faure²**

¹: Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des Infections, EA 3826, Faculté de Médecine, Nantes F-44000, France.

²: Université de Lille, Laboratoire de Recherche en Pathologie Infectieuse, EA 2689, Lille F-59045, France.

³: Université de Franche-Comté, Département de Bactériologie, Faculté de Médecine, Besançon F-25030

***Corresponding author**

Running title: MexAB-OprM overexpression in experimental pneumonia

Key words :

MexAB-OprM efflux system, *Pseudomonas aeruginosa*, invasive capability, virulence, murine model of acute pneumonia

Funding :

This work was supported by a grant from Glaxo-SmithKline.

Transparency declarations :

None to declare

Abstract

We investigated the influence of MexAB-OprM overproduction on virulence, in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. For this purpose, pairs of clinical isogenic strains composed of MexAB-OprM-overproducing mutants and their wild-type counterparts were studied, *in vivo* in experimental murine models of acute and chronic pneumonia, and *in vitro* by assessment of type 3 secretion system exotoxins, cytotoxicity assays, production of rhamnolipids, pyocyanin, elastase and phospholipase C. The production of the quorum-sensing autoinducers C12-HSL (N-3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone) and C4-HSL (N-butanoyl-L-homoserine lactone) was also determined. Although we exhibited differences between the mutants and their wild-type counterparts, the link between MexAB-OprM-overproduction and expression of virulence was not univocal: the production of virulence determinants and the intensity of lung injury were influenced in one sense or the other depending on the couple of strains. These results suggest that, in clinical strains, overproduction of the MexAB-OprM efflux pump does not influence directly the degree of virulence expression, but interacts with other factors in various ways depending on the genetic background. This is important for the evaluation of expected non-antibiotic therapeutics, and particularly pump inhibitors.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a leading pathogen in lower respiratory tract infectious diseases, representing the most common antibiotic-resistant pathogen responsible for ventilator-associated pneumonia,³⁹ and a prominent cause of morbidity and mortality in chronic ailments such as cystic fibrosis, bronchiectasis, and chronic obstructive pulmonary disease.^{40,41} Mutants overexpressing multidrug resistance (MDR) efflux pumps are frequently encountered in clinical situations, particularly those overproducing MexAB-OprM (*nalB* mutants).⁴² In experimental conditions, MexAB-OprM-overproducing PAO1-derived mutants demonstrated a reduced fitness,^{43,44} that could be explained by the impact of the efflux pump MexAB-OprM on quorum-sensing autoinducers, *via* an active pumping of homoserine lactones out of the bacteria.⁴⁵ Yet, potential relationships between expression of MexAB-OprM and virulence seem complex for clinical strains.⁴⁶ In this work, we investigated the influence of MexAB-OprM overexpression in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* on virulence, *in vivo* in experimental murine models of acute and chronic pneumonia, and *in vitro* by assessment of virulence determinants such as type 3 secretion system exotoxins, cytotoxicity on a A549 epithelial cell monolayer, and production of rhamnolipids, pyocyanin, elastase and phospholipase C. We assessed also the amounts of production of the autoinducers C12-HSL (N-3-oxododecanoyl-L-homoserine lactone) and C4-HSL (N-butanoyl-L-homoserine lactone). Comparisons were realized between MexAB-OprM-overproducing mutants and their wild-type parents.

Materials and methods

Microorganisms

The *Pseudomonas aeruginosa* naIB strains and their isogenic counterparts were graciously supplied by Pr P. Plésiat. PAO4098wt and PAO4098E are PAO1 derivatives.⁴⁷ PAO4098wt is a mutant of PAO1 producing basal, noninducible levels of AmpC β -lactamase. PAO4098E is a single step-mutant of PAO4098wt overproducing the MexAB-OprM efflux system. PA 14/12, PA 70/92, PA 96/109 and PA 128/141 are pairs of clinical isogenic strains isolated before and after antimicrobial therapy, and have been described previously. On electrophoretic profiles of their outer membrane proteins and banding patterns of the LPS, post-therapy strains only differed from their pretherapy counterparts by the high level of OprM production.⁴⁸

In-vitro susceptibility testing

Minimal inhibitory concentrations (MIC) were determined in Mueller-Hinton broth (supplemented with Ca^{2+} 25 mg/L and Mg^{2+} 12.5 mg/L) by the microdilution technique. Overnight Mueller-Hinton broth cultures were used to prepare inocula to reach 10^5 colony-forming units (CFU)/mL. The MIC was defined as the lowest concentration of an antimicrobial agent preventing turbidity after 24 h of incubation at 37°C.

Animals

Pathogen-free male BALB/c mice (Harlan, Gannat, France) weighing 18-20 g were used for these experiments. Animals were housed in the Lille University Animal Care Facility and allowed food and water *ab libitum*. All experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of Lille University, and were conducted in accordance to the Guidelines for Animal Experimentation, of Lille University.

Survival curves

P. aeruginosa strains were grown at 37°C in rotating, shaking water bath, in a tryptic soy broth (Biomerieux Laboratories, Lyon, France) for 8 h. Cultures were centrifuged at 1,000 X g for ten min, and the bacterial pellets were washed twice and diluted in sterile isotonic saline to be calibrated at 10^9 CFU/mL by spectroscopy. Mice were anesthetized with sevoflurane inhalation (Abbott, UK) and placed in dorsal recumbency. Transtracheal insertion of a 24-G animal feeding needle was used to instillate 70 μL of the bacterial preparation. Ten mice were infected in each group. Survival was assessed daily during 6 days.

Experimental model of acute lung infection

P. aeruginosa strains were grown at 37°C in rotating, shaking water bath, in a tryptic soy broth (Biomerieux Laboratories, Lyon, France) for 8 h. Cultures were centrifuged at 1,000 X g for ten min, and the bacterial pellets were washed twice and diluted in sterile isotonic saline to be calibrated at 10^9 CFU/mL by spectroscopy. Mice were anesthetized with sevoflurane inhalation (Abbott, UK) and placed in dorsal recumbency. Transtracheal insertion of a 24-G animal feeding needle was used to instillate 70 μL of the bacterial preparation.

Experimental model of chronic lung infection

Preparation of the bacterial inocula

The methodology was adapted from Cash *et al.*⁴⁹ *Pseudomonas aeruginosa* was incubated in tryptic soy broth at 37°C in a rotating shaking water bath for 8 hours. The culture was then washed twice, and resuspended in phosphate-buffered saline. The resulting bacterial suspension was 1×10^9 CFU/mL. A sample of 1 ml of this suspension was mixed in agarose and mineral oil (Sigma Diagnoses, St Louis, USA) at 56°C. The resulting oil-agarose emulsion cooled to obtain agar beads. Dilutions of the final suspension were cultured to determine the CFU of the final inoculum. Thirty mice (10 per group) were inoculated per batch of agarose beads.

Experimental infection

Mice were anesthetized with sevoflurane (Sevorane™, Abbott, UK), and placed in dorsal recumbency. Transtracheal insertion of a 24-G animal feeding needle was used to instill 60 µL of a 1:4 dilution of the agarose beads (2×10^5 CFU/mouse).

Measurement of endothelial permeability

Measurements of endothelial permeability were performed at 16 hours after bacterial instillation in the model of acute infection. Mice were euthanized by intraperitoneal injection of pentobarbital (Cerva Santé Animale, Libourne, France). Two hours before sacrifice, the mice received an intraperitoneal injection of 0.05 µCi ¹²⁵I-labeled albumin. To determine the proportions of ¹²⁵I-albumin in the lung and plasma, at the time of sacrifice, blood was collected through right ventricle puncture, and the lungs were removed and homogenized. Radioactivity in the blood and the lungs was then counted in a gamma counter (Packard, Meriden, CT). Lung extravascular plasma equivalents (an index of lung vascular permeability) were calculated as counts of ¹²⁵I-albumin in lung tissue divided by counts of ¹²⁵I-albumin in plasma as described previously.⁵⁰

In the model of chronic infection, for a given bacterial strain, 30 mice were infected at day 0. Then, groups of ten mice were assessed for endothelial permeability 24 h, 4 days and 6 days after *P. aeruginosa* instillation.

Quantitative bacteriology

At the time of sacrifice, blood was collected in a heparinized syringe from the right ventricle. The lungs were isolated and homogenized in 1 mL of sterile isotonic saline. Bacterial cultures after serial dilutions were performed on bromocresol purple agar and colonies counted after 24 h at 37°C.

LDH release assay

The T3SS-dependent cytotoxicity of the strains was assessed with a human lung epithelial cell line (A549). Cells were cultured to confluence in modified Eagle's medium with Earle's salts and L-glutamine (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Dustcher, Vilmorin, France) and a penicillin-streptomycin association (1%), at 37°C with 5% CO₂. When the cells reached confluence, 2×10^4 cells were transferred to 96-well tissue culture plates and incubated overnight. The following day, 10 µL of each of the *P. aeruginosa* strains was mixed with antibiotic-free medium and applied to the cells for 8 hours. PAO1 was used as a reference. Cytotoxicity was quantitated by measuring the lactate dehydrogenase (LDH) in the culture

supernatants at 8 h, using a cytotoxicity assay kit (Cytotox 96; Promega, Charbonnières, France). The 100% value represented the amount of LDH released from cells lysed by 0.8% Triton X-100 for 45 min.

Western blot analysis of TTSS protein secretion

Overnight cultures of the *P. aeruginosa* strains were subcultured (diluted to 1 %) into LB plus 5 mM EGTA for 5 hours. Then, bacterial cultures were centrifuged at 3,000 x g for 10 min. The supernatants were concentrated about 50 times by ultrafiltration (Vivapore; Sartorius, Germany). The solutions of proteins obtained were then mixed with loading buffer, and separated by sodium dodecyl sulfate-12% polyacrylamide gel electrophoresis. Proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane, for an immunoblot analysis using polyclonal antibodies against ExoS and ExoU as described previously.⁵¹

Phenotypic assays

The level of elastase activity in the supernatant fraction of isolates was determined spectrophotometrically at OD₆₀₀ using an elastin Congo red assay as described previously.⁵² Absorption caused by pigments produced by *P. aeruginosa* was corrected by subtracting the absorbance at OD₄₉₅ of control samples incubated in the absence of elastin Congo red. Values were expressed as the ratio (OD₄₉₅/OD₆₀₀) X 100. All essays were performed in triplicate.

The pyocyanin assay was based on the absorbance of pyocyanin at 520 nm in an acidic solution as described previously.⁵³ Values were expressed as the ratio (OD₅₂₀/OD₆₀₀) X 100. All essays were performed in triplicate.

Production of rhamnolipid was assessed on culture plates based on M9 minimal medium in which NH₄Cl was replaced by 0.1% glutamate, and supplemented with 0.2% glucose and MgSO₄ (2 mM final concentration). Three-microliter droplets containing ca.10⁶ CFU were placed at equal distances on the dried plates, which were incubated for 24 h at 37°C and then for 24 h at 25°C. The rhamnolipid production was estimated semiquantitatively by measuring the diameter of the blue halos forming around bacterial spots.

Activity of phospholipase C in the supernatants of stationary-phase cultures was quantified spectrophotometrically by using NPPC (p-nitrophenyl-phosphorylcholine) as a chromogenic substrate, as previously described.⁵⁴ Two ml of tryptose minimal medium was inoculated with 200 µL of a bacterial suspension calibrated at a McFarland standard of 0.4 in saline buffer. After 24 h of incubation at 37°C, the culture supernatant was recovered and treated with 10 mg of decolorizing carbon. Ten-microliter fractions of medium were then added to 90 µL of a reaction mixture containing 250 mM Tris-HCl (pH 7.2), 10 mM NPPC, 60% (wt/vol) glycerol, and 1 µM ZnCl₂. Absorbance at 405 nm of triplicate samples was recorded after 1 h of incubation at 37°C.

Determination of autoinducer concentrations

Culture supernatants were extracted with ethyl acetate, and autoinducer concentrations were determined in bioassays using *P. aeruginosa* PAO-JP2 (pECP61.5)⁵⁵ for C4-HSL and *Escherichia coli* MG4 (pPCS.1)⁵⁶ for C12-HSL. Extracts were added to cultures with these bacteria, which harbor a plasmid with a transcriptional fusion of a QS transcriptional activator and the β-galactosidase

reporter gene *lacZ*, so that exogenous autoinducer resulted in induction of β -galactosidase. Thus, β -galactosidase activity was proportional to the autoinducer concentration. Standard curves were constructed using known quantities of synthetic C12-HSL or C4-HSL (Aurora Biosciences, Coralville, IA, USA). Reporter strain cultures were grown for 14 h at 37°C with shaking in Medium A (K_2HPO_4 10,5 g/L, KH_2HPO_4 4,5 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1 g/L, Na_3 -citrate.2H₂O 0,5 g/L, yeast extract 0,5 g/L), supplemented with ampicillin 100 mg/L, glucose 0,4% w/v and 1 mM $MgSO_4$, and were then subcultured in the same medium. Autoinducers were added to the culture at an OD₆₆₀ of 0.3, after which the cells were incubated until an OD₆₆₀ of 0.7 was reached. The culture was then resuspended in the same volume of Medium A supplemented with yeast extract 0.05% w/v. The β -galactosidase activity was assayed using 2-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (Sigma-Aldrich, France).

Clinical data

PA 14/12, PA 70/92, PA 96/109 and PA 128/141 are pairs of clinical isogenic strains isolated before and after antimicrobial therapy, from different sites: surgical wounds for the couples 14/12 and 141/128, tracheal aspiration for 96/109, and stools for 70/92. Antibiotics treatments administered before isolation of the MexAB-OprM-overproducing mutant were: piperacillin + netromycin for 14/12, ticarcillin/clavulanate for 70/92, amoxicillin/clavulanate + pefloxacin for 141/128, and ceftazidime + ciprofloxacin for 96/109.

Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) was used for the comparisons among three or more groups. A Mann-Whitney test was used to compare means between two groups. For survival curves, cumulative survival rates were compared by using a log-rank test. A level of 5 % was accepted as statistically significant. Potential correlation between the amounts of production of autoinducers and the different determinants of virulence was assessed by calculating Spearman's correlation coefficient. All statistical analysis were performed with GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software INC., San Diego, USA).

Results

***In-vitro* susceptibility testing**

MICs for each strain are listed in Table 1. PAO4098E, and the clinical strains PA12, PA92, PA 109, and PA 128 are respective MexAB-OprM-overproducing mutants of PAO4098wt, PA14, PA70, PA 96, and PA141. These strains were already characterized by Zihra-Zarifi *et al.*⁵⁷ For each one of these clonally related pairs, both the level of β -lactamase production and the outer membrane proteins other than OprM were strictly identical. Clinical breakpoints, as defined by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) for *Pseudomonas aeruginosa*,⁵⁸ are also reminded in Table 1. The overproduction of MexAB-OprM is evident through its influence on MICs of ticarcillin and aztreonam, which are increased by four-fold or eight-fold in the MexAB-OprM-overproducing strains in comparison with their wild-type counterparts. The phenotypical analysis does not show any implication of the other main efflux systems MexXY-OprM, MexCD-OprJ and MexEF-OprN.

Survival curves

The pairs of strains PA14/12 and PA70/92 were used to study survival after transtracheal instillation. Results are shown in Figures 1a and 1b. Mice died significantly faster after instillation of the MexAB-OprM-overproducing strain PA12 than with its wild-type counterpart PA14 ($p=0.0073$), whereas the contrary was observed with the wild-type strain PA70 and its MexAB-OprM-producing counterpart PA92 ($p=0.0003$).

Experimental acute lung infection

In this model, the laboratory strains PAO4098wt and PAO4098E, and the clinical pairs PA14/12 and PA70/92, were assessed. Results of endothelial permeability 16 hours after bacterial instillation are shown in Figure 2. No difference was shown between MexAB-OprM-overproducing strains and their wild-type counterparts, although the level of lung injury assessed by endothelial permeability was significantly higher than for controls.

Experimental chronic lung infection

Two pairs of clinical strains were chosen for the *in vivo* experiments. These two pairs differed from each other by their phenotype of type III secretion system (TTSS) (Table 2): PA14/12 secreted the exotoxin ExoU, and PA96/109 ExoS.

Measurement of lung vascular permeability

Results of lung vascular permeability 24 hours, 4 days and 6 days after bacterial inoculation are shown in Figures 3a and 3b. Significantly more important alveolar capillary permeability was found for the MexAB-OprM-overproducing strain PA12 at day 4, compared with its wild-type counterpart PA14. This difference was also found at day 6 after bacterial instillation, but didn't reach statistical significance at that time. The permeability increased between the first day of infection and days 4 and 6 for PA12, but not for PA14, the wild-type counterpart. Inversely, the wild-type strain PA96 gave more important lesions at day 1, but didn't maintain its advantage over PA109 at days 4 and 6.

Quantitative bacteriology

Bacterial loads in the lungs obtained at days 1, 4 and 6 after bacterial instillation are shown in Figures 4a and 4b. PA14 gave more important bacterial loads in the lungs than its MexAB-OprM-overproducing counterpart PA12 over the whole duration of assessment, but this difference didn't reach statistical significance. Inversely, bacterial loads were significantly higher for the MexAB-OprM-overproducing strain PA109 than for its wild-type relative PA96 at days 1 and 4, but quickly decreased over the period of assessment.

Assessment of virulence determinants

Phenotypes of type III secretion system and results of LDH release assays, as well as levels of production of rhamnolipids, pyocyanin, elastase, phospholipase C, are expressed in Table 2. PAO1 and the PAO1-derived strains PAO4098wt and PAO4098E secreted the T3SS exotoxin ExoS, as well as the pairs of clinical strains PA96/109 and PA141/128, whereas PA14/12 was the only pair that secreted ExoU. Neither ExoS nor ExoU could be evidenced in PA70/92. These results are consistent with previously published data: ExoS is more frequent than ExoU, and some strains don't possess any of these two proteins.⁵⁹

Cytotoxicity

Measurements of lactate dehydrogenase (LDH) in the culture supernatants at 8 h are expressed in Table 2. There was a trend toward a lower level of cytotoxicity for the OprM-overproducing mutants versus the wild-type counterparts, although not significant, except for the pair 14/12 ($p = 0.03$).

Production of virulence determinants

Measurements of rhamnolipids, pyocyanin, elastase and phospholipase C showed heterogeneous results, depending on the pairs of strains. Rhamnolipids were the only virulence determinants where the level of production was systematically lower in MexAB-OprM-overexpressing strains, with only one pair (PA70/92) achieving statistically significant difference ($p = 0.0032$). Production of pyocyanin was not affected by the level of expression of MexAB-OprM. Production of elastase could be modified in one sense or the other: significantly more for the MexAB-OprM-overexpressing strains PA12 ($p < 0.0001$) and PA109 ($p < 0.0001$), and significantly less for PA92 ($p = 0.0002$). Phospholipase C production was significantly increased only for the mexAB-OprM-overproducing strain PA109 ($p = 0.0001$), whereas no difference could be shown in the other pairs.

Determination of autoinducer concentrations

Results are shown in Table 2. The amount of production of 3-oxo-C12-HSL was not influenced by MexAB-OprM, except in one case: the OprM-overproducing strain PA92 produced significantly more C12-HSL than its wild-type counterpart PA70 ($p = 0.0001$). No difference was evidenced in the production of C4-HSL. A positive correlation was shown between the amounts of production of 3-oxo-C12-HSL and C4-HSL ($r = 0.83$, $p = 0.0154$). A negative correlation, although not significant was noticed between production of 3-oxo-C12-HSL and cytotoxicity ($r = -0.48$, $p = 0.24$). We didn't find any significant relationship between 3-oxo-C12-HSL and the amount of elastase in this work, nor correlation between both autoinducers and the other determinants of virulence.

Discussion

In this work, we investigated the potential influence of the MexAB-OprM efflux pump on virulence in a panel of well-characterized pairs of isogenic clinical strains. First, we compared the level of lung injury induced by MexAB-OprM-overproducing strains and their wild-type isogenic counterparts, in an experimental model of acute lung infection. We did not find any significant difference on endothelial permeability measured 16 hours after bacterial instillation (Figure 2), as well as for lung wet-to-dry ratios and bacterial loads (data not shown). Since efflux pumps are supposed to interact with virulence *via* the quorum-sensing autoinducers, therefore not at acute stages but later in the process of infection, we performed experiments in an experimental model of murine chronic infection. We also assessed cytotoxicity and Type 3 Secretion System (TTSS) expression, different virulence determinants such as pyocyanin, elastase, phospholipase and rhamnolipids, as well as the production of auto-inducers 3-oxo-C12-HSL and C4-HSL (Table 2). Results were extremely variable according to the strains and we did not exhibit any systematic relationship between MexAB-OprM-overproduction and levels of lung injury, as well as amounts of production of virulence determinants and auto-inducers.

A major explanation for these variations probably resides in the fact that we worked on clinical strains. Actually, most of the studies that demonstrated a link between active efflux and virulence were performed on panels of laboratory mutants. And, of course, these works were particularly important for the comprehension of the bacterial machinery. But, in a therapeutic perspective, it is also important to assess the influence of efflux pumps in clinical strains, since pump inhibitors might be a seducing alternative to antibiotics frequently unsuccessful against more and more resistant strains. But the laboratory strains hardly reflect the extremely high power of adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical situations, due to its uncomparably huge number of genes devoted to this adaptative ability. Many years ago, microbiologists had already described the coexistence of different morphotypes of the same strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from respiratory tract specimens recovered from patients with chronic pulmonary disease: they called this phenomenon “dissociative behavior”.⁶⁰ Rhakimova *et al*, using an approach of signature tagged mutagenesis, have demonstrated that a huge number of one-step mutants coexist in such bacterial populations, with different specialized skills devoted to the survival of the bacterial community.⁶¹ The authors concluded that the focus on a few reference strains, like PAO1, may miss modes of niche adaptation and dissociative behaviours, determinant in pathological conditions. Hence, by studying clinical strains, it is difficult to detect all the other potential mutations that could alter a specific bacterial behavior, than the ones we focus on. Jeannot *et al*, working on *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump, also demonstrated that the effects of MexCD-OprJ upregulation on the virulence of *P. aeruginosa* appeared to be variable, and dependent on the genetic background of the strains.⁶² Similarly, Lee *et al* showed in a genomic analysis of virulence that, depending on the strains, presence or absence of pathogenic-related genes do not correlate directly with degree of virulence, suggesting that these genes do not function autonomously to affect virulence, but interact in various combinations in different genetic backgrounds.⁶³ Quorum sensing *in vivo* is not only regulated by the cell-population density, but also by other environmental parameters, such as iron concentrations.⁶⁴ Moreover, because quorum-sensing can be at once an advantage or a disadvantage, depending on the environmental conditions, mixed populations of QS-positive and QS-negative bacteria may coexist, in natural conditions, to increase the adaptative skills of *Pseudomonas aeruginosa*.⁶⁵ In our work also, we were not able to know whether the mutants we studied have specific virulence features or secondary mutations allowing them to compensate for virulence defects caused by *nalB* mutation.

MexAB-OprM-overexpressing strains of *Pseudomonas aeruginosa* (*nalB* mutants) are very frequent in clinical settings,⁶⁶ but isolation in a given patient of a wild-type strain and thereafter of a derived *nalB* mutant is a rare opportunity. The couples of strains we studied were isolated from hospitalized patients, well characterized, and previously published, as well as the mutations in the *mexR* regulator gene exhibited by the *nalB* counterparts.⁶⁷ The wild-type parents represent pretherapy isolates, whereas the MexAB-OprM-overexpressing strains had been selected *in vivo* during the course of antibiotic therapy, mostly by fluoroquinolones and β -lactams. Among a number a repetitive isolates susceptible and then resistant to antipseudomonal β -lactams, which identity had been established by PFGE, those pairs of strains had demonstrated only barely detectable amounts of β -lactamase. Analysis of outer membrane proteins for each of the four clinical bacterial pairs had shown no marked difference between pre- and posttherapy strains except for the expression of OprM. Evidence of mutations in the regulator gene *mexR* had confirmed these data. Overexpression of the efflux pump MexAB-OprM in the *nalB* mutants has a clear impact on antibiotic resistance, as shown

in table 1. Our purpose, in this study, was the assessment of the potential links existing between overproduction of the efflux pump MexAB-OprM and virulence, in a panel of well-characterized clinical strains. Actually, these links were already well demonstrated in reference strains and derived mutants. Thus, several experimental works, using laboratory *nalB* and *nalC* mutants derivatives from the reference strain PAO1, found that overproduction of MexAB-OprM diminishes the synthesis of virulence determinants like pyocyanin and elastase, and reduce the killing capability of bacteria in a model system of nematodes *Caenorhabditis elegans*,⁶⁸ as well as penetration ability through epithelial cell monolayer systems.⁶⁹ The relationship of MexAB-OprM with virulence could be mediated by the effect of active efflux on the homoserine-lactone transcriptional activators 3-oxo-C12-HSL and C4-HSL. Potential links between *mexAB-oprM* efflux pump and quorum sensing autoinducers have been investigated in several studies. Thus, Evans *et al* in 1998, and in 1999 Pearson *et al*, demonstrated that MexAB-OprM efflux pumps are involved in active efflux of 3-oxo-C12-HSL, but not C4-HSL.^{70,71} In 2004, Maseda *et al* showed that transcription of the *mexAB-oprM* operon could be increased by the extracellular addition of C4-HSL.⁷²

Yet, impact on fitness and virulence in clinical settings seems more variable. In 2006, a work performed on 33 clinical strains by Bratu *et al*, assessing by RT-PCR the expressions of the major quorum-sensing regulators *rhlR* and *lasR* and *mexA* didn't find any correlation between these systems.⁷³ In our work, also realized on a panel of clinical strains, we couldn't exhibit any systematic relationship between MexAB-OprM-mediated efflux and virulence either, as well *in vivo*, in an experimental model of murine pneumonia, as *in vitro*, through cytotoxicity assays and measurements of different virulence determinants (rhamnolipids, pyocyanin, elastase and phospholipase). We found a trend toward a lower level of cytotoxicity for the OprM-overproducing mutants versus the wild-type counterparts, but significant only for the pair 14/12. Several works exhibited the existence of a downregulation of the TTSS protein ExoS by the quorum-sensing genes *rhl* and *rpo*.^{74,75} But the potential existence of a link between MexAB-OprM and the TTSS is not clear.

We didn't exhibit either any systematic link between production of virulence determinants and MexAB-OprM. Results were variable depending on the virulence factor and the strain. Rhamnolipids were the only virulence determinants where the level of production was systematically lower in MexAB-OprM-overexpressing strains, but significantly only for one pair (70/92). MexAB-OprM overexpression didn't affect the production of pyocyanin. Elastase was diversely modified, increased or decreased, depending on the strains. Evans *et al* had found a negative impact of MexAB-OprM overproduction on elastase in laboratory strains,⁷⁶ whereas Bratu *et al* didn't show any relation on a panel of clinical strains.⁷⁷ In a work performed on isolates of *Pseudomonas aeruginosa* collected from critically-ill patients with ventilator-associated pneumonia, Le Berre *et al* showed a strong correlation between quorum-sensing activity and elastase, but not pyocyanin.⁷⁸ A major difference with our study lies in the fact that our strains were isolated in various infection sites, and not only in pulmonary infections. That could explain the lack of univocal correlation between elastase and MexAB-OprM overexpression, since various other regulation factors could intervene on virulence determinants, and especially environmental and host factors largely depending on the type of infection. At last, we didn't exhibit any correlation between MexAB-OprM and the amounts of autoinducers 3-oxo-C12-HSL and C4-HSL either.

Conclusion

The natural plasticity of *Pseudomonas aeruginosa* genome devoted to its adaptative skills probably explains the fact that we could not determine any univocal link between MexAB-OprM and virulence, in this panel of clinical strains. But such data are crucial for a comprehensive elaboration of future therapeutic alternatives, like pump inhibitors, that should be used inside combinational approaches.

Reference List

1. 2005. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **171**:388-416.
2. 2000. EUCAST Definitive Document E.DEF 2.1, August 2000: Determination of antimicrobial susceptibility test breakpoints. *Clin.Microbiol.Infect.* **6**:570-572.
3. **Arancibia, F., T. T. Bauer, S. Ewig, J. Mensa, J. Gonzalez, M. S. Niederman, and A. Torres.** 2002. Community-acquired pneumonia due to gram-negative bacteria and pseudomonas aeruginosa: incidence, risk, and prognosis. *Arch.Intern.Med.* **162**:1849-1858.
4. **Berka, R. M., G. L. Gray, and M. L. Vasil.** 1981. Studies of phospholipase C (heat-labile hemolysin) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect.Immun.* **34**:1071-1074.
5. **Bollinger, N., D. J. Hassett, B. H. Iglewski, J. W. Costerton, and T. R. McDermott.** 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of iron override effects on quorum sensing and biofilm-specific gene regulation. *J.Bacteriol.* **183**:1990-1996.
6. **Bratu, S., J. Gupta, and J. Quale.** 2006. Expression of the las and rhl quorum-sensing systems in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* does not correlate with efflux pump expression or antimicrobial resistance. *J.Antimicrob.Chemother.* **58**:1250-1253.
7. **Cash, H. A., D. E. Woods, B. McCullough, W. G. Johanson, Jr., and J. A. Bass.** 1979. A rat model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am.Rev.Respir.Dis.* **119**:453-459.
8. **Essar, D. W., L. Eberly, A. Hadero, and I. P. Crawford.** 1990. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J.Bacteriol.* **172**:884-900.
9. **Evans, K., L. Passador, R. Srikumar, E. Tsang, J. Nezezon, and K. Poole.** 1998. Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.* **180**:5443-5447.
10. **Folkesson, H. G., M. A. Matthay, C. A. Hebert, and V. C. Broaddus.** 1995. Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms. *J.Clin.Invest* **96**:107-116.

11. **Heurlier, K., V. Denervaud, and D. Haas.** 2006. Impact of quorum sensing on fitness of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int.J.Med.Microbiol.* **296**:93-102.
12. **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**:109-118.
13. **Hocquet, D., M. Roussel-Delvallez, J. D. Cavallo, and P. Plesiat.** 2007. MexAB-OprM- and MexXY-overproducing mutants are very prevalent among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to ticarcillin. *Antimicrob.Agents Chemother.* **51**:1582-1583.
14. **Hogardt, M., M. Roeder, A. M. Schreff, L. Eberl, and J. Heesemann.** 2004. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *exoS* is controlled by quorum sensing and RpoS. *Microbiology* **150**:843-851.
15. **Jeannot, K., S. Elsen, T. Kohler, I. Attree, D. C. van, and P. Plesiat.** 2008. Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. *Antimicrob.Agents Chemother.* **52**:2455-2462.
16. **Le, B. R., S. Nguyen, E. Nowak, E. Kipnis, M. Pierre, F. Ader, R. Courcol, B. P. Guery, and K. Faure.** 2008. Quorum-sensing activity and related virulence factor expression in clinically pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin.Microbiol.Infect.* **14**:337-343.
17. **Lee, D. G., J. M. Urbach, G. Wu, N. T. Liberati, R. L. Feinbaum, S. Miyata, L. T. Diggins, J. He, M. Saucier, E. Deziel, L. Friedman, L. Li, G. Grills, K. Montgomery, R. Kucherlapati, L. G. Rahme, and F. M. Ausubel.** 2006. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.* **7**:R90.
18. **Li, X. Z., D. M. Livermore, and H. Nikaido.** 1994. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob.Agents Chemother.* **38**:1732-1741.
19. **Maseda, H., I. Sawada, K. Saito, H. Uchiyama, T. Nakae, and N. Nomura.** 2004. Enhancement of the mexAB-oprM efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the mexEF-oprN efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**:1320-1328.
20. **Pearson, J. P., E. C. Pesci, and B. H. Iglewski.** 1997. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* *las* and *rhl* quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J.Bacteriol.* **179**:5756-5767.
21. **Pearson, J. P., D. C. Van, and B. H. Iglewski.** 1999. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J.Bacteriol.* **181**:1203-1210.
22. **Rakhimova, E., A. Munder, L. Wiehlmann, F. Bredenbruch, and B. Tummler.** 2008. Fitness of isogenic colony morphology variants of *Pseudomonas aeruginosa* in murine airway infection. *PLoS.ONE.* **3**:e1685.
23. **Ruiz, M., S. Ewig, M. A. Marcos, J. A. Martinez, F. Arancibia, J. Mensa, and A. Torres.** 1999. Etiology of community-acquired pneumonia: impact of age, comorbidity, and severity. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* **160**:397-405.

24. **Sanchez, P., J. F. Linares, B. Ruiz-Diez, E. Campanario, A. Navas, F. Baquero, and J. L. Martinez.** 2002. Fitness of in vitro selected *Pseudomonas aeruginosa* nalB and nfxB multidrug resistant mutants. *J.Antimicrob.Chemother.* **50**:657-664.
25. **Seed, P. C., L. Passador, and B. H. Iglewski.** 1995. Activation of the *Pseudomonas aeruginosa* lasI gene by LasR and the *Pseudomonas* autoinducer PAI: an autoinduction regulatory hierarchy. *J.Bacteriol.* **177**:654-659.
26. **Wong-Beringer, A., J. Wiener-Kronish, S. Lynch, and J. Flanagan.** 2008. Comparison of type III secretion system virulence among fluoroquinolone-susceptible and -resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin.Microbiol.Infect.* **14**:330-336.
27. **Yahr, T. L. and M. C. Wolfgang.** 2006. Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system. *Mol.Microbiol.* **62**:631-640.
28. **Zierdt, C. H. and P. J. Schmidt.** 1964. Dissociation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J.Bacteriol.* **87**:1003-1010.
29. **Ziha-Zarifi, I., C. Llanes, T. Kohler, J. C. Pechere, and P. Plesiat.** 1999. In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob.Agents Chemother.* **43**:287-291.

Table 1: antibiotic susceptibilities for PAO4098wt, PAO4098E, pretherapy (wt) and posttherapy (Opr-M) clinical strains.

MIC (mg/L)											
	EUCAST breakpoints	PAO4098wt	PAO4098E (OprM)	PA14 (wt)	PA12 (OprM)	PA70 (wt)	PA92 (OprM)	PA96 (wt)	PA109 (OprM)	PA141 (wt)	PA128 (OprM)
Tic	16	16	64	16	128	32	128	16	128	16	128
Caz	8	0,5	2	2	8	2	4	2	4	2	8
Atz	1	2	8	4	32	4	32	4	32	4	32
Fep	8	2	4	4	8	8	16	8	8	8	8
lpm	4	1	0,5	1	0,5	16	8	1	0.5	1	0.5
Mer	2	0,5	4	0,5	4	4	32	0.5	4	0.5	1
Nal	-	128	1024	128	1024	128	1024	128	1,024	128	>1,024

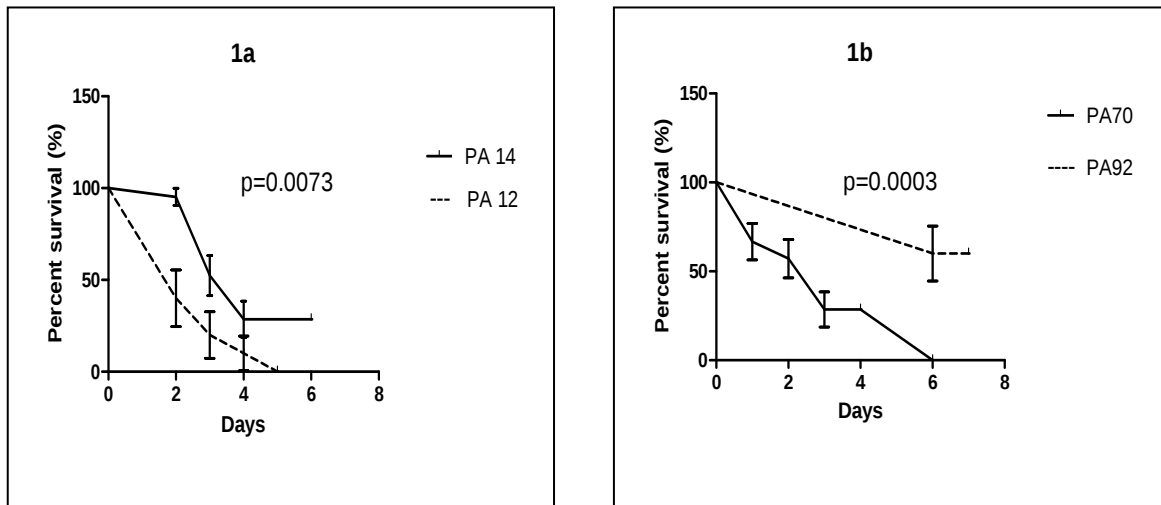
Tic: ticarcillin; Caz: ceftazidime; Atz: aztreonam; Fep: cefepime; lpm: imipenem; Mer: meropenem;
Nal: nalidixic acid

Table 2: Assessment of virulence determinants

Strain	T3SS		Production (%) ^b of:				Production of autoinducers ^b	
	Genotype	Cytotoxicity (%) ^a	Rhamnolipids ^c	Pyocyanin ^d	Elastase ^d	Phospholipase C ^d	3-oxo-C12-HSL ^c	C4-HSL ^c
PAO1	<i>exoS</i>	51 ± 6	100	100	100	100	100	100
PAO4098wt	<i>exoS</i>	3 ± 1	0	27	37	415	94	77
PAO4098E(OprM)	<i>exoS</i>	1	0	22	16	462	105	78
PA14	<i>exoU</i>	22 ± 2	53	20	20	42	89	73
PA12(OprM)	<i>exoU</i>	16 ± 1	42	20	77	58	90	79
PA70	-	44 ± 10	56	21	90	83	80	64
PA92(OprM)	-	34 ± 7	40	25	53	69	110	77
PA96	<i>exoS</i>	73 ± 7	102	24	14	61	105	78
PA109(OprM)	<i>exoS</i>	64 ± 9	91	28	98	256	96	88
PA141	<i>exoS</i>	91 ± 11	79	28	38	64	92	72
PA128(OprM)	<i>exoS</i>	70 ± 10	62	17	25	125	88	59

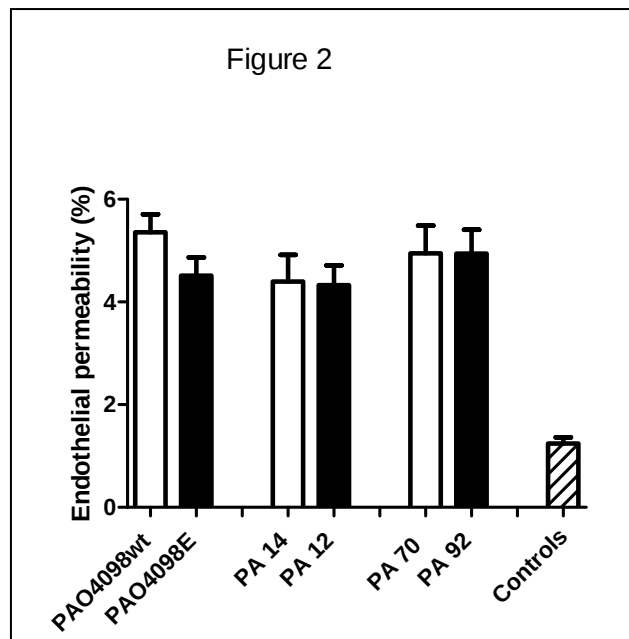
^a Extracellular LDH activity at 8 h postinfection expressed as % of total lysis obtained with Triton X-100. Values are means of three experiments. ^b Relative to PAO1 (100%). ^c Values are means of three independent experiments. ^d Values are means of four independent experiments. Values in boldface correspond to significant difference in production in MexAB-OprM-overexpressing mutants compared with wild-type parents.

Figures 1a and 1b: Cumulative survival rates after transtracheal instillation of PA14/12 (1a) or PA70/92 (1b).



Ten mice were enrolled in each group. Standard errors are indicated by error bars. Continuous lines represent the wild-type strains (PA14 or PA70), and the dotted lines represent the MexAB-OprM-overexpressing strains (PA12 or PA92). Cumulative survival rates were compared by using a log-rank test.

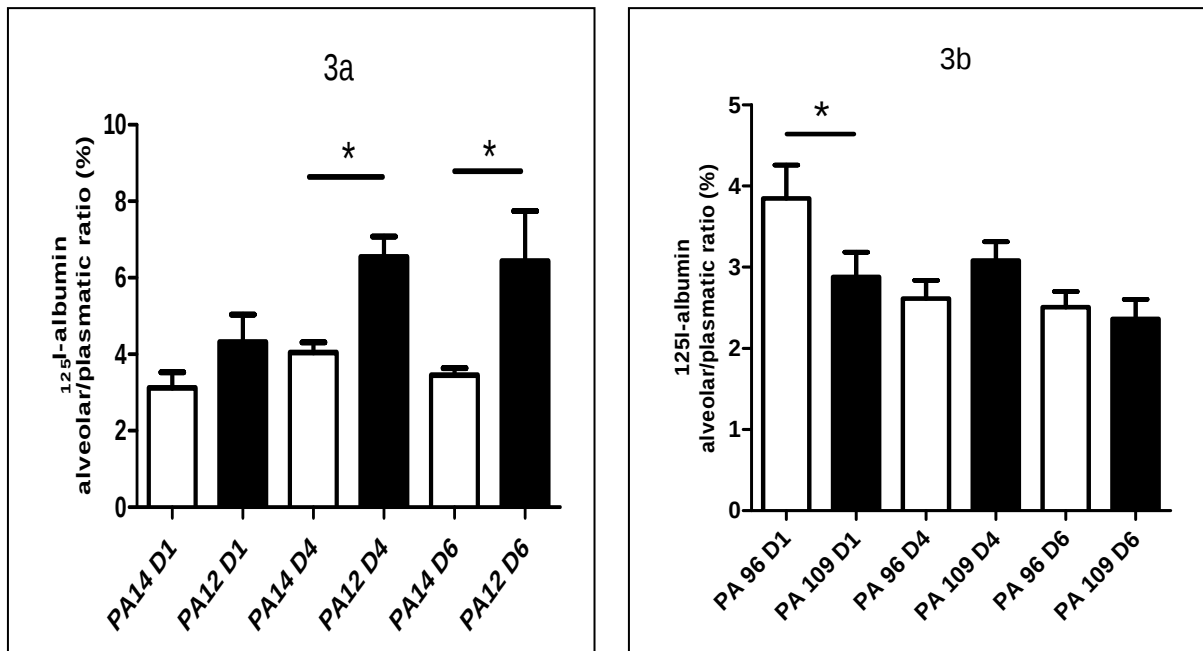
Figure 2: Evaluation of endothelial permeability, 16 hours after bacterial instillation, with ^{125}I -albumin, for the pairs of isogenic strains PAO4098wt/PAO4098E, PA14/12 and PA70/92.



The data are means $\pm$ standard errors (SE, indicated by error bars). Ten mice were evaluated in each group, 16 hours after bacterial instillation. Black bars are for the OprM-overexpressing strains (PAO4098E, PA12 and PA92), whereas white ones are for their wild-type counterparts (PAO4098wt, PA14 or PA70). Endothelial permeability (EP) is expressed as an evaluation of the ^{125}I -labeled albumin flux across endothelial barrier, with the alveolar to plasmatic ratio of this marker at the end of the protocol.

* $p < 0,05$

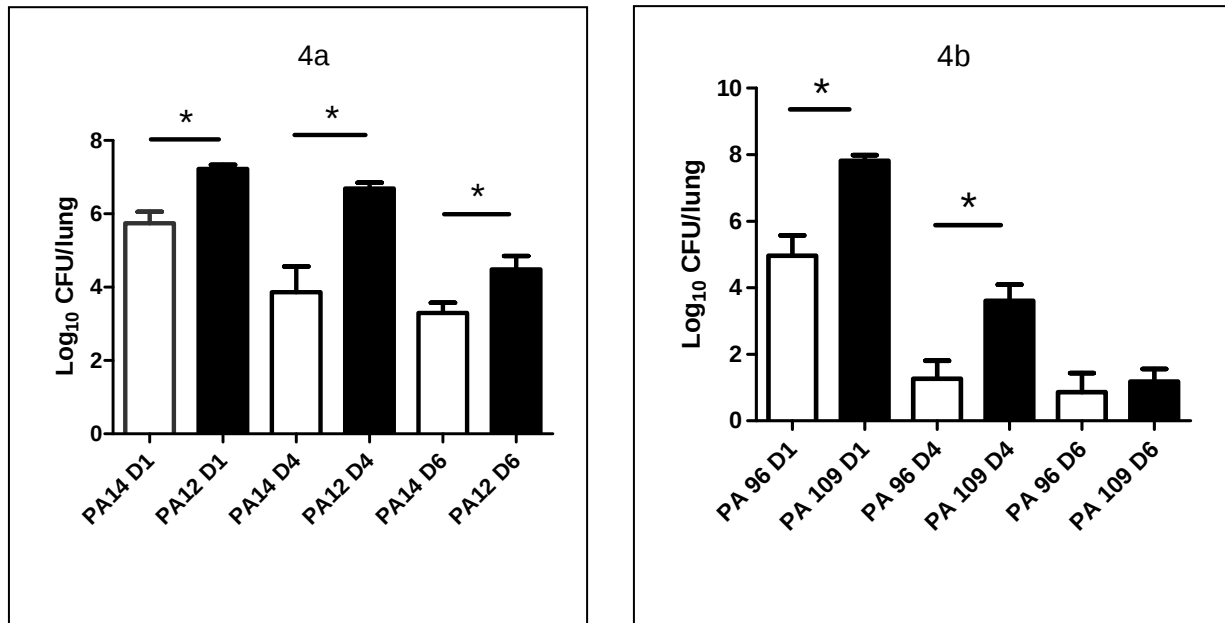
Figures 3a and 3b: Evaluation of alveolar capillary barrier permeability with ^{125}I -albumin for the pairs of isogenic strains PA14/12 (2a) and PA96/109 (2b).



The data are means $\pm$ standard errors (SE, indicated by error bars). Ten mice were evaluated in each group, at a given day. Black bars are for the OprM-overexpressing strains (PA12 or PA109), whereas white ones are for their wild-type counterparts (PA14 or PA96). Endothelial permeability (EP) is expressed as an evaluation of the ^{125}I -labeled albumin flux across endothelial barrier, with the alveolar to plasmatic ratio of this marker at the end of the protocol.

* $p < 0,05$

Figures 4a and 4b: Bacterial loads in the lungs at 24 hours, 4 days and 6 days after transtracheal instillation, for the pairs of isogenic strains PA14/12 (4a) and PA96/109 (4b).



The data are means $\pm$ standard errors (SE, indicated by error bars). Ten mice were evaluated in each group, at a given day (D1: day 1, D4: day 4, D6: day 6) after bacterial instillation. Black bars are for the OprM-overexpressing strains (PA12 or PA109), whereas white ones are for their wild-type counterparts (PA14 or PA96). Bacterial loads are expressed as Log₁₀ CFU per lung, after homogenization, at the end of the protocol.

* $p < 0,05$

3^{ème} étude : Mise au point d'une technique d'étude de la perméabilité endothéliale utilisant l'albumine FITC

Ce travail a donné lieu à la publication suivante :

Boutoille D, Marechal X, Pichenot M, Chemani C, Guery B, Faure K. FITC-albumin as a marker for assessment of endothelial permeability in mice: comparison with ¹²⁵I-albumin. **Exp Lung Res.** Sous presse.

Le transport transvasculaire de protéines marquées, telles que l'albumine, est communément utilisé pour étudier la perméabilité endothéliale dans les modèles murins de pathologie pulmonaire.¹⁸⁸ Les isotopes comme l'albumine marquée à l'iode 125 sont utilisés dans ce but. Mais les isotopes impliquent des procédures strictes et difficiles à appliquer pour la plupart des laboratoires en termes de stockage, de manipulation et d'évacuation. Des alternatives ont été proposées, telles que l'albumine marquée au bleu d'Evans, avec de bonnes corrélations par rapport aux isotopes, bien qu'il soit nécessaire de corriger l'absorbance du pigment en fonction de l'hème résiduelle.¹⁸⁹⁻¹⁹¹ L'albumine marquée à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) a déjà été utilisée pour la détermination des flux d'albumine de la circulation pulmonaire vers l'espace alvéolaire, sur un système de poumons de rats isolés.¹⁹² Nous avons mis au point une technique de mesure de la perméabilité endothéliale pulmonaire utilisant l'albumine-FITC et l'avons comparée avec une technique de référence utilisant l'albumine marquée à l'iode 125, dans un modèle murin de pneumonie expérimentale à *P. aeruginosa*.

1- PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Le modèle utilisé est un modèle murin d'infection pulmonaire aiguë à *P. aeruginosa*.

Deux groupes de souris ont été constitués, les animaux étant répartis au hasard dans l'un ou l'autre groupe :

- Groupe témoin (n = 10) : pas d'infection pulmonaire
- Groupe infecté (n = 10) : instillation endotrachéale de 70 µL d'une solution bactérienne contenant 10^9 UFC/mL de PAO1.

Seize heures après administration de l'inoculum bactérien, les souris infectées ont été sacrifiées. Les souris contrôles ont été sacrifiées en même temps. Deux heures avant le sacrifice, toutes les souris étudiées ont reçu simultanément de l'albumine radiomarquée et de l'albumine-FITC, sous forme d'une administration intra-péritonéale d'une solution de 2 mL contenant 1 mL d'albumine marquée à l'iode 125 et 1 mL d'albumine-FITC à 2 mg/mL reconstituée dans du sérum physiologique stérile. Les modalités techniques de calcul de la perméabilité endothéliale avec le marqueur de référence et avec l'albumine-FITC sont détaillées dans la section « Matériels et méthodes » pp. 55-57.

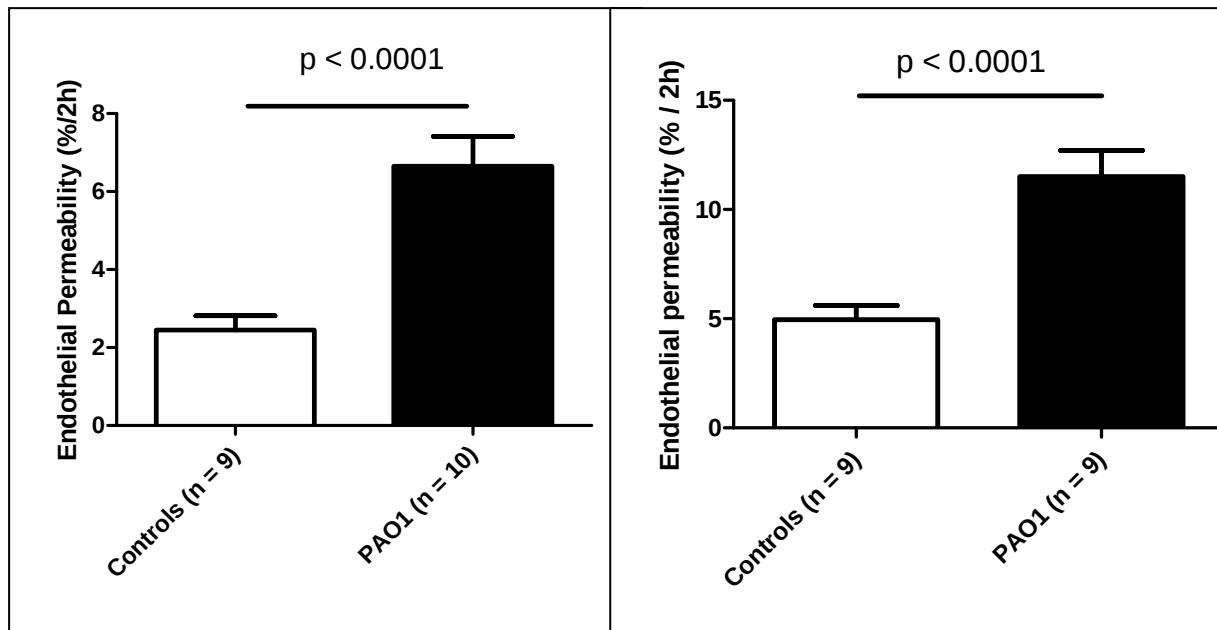
Nous avons comparé la capacité des deux marqueurs à évaluer de manière sensible les troubles de la perméabilité endothéliale entre les groupes témoin et infecté. Ensuite, nous avons calculé le degré de corrélation entre les deux méthodes de calcul.

2- RESULTATS

Les résultats du calcul de la perméabilité endothéliale avec les deux techniques, pour le groupe témoin et le groupe infecté, sont présentés dans la **Figure 14a** pour l'albumine marquée à l'iode 125, et la **Figure 14b** pour l'albumine-FITC.

Figure 14a : Comparaison des niveaux de perméabilité endothéliale (en %) obtenus entre les souris témoins, et les souris infectés par PAO1, avec l'albumine marquée à l'iode 125, après 16 heures

Figure 14b : Comparaison des niveaux de perméabilité endothéliale (en %) obtenus entre les souris témoins, et les souris infectés par PAO1, avec l'albumine FITC, après 16 heures d'infection.



Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ erreur standard (indiquée par les barres d'erreur). Dix souris ont été évaluées dans le groupe contrôle et 10 dans le groupe infecté. Le groupe de souris infectées est représenté en noir, et les souris témoins en blanc. La perméabilité endothéliale est exprimée comme l'évaluation de la clairance de l'albumine marquée à travers la barrière endothéliale (% / 2h), avec le ratio portion alvéolaire sur portion plasmatique du marqueur à la fin du protocole (2 heures après administration intra-péritonéale du marqueur).

Le niveau de perméabilité endothéliale obtenu chez les souris infectées est significativement augmenté par rapport au groupe témoin, quelle que soit la technique utilisée, avec une capacité comparable des deux techniques à discriminer les deux groupes ($p < 0,0001$ dans les deux méthodes). On remarque par contre que les niveaux de perméabilité endothéliale calculés par les deux méthodes sont différents, la technique utilisant l'albumine-FITC donnant des

niveaux de perméabilité plus importants qu'avec la technique isotopique, que ce soit pour les souris contrôles comme pour les souris infectées.

Recherche de sources d'erreur possibles dans la méthode de calcul utilisant l'albumine FITC.

Les sources d'erreur possibles qui ont été analysées sont : le volume sanguin intra-pulmonaire, les fractions libres de marqueurs, et la fluorescence naturelle des échantillons biologiques.

La fraction de sang intra-pulmonaire (sang intra-vasculaire résiduel dans les poumons plus sang introduit dans l'espace interstitiel pulmonaire par saignement ou d'origine lésionnelle) a été déterminée pour chaque souris ; les valeurs obtenues ont été comparées entre le groupe témoin et le groupe infecté. La fraction de sang intra-pulmonaire ne variait pas de manière suffisamment importante entre les deux groupes pour constituer une source d'erreur pour le calcul de la perméabilité endothéliale (moyenne $\pm$ erreur standard : $0,023 \pm 0,005$ pour le groupe témoin, et $0,024 \pm 0,007$ pour le groupe infecté, $p = 0,93$).

Nous avons déterminé la fraction libre de chacun des deux marqueurs : l'iode 125 et la fluorescéine isothiocyanate. Pour cela, nous avons réalisé une dialyse de l'albumine marquée à l'iode 125 et de l'albumine FITC, en utilisant un système de filtre Microcon-YM-30* (Millipore, Molsheim, France). Il s'agit d'un système de filtre incorporé dans un microtube Eppendorf de centrifugation, qui ne laisse passer que les molécules de poids moléculaire inférieur à 30 kDa. Le poids moléculaire de l'albumine est 68,5 kDa, tandis que celui de l'iode est 252 Da, et celui de l'isothiocyanate de fluorescéine 400 Da.

On dépose 0,5 mL de la solution à dialyser au niveau de la partie supérieure du tube, au-dessus du filtre, puis on réalise une centrifugation à 11 000 tours / min pendant 10 minutes. Les molécules de plus de 30 kDa, et donc l'albumine, sont retenues par le filtre : on retrouve donc dans l'ultrafiltrat les fractions libres de marqueurs correspondant à l'iode 125 libre et à l'isothiocyanate de fluorescéine libre.

Pour l'iode 125, on a mesuré la radioactivité émise par 0,5 mL de solution d'albumine marquée à l'iode 125, puis celle émise par le produit de dialyse. Pour l'isothiocyanate de fluorescéine, la fluorescence de 0,5 mL d'une solution à 1 mg/mL d'albumine FITC a été déterminée, puis celle du produit de dialyse de cette solution.

La fraction libre est égale au ratio du résultat obtenu pour le dialysat sur celui de la solution mère. Les expériences ont été réalisées en triplicate.

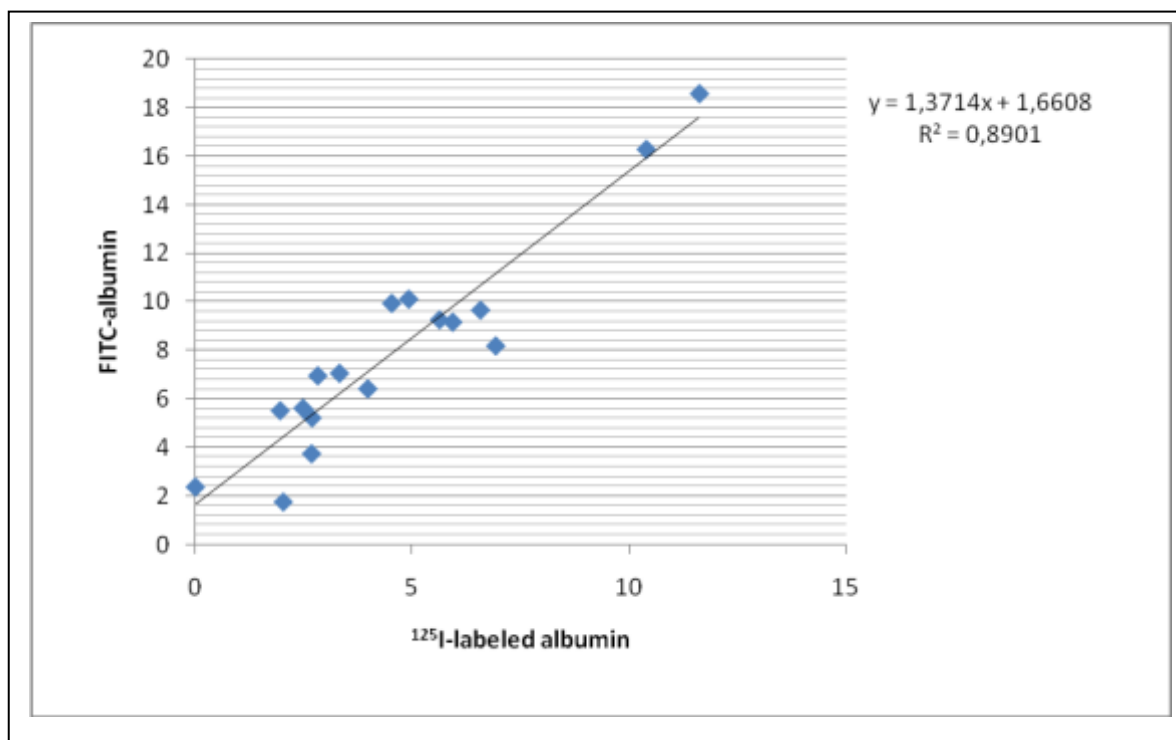
Pour l'albumine marquée à l'iode 125, la fraction libre d'iode 125 est égale à 2,9 %, tandis que la fraction libre de marqueur pour l'albumine FITC correspond à 9,3 %. Il s'agit d'une différence notable, pouvant expliquer en grande partie les différences obtenues par les deux techniques de mesure de la perméabilité endothéliale.

Enfin, nous avons évalué la fluorescence naturellement émise par les échantillons biologiques utilisés pour calculer la perméabilité endothéliale, à savoir le plasma et l'homogénat de poumon. Nous avons pour cela réalisé des mesures sur une série de 5 animaux non infectés n'ayant reçu aucun des deux marqueurs. La fluorescence naturellement émise par l'homogénat de poumons et par le plasma de ces animaux a été déterminée dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites pour les groupes de souris ayant reçu les deux marqueurs. Les valeurs de fluorescence spontanées obtenues étaient de 202 ± 7 pour l'homogénat de poumons, et 207 ± 19 pour le plasma. Il n'existait pas de différence significative entre les deux types de prélèvements ($p = 1$). Par contre, la prise en compte de cette fluorescence naturelle dans la méthode de calcul a changé de manière notable les résultats, même si la corrélation entre les deux méthodes n'a pas été significativement modifiée. L'incorporation de cette fluorescence spontanée dans la méthode de calcul avec l'albumine FITC a permis de rapprocher les chiffres de perméabilité endothéliale obtenus avec cette méthode de ceux obtenus par la méthode isotopique.

Il existe une corrélation forte entre les deux méthodes de détermination de la perméabilité endothéliale

On s'est assuré de la corrélation des mesures obtenues par les deux méthodes en calculant tout d'abord le coefficient de corrélation de Spearman, utilisé pour les mesures non paramétriques. La droite de corrélation obtenue entre les deux méthodes est présentée en **Figure 15**.

Figure 15 : Corrélation entre les mesures de perméabilité endothéliale réalisées avec l'albumine marquée à l'iode 125 et avec l'albumine FITC.

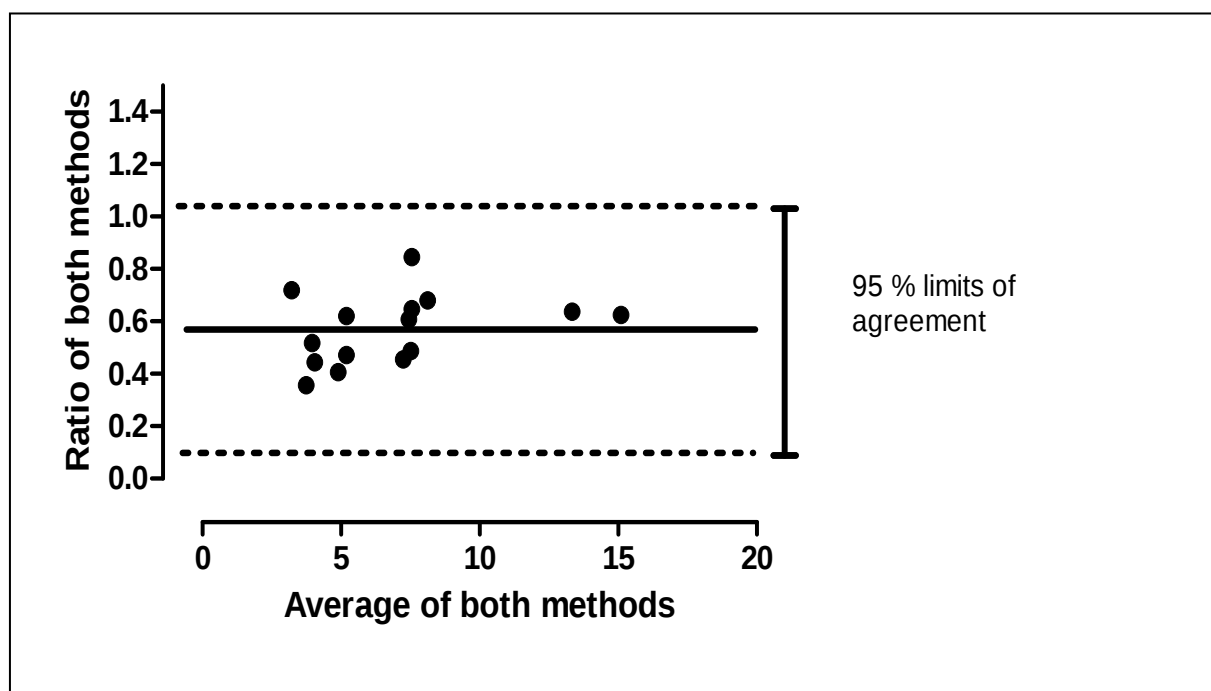


Le coefficient de corrélation ρ de Spearman obtenu entre les deux méthodes est de 0,9 ($p < 0,0001$), montrant l'existence d'une très forte corrélation entre les deux techniques de mesure.

Un diagramme de dispersion de Bland-Altman a été réalisé.¹⁴⁹ Cette méthode de comparaison entre deux techniques de mesure utilise une représentation graphique. On a représenté graphiquement le ratio entre les deux techniques de mesure comme une fonction de la moyenne des deux mesures de

chaque sujet. Le graphique résultant est appelé graphique de Bland-Altman, et représente la dispersion des valeurs. Le biais calculé (différence ou ratio entre les moyennes) doit être compris entre les limites 95 % de l'intervalle de confiance. Ce graphique est représenté en **figure 16**.

Figure 16 : Graphique de Bland-Altman analysant le niveau de corrélation entre les deux méthodes de calcul de la perméabilité endothéliale.



L'analyse de biais de Bland-Altman a montré qu'il n'existe pas de biais significatif entre la méthode de calcul utilisant l'albumine-FITC et celle utilisant l'albumine marquée à l'iode 125 (biais observé : $0,57 \pm 0,24$; intervalle de confiance 95 % : de 0,1 à 1,04).

Là encore, les deux méthodes de calcul apparaissent fortement corrélées.

3- DISCUSSION.

L'augmentation de la perméabilité endothéliale est un indicateur très utilisé pour l'évaluation de l'agression pulmonaire dans les modèles murins.¹⁹⁴ Différentes méthodes ont été développées pour mesurer ce paramètre, soit *ex vivo* sur des poumons isolés, soit *in vivo*. L'extravasation intra-alvéolaire d'albumine marquée, injectée par voie intraveineuse ou par voie intra-péritonéale, est considérée comme une approche relativement sensible de la perméabilité endothéliale.¹⁹⁴ Différents type de marqueurs et différentes techniques ont été utilisées.

La mesure du transport transvasculaire de protéines marquées est utilisée avec une grande précision dans les modèles de poumons isolés, car les conditions de filtration du marqueur peuvent alors être définies par les investigateurs.^{195,196} Mais il s'agit d'une technique délicate, qui ne peut être utilisée, du fait de la lourdeur de la manipulation, pour comparer des groupes d'animaux.

Chez les souris « entières », l'extravasation intra-alvéolaire d'albumine radio-marquée a été utilisée régulièrement pour détecter les augmentations de perméabilité endothéliale.¹⁹⁷⁻¹⁹⁹ Cependant, ces techniques imposent des contraintes de sécurité importantes en termes de stockage, de manipulation et d'élimination du produit puis des animaux radio-actifs. Ces contraintes ne sont supportables que par peu de laboratoires. Du coup, d'autres marqueurs ont été proposés, comme par exemple le bleu d'Evans avec de bonnes corrélations aux techniques de référence utilisant la radioactivité, mais aussi des inconvénients, notamment quant aux interférences avec l'hémoglobine.¹⁸⁹⁻¹⁹⁰

L'albumine-FITC offre les avantages de sa facilité d'obtention, de stockage et d'utilisation, sans contraintes de sécurité particulières, ainsi que de son prix, relativement peu élevé. Nous avons donc testé la possibilité d'utiliser ce marqueur pour l'évaluation de la perméabilité endothéliale pulmonaire dans un modèle murin d'infection à *P. aeruginosa*, en comparaison avec le marqueur de référence, l'albumine marquée à l'iode 125.

Les caractéristiques de l'albumine-FITC ont nécessité quelques adaptations par rapport à la méthode de référence utilisant l'albumine marquée à l'iode 125.

Tout d'abord, comme l'hémoglobine empêche la mesure de la fluorescence, nous avons dû mesurer la fluorescence de la fraction endovasculaire du marqueur dans le plasma, alors qu'avec l'albumine radio-marquée, la radioactivité est mesurée sur le sang total. De la même façon, la mesure de la fluorescence exigeait une phase liquide, et nous avons dû d'abord homogénéiser les poumons avant de centrifuger l'homogénat obtenu, et de mesurer la fluorescence dans le surnageant, alors que la radioactivité est mesurée sur les poumons entiers non préparés. Il s'agit de différences notables pouvant être en partie responsables des différences obtenues entre les deux techniques de mesure, malgré une bonne corrélation entre les deux.

Diverses sources d'erreur possibles dans le calcul de la perméabilité endothéliale avec l'albumine-FITC ont été explorées : le volume de sang intra-pulmonaire, la fraction libre de marqueur, et la fluorescence naturelle spontanée des échantillons biologiques.

La fraction de sang intra-pulmonaire, correspondant au sang intra-vasculaire résiduel plus le sang présent dans l'interstitium du fait de saignement et/ou des lésions pulmonaires, a été déterminée pour chaque souris. Il est apparu que cette fraction de sang intra-pulmonaire ne pouvait être une source de variation significative des résultats, tant le ratio sang intrapulmonaire sur sang total est faible et soumis à des variations peu importantes (moyenne $\pm$ DS : $0,023 \pm 0,005$ pour le groupe contrôle, contre $0,024 \pm 0,007$ pour les animaux infectés ; $p = 0,93$).

Ensuite, afin d'évaluer la fraction libre de chaque marqueur, nous avons dialysé respectivement l'albumine radio-marquée et l'albumine-FITC. Les fractions libres obtenues ont été respectivement de 2,9 % pour l'isotope, et de 9,3 % pour l'isothiocyanate de fluorescéine. Par contre, cette fois, la différence est importante et peut contribuer à expliquer les différences obtenues entre les deux méthodes.

Enfin, pour évaluer la fluorescence naturelle des échantillons biologiques étudiés, des souris ont été analysées, infectées ou pas, sans injection préalable de marqueur. Il existe une fluorescence spontanée des échantillons analysés, égale dans nos expériences à 202 ± 7 pour le surnageant d'homogénat de poumon et 207 ± 19 pour plasma. Ces valeurs ne sont pas différentes pour les deux types d'échantillon ($p = 1,00$), mais le niveau total de fluorescence obtenu dans l'homogénat de poumon par rapport au plasma, après injection d'albumine-FITC, donne un poids plus important dans la méthode de calcul à la fluorescence naturelle de l'homogénat de poumon comparé au plasma. Il est donc apparu indispensable de corriger les valeurs obtenues par cette fluorescence naturelle. Il en a résulté des niveaux de perméabilité endothéliale mesurée entre les deux méthodes plus proches d'une part, et une amélioration de la corrélation entre les deux techniques de calcul.

Finalement, si les niveaux de perméabilité endothéliale calculés avec les deux méthodes ne sont pas strictement superposables, la capacité à discriminer les lésions pulmonaires par rapport aux poumons sains apparaît elle superposable entre les deux méthodes. Le coefficient corrélation de Spearman entre les deux méthodes est d'ailleurs très élevé, égal à 0,88 ($p < 0,0001$), et l'analyse de Bland-Altman n'a pas retrouvé de biais significatif entre les deux (biais observé : $0,57 \pm 0,24$, avec des intervalles de confiance 95 % allant de 0,1 à 1,04).

Au total, malgré des différences dans les calculs liées aux caractéristiques techniques de l'albumine-FITC, et à une liaison du marqueur à l'albumine plus faible que pour l'isotope, la corrélation entre les deux méthodes de calcul est très forte, et nous pensons que l'albumine-FITC peut être, de manière tout à fait fiable, utilisée pour déterminer la perméabilité endothéliale pulmonaire. Nous espérons que, grâce à son maniement, nettement plus simple qu'avec les isotopes, cette technique deviendra une référence.

**FITC-albumin as a marker for assessment of endothelial permeability in mice: comparison with
¹²⁵I-albumin**

D. Boutoille^{1*}, X. Marechal², Marie Pichenot², C. Chemani², B. Guery², K. Faure²

¹: Université de Nantes, Faculté de Médecine, Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des Infections, EA 3826, Faculté de Médecine, Nantes F-44000, France.

²: Université de Lille 2, Laboratoire de Recherche en Pathologie Infectieuse, EA 2689, Lille F-59045, France.

* Corresponding author:

Dr David Boutoille, MD,

Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, Thérapeutiques Cliniques et Expérimentales des Maladies Infectieuses, EA 3826, Faculté de Médecine, Nantes F-44000, France

david.boutoille1@aliceadsl.fr

david.boutoille@chu-nantes.fr

Phone and fax : (33) 240-41-2854

Abstract:

Transvascular transport of labeled-albumin is used to study endothelial permeability in experimental murine models of pulmonary infections. But radio-tagged albumin necessitates heavy safety procedures in terms of storage, manipulation and evacuation. We tested fluorescein isothiocyanate-tagged albumin (FITC-albumin) as a new marker for determination of endothelial permeability in a murine model of lung infection by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, in comparison with a standard method with ^{125}I -albumin. The mean permeability $\pm$ SEM measured with ^{125}I -albumin was $2.45 \text{ \%}/2\text{h} \pm 0.37$ for the control mice and $6.65 \text{ \%}/2\text{h} \pm 0.77$ for the infected ones ($p < 0.0001$). With FITC-albumin, results obtained for both groups were respectively $4.96 \text{ \%}/2\text{h} \pm 0.64$ and $11.5 \text{ \%}/2\text{h} \pm 1.2$ ($p < 0.0001$). Spearman's rank coefficient was equal to 0.88 ($p < 0.0001$) showing a very strong correlation between both methods of measurement. The Bland-Altman analysis of bias revealed that there was no significant bias between FITC-albumin-derived and ^{125}I -albumin-derived values. The correction of the values obtained in plasma and lung homogenate supernatants by the subtraction of natural spontaneous fluorescence measured in these samples was crucial for the calculation of endothelial permeability in this new method. We believe that FITC-albumin can be useful for assessment of endothelial permeability in murine models of pulmonary diseases.

Key-words: ^{125}I -albumin, FITC-albumin, murine model of lung infection, endothelial permeability, *Pseudomonas aeruginosa*

Running title: Assessment of FITC-albumin in a model of lung infection

Introduction

Transvascular transport of labeled proteins, such as albumin, is commonly used to study endothelial permeability in lungs of mice and rats. Isotopes, like ^{125}I -human serum albumin are used for this purpose (1). Because radio-labeled albumin necessitates heavy safety procedures

for storage, manipulation and evacuation, alternatives to radioisotopes have been proposed, like Evans blue-dye-labeled albumin, with excellent correlations reported between both markers (2, 3, 4), although a limitation for the last one is that the absorbance of the dye must be corrected for residual heme pigments. Fluorescein isothiocyanate-tagged albumin (FITC-albumin) has been used for determination of albumin flux from the pulmonary circulation into the alveolar space, on isolated lungs of rats (5). We assessed the usefulness of FITC-albumin for measurement of endothelial permeability in intact mice, in comparison with ^{125}I human serum albumin, using an experimental model of pulmonary infection by *Pseudomonas aeruginosa*.

Materials and methods

Animals

Pathogen-free male BALB/c mice (Harlan, Gannat, France) weighing 18-20 g were used in these experiments. Animals were housed in the Lille University Animal Care Facility and allowed food and water *ab libitum*. All experiments were approved by the Animal Care and Use Committee of Lille University, and were conducted in accordance to the Guidelines for Animal Experimentation, of Lille University.

Microorganisms

The *Pseudomonas aeruginosa* reference strain PAO1 was used for the experiments.

Preparation of the bacterial inocula

P. aeruginosa strains were grown at 37°C in rotating, shaking water bath, in a tryptic soy broth (Biomerieux Laboratories, Lyon, France) for 8 h. Cultures were centrifuged at 1,000 X g for ten min, and the bacterial pellets were washed twice and diluted in sterile isotonic saline to be calibrated at 10^9 CFU/ml by spectroscopy. Mice were anesthetized with sevoflurane inhalation

(Abbott, UK) and placed in dorsal recumbency. Transtracheal insertion of a 24-G animal feeding needle was used to instillate 70 µl of the bacterial preparation.

Measurement of alveolar capillary barrier permeability

Injection of the markers

Sixteen hours after *P. aeruginosa* instillation, the mice were euthanized by intraperitoneal injection of pentobarbital (Cerva Santé Animale, Libourne, France). Two hours before sacrifice, the mice received an intraperitoneal injection of 2 ml of isotonic saline containing 0.05 µCi ¹²⁵I-labeled albumin and 2 mg of FITC-albumin (Sigma, France). To determine the proportions of ¹²⁵I-albumin and FITC-albumin in the lung and plasma, at the time of sacrifice, blood was collected through right ventricle puncture, and the lungs were removed and homogenized in a volume of 1 ml of saline.

Measurement of endothelial permeability with ¹²⁵I-albumin

Radioactivity in the blood and the lungs was then counted in a gamma counter (Packard, Meriden, CT), and permeability with ¹²⁵I-albumin (Perm¹²⁵I) was calculated by using the following equation:

$$(1) \quad \text{Perm}^{125}\text{I} (\%) = [(RL - (QB \times RB)) / (RB \times 0,07 \times We)] \times 100$$

where:

RL is radioactivity measured (in counts/minute) by the gamma counter in the two excised lungs.

QB corresponds to the proportion of intrapulmonary blood (residual intravascular blood plus that introduced into the lung interstitium via bleeding or injury).

RB is radioactivity measured (in counts/minute) in the whole volume of blood obtained via right ventricle puncture.

We is the mouse's weight (in g), and $0.07 \times We$ is the total blood volume.

And QB is calculated as described below:

$$(2) \quad QB = Hb_{HS} \times We \times 0.07 \times (1 - Hte) / Hb$$

where:

Hb_{HS} is the rate of residual hemoglobin measured (in g/dl) in the homogenate supernatant.

Hb is the rate of hemoglobin measured (in g/dl) in total blood.

Hte is the hematocrite.

$We \times 0.07 \times (1 - Hte)$ is the plasma volume.

Measurement of endothelial permeability with FITC-albumin

Lungs were removed and homogenized in 1 ml of isotonic saline, and then centrifuged at $4,000 \times g$ for 10 min. Blood collected through right ventricle puncture was centrifuged also at $4,000 \times g$ for 10 min. Measurement of FITC-albumin was then realized in 100 μ l of the supernatants obtained from the lungs homogenate and the blood. Analysis of FITC-albumin (excitation 487 nm and emission 520 nm) was performed with a microscope Nikon 50I connected to a camera coolSNAP (Roper Scientific). Fluorescence emission was calculated using a Metamorph software (Molecular Imagine). Then, permeability obtained with FITC-albumin (Perm-FITC) was calculated by the following equation:

$$(3) \quad \text{Perm-FITC (\%)} = (((FL_{HS} - FL_N) \times W_H) - QFB) / ((F_{BS} - F_{BN}) \times We \times 0.07 \times (1 - Hte))$$

where :

FL_{HS} is fluorescence obtained in the lung homogenate supernatant.

FL_N is natural fluorescence of lung homogenate supernatant measured without administration of FITC-albumin.

F_{BS} is fluorescence obtained in the plasma, and $We \times 0.07 \times (1 - Hte)$ is the plasma volume.

F_{BN} is natural fluorescence of plasma measured without administration of FITC-albumin.

W_H (in g) is the weight of homogenate obtained after homogenization of lungs in 1 ml of saline.

QFB is the proportion of fluorescence corresponding to intrapulmonary blood (residual intravascular blood plus that introduced into the lung interstitium via bleeding or injury).

We (in g) is the mouse's weight.

Hte is the hematocrite calculated in the total blood.

And QFB is calculated as described below :

$$(4) \quad QFB = ((FL_{HS} - FL_N) \times Hb_{HS}) / Hb$$

Hb_{HS} (in g/dl) is the rate of residual hemoglobin measured in the homogenate supernatant.

Hb (in g/dl) is the rate of hemoglobin measured in total blood.

Evaluation of the amounts of free label for both probes

Both ^{125}I -labeled albumin and FITC-albumin were dialysed to evaluate their respective fraction of free label (^{125}I ode and fluorescein isothiocyanate).

For ^{125}I -labeled albumin, radioactivity of a 0.5 ml-sample of the solution was counted in a gamma counter (Packard, Meriden, CT). Then the sample was dialysed, using a Microcon-YM-30* centrifugal filter device (Millipore, Molsheim, France), and radioactivity was determined for the dialysate. The ratio of the two measurements gave an evaluation of the free label.

For FITC-albumin, the same method was employed with a sample of 0.5 ml of a 1 mg/ml-solution, and analysis of fluorescence emission before and after dialysis.

Three determinations were performed for each probe.

Comparisons

Two groups of mice were assessed: infected mice and controls. Both groups were compared for measurements of permeability obtained by radioactivity and FITC-albumin. A Mann-Whitney test was used to compare means between two groups. A level of 5 % was accepted as statistically significant. Correlation between values obtained for each given mice with the two methods was determined by calculation of the Spearman's rank correlation coefficient ρ .

To assess the degree of agreement between the two measurements, a bias analysis was performed, according to Bland-Altman's method (6), with calculation of the mean ratio and SD of the ratios. The range of ± 2 SD of the ratios estimates the 95 % level of agreement between the two techniques (Figure 4).

Results and discussion

The increment of endothelial permeability is a broad indicator of lung injury in murine models (7). Different methods have been developed to measure this parameter, either *ex vivo* on isolated organs, or *in vivo*. Extravasation of labeled albumin injected either intravenously or *via*

intraperitoneal route, and then measured in the extravascular compartment of the lungs is considered a sensitive approach of endothelial permeability (7). Different types of tracers and techniques have been used. Measurements of transvascular transport of labeled proteins is accurately used in isolated lungs, because then filtration conditions can be defined by investigators (8, 9). But this is a delicate technique, that cannot be used for comparisons of large groups of animals. In intact mice, extravasation of radio-labeled albumin, has been extensively used to track lung permeability increases (10-13). Since methods using radioactivity impose heavy constraints, alternatives, like Evans blue dye, have been proposed in different models (2, 3, 14) with a good correlation between methods using this dye and the ones using radioactivity, although albumin clearances in rat lungs appeared higher with the dye-albumin conjugate. Because FITC-albumin is cheap and practical for routine use, we compared a method of measurement of endothelial permeability using FITC-albumin with the reference marker ^{125}I -albumin, that is regularly utilized in our lab, for the study of lung injury induced by *Pseudomonas aeruginosa* infection.

The characteristics of FITC-albumin necessitated a few adaptations from the reference method with ^{125}I -albumin. First, because hemoglobin prevents the analysis of fluorescence emission by FITC-albumin, we had to perform the measurement of the endovascular part of the marker in the plasma instead of the total blood. Likewise, fluorescence could not be assessed on solid tissues, and necessitated homogenization of the lungs in saline and then measurement on the supernatant. Assessment of fluorescence was performed on equal volumes of plasma and lung homogenate supernatant. On the contrary, measurements of radioactivity were performed on unprepared lungs and blood. These major differences in the processing of the two methods could be a bit of explanation for the differences recorded in the levels of endothelial permeability obtained with both. Nevertheless, despite these differences, the two methods appeared well correlated, as shown by a Spearman correlation coefficient of 0.88 and Bland-Altman's analysis of bias.

Different possible sources of error in the calculation of endothelial permeability with FITC-albumin were assessed, like the lung blood volumes, the fractions of free labels, and the natural spontaneous fluorescence of biological samples.

The fraction of intrapulmonary blood (residual intravascular blood plus that introduced into the lung interstitium via bleeding or injury) was determined for each mouse, and levels were compared between the control group and the infected group. It did not appear to be a significant source of variation between both groups (mean of results $\pm$ SD: 0.023 ± 0.005 for the control group vs 0.024 ± 0.007 for the infected animals, $p = 0.93$).

Both probes were dialyzed to determine the respective proportions of free label. The fractions of free labels were 2.9% for the isotope, and 9.3% for FITC. These fractions were quite different and could be considered a source of variation between the two methods of calculation.

At last, the natural fluorescence of biological samples has been evaluated too. For this, plasma and lung homogenate supernatants from five animals were assessed, without administration of any marker. Spontaneous fluorescence was 202 ± 7 for lung homogenate supernatants, and 207 ± 19 for plasma. These values were not different for both types of samples ($p=1.00$). But the proportion of natural fluorescence induced a correction proportionally more important for the value obtained in the lung homogenate supernatant than for the one measured in the plasma. This correction appears crucial in the calculation of fluorescence in the lung homogenate supernatant.

Finally, the aim of this new method is the easy comparison of mice groups exposed to different sources of lung injury. The results of endothelial permeability obtained for both groups of control and infected mice with ^{125}I -albumin and FITC-albumin are shown respectively in figures 1 and 2.

The mean permeability $\pm$ SEM measured with ^{125}I -albumin was 2.45 ± 0.37 for the control mice and 6.65 ± 0.77 for the infected ones ($p < 0.0001$). With FITC-albumin, results obtained for both groups were respectively 4.96 ± 0.64 and 11.5 ± 1.2 ($p < 0.0001$). Similarly significant differences were obtained between infected and control animals by both methods, despite different levels of endothelial permeability with the two markers. Besides, Spearman's rank correlation coefficient ρ was equal to 0.88 ($p < 0.0001$), indicating a very strong correlation between values obtained with both methods (Figure 3). And Bland-Altman's analysis of bias (Figure 4) revealed that there was no significant bias between FITC-albumin-derived and ^{125}I -albumin-derived values (observed bias: 0.57 ± 0.24 ; 95% confidence intervals: from 0.1 to 1.04).

So we think that, despite a potential increased bias due to the higher proportion of free label, FITC-albumin is an accurate marker for the measurement of endothelial permeability in mice. Although fluorescence can't be measured directly on lung tissue and whole blood and necessitates an extra manipulation, compared radioactivity-derived methods, it offers obvious advantages in terms of safety in manipulation, storage and management of biological waste. It is crucial, for the calculation of fluorescence in the biological samples, to subtract the natural spontaneous fluorescence observed in these samples.

Conclusion

We tested FITC-albumin as a marker for measurement of endothelial permeability in mice, in comparison with ^{125}I -albumin. Evaluation of pulmonary damages between infected mice and controls was as accurately performed with both methods, with an excellent correlation, and with obvious advantages for FITC-albumin, in terms of safety during manipulations, storage and evacuation of biological waste.

References

- 1- Folkesson HG, Matthay MA, Hébert CA, and Broaddus VC. Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms. *J Clin Invest.* 1995;96:107-16.
- 2- Barnes PJ, Boschetto P, and Barnes PJ. Plasma exudation: correlation between Evans Blue dye and radiolabeled albumin in guinea pig airways in vivo. *J Pharmacol Methods* 21: 309-315, 1989.
- 3- Green TP, Johnson DE, Marchessault RP, and Gatto CW. Transvascular flux and tissue accrual of Evans blue: effects of endotoxin and histamine. *J Lab Clin Med* 111: 173-183, 1988.
- 4- Wang le F, Patel M, Razavi HM, Weicker S, Joseph MG, McCormack DG, and Mehta S. Role of inducible nitric oxide synthase in pulmonary microvascular protein leak in murine sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 1634-1639, 2002.
- 5- Lecuona E, Saldias F, Comellas A, Ridge K, Guerrero C, and Sznajder JI. Ventilator-associated lung injury decreases lung ability to clear edema in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 159: 603-609, 1999.
- 6- Bland JM, and Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1: 307-310, 1986.
- 7- Mizgerd JP, and Skerrett SJ. Animals models of human pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 294: 387-398, 2008.
- 8- Kern DF, and Malik AB. Microvascular albumin permeability in isolated perfused lungs: effects of EDTA. *J Appl Physiol* 58: 372-375, 1985.
- 9- Rippe B, and Taylor A. NEM and filipin increase albumin transport in lung microvessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H34-H41, 2001.

- 10- Weiser MR, Pechet TT, Williams JP, Ma M, Frenette PS, Moore FD, Kobzik L, Hines RO, Wagner DD, Carroll MC, and Hechtman HB. Experimental murine acid aspiration injury is mediated by neutrophils and the alternative complement pathway. *J Appl Physiol* 83: 1090-1095, 1997.
- 11- Frossard JL, Saluja AK, Mach N, Lee HS, Bhagat L, Hadenque A, Rubbia-Brandt L, Dranoff G, and Steer ML. In vivo evidence for the role of GM-CSF as a mediator in acute pancreatitis-associated lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L541-L548, 2002.
- 12- Xu N, Rahman A, Minshall RD, Tiruppathi C, and Malik AB. β_2 -Integrin blockade driven by E-selectin promoter prevents neutrophil sequestration and lung injury in mice. *Circ Res* 87: 254-260, 2000.
- 13- Kyriakides C, Austen W Jr, Wang Y, Favuzza J, Kobzik L, Moore FD Jr, and Hechtman HB. Membrane attack complex of complement and neutrophils mediate the injury of acid aspiration. *J Appl Physiol* 87: 2357-2361, 1999.
- 14- Wang LF, Patel M, Razavi HM, Weicker S, Joseph MG, McCormack DG, and Mehta S. Role of inducible nitric oxide synthase in pulmonary microvascular protein leak in murine sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 1634-1639, 2002.

Figure 1: Comparison of endothelial permeability ratios between controls and infected mice, measured with ^{125}I -labeled albumin.

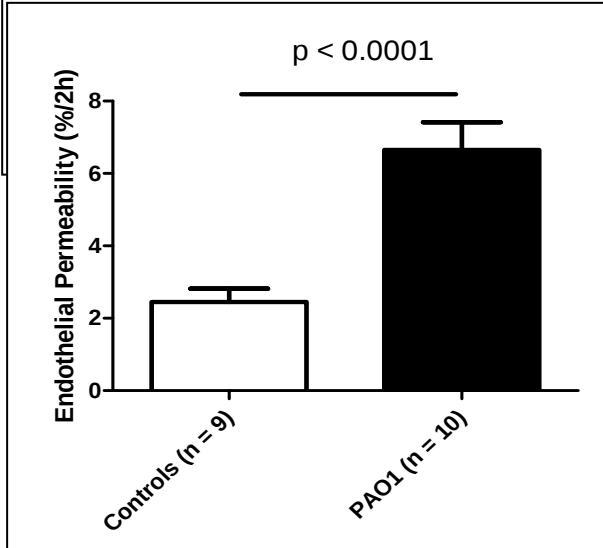
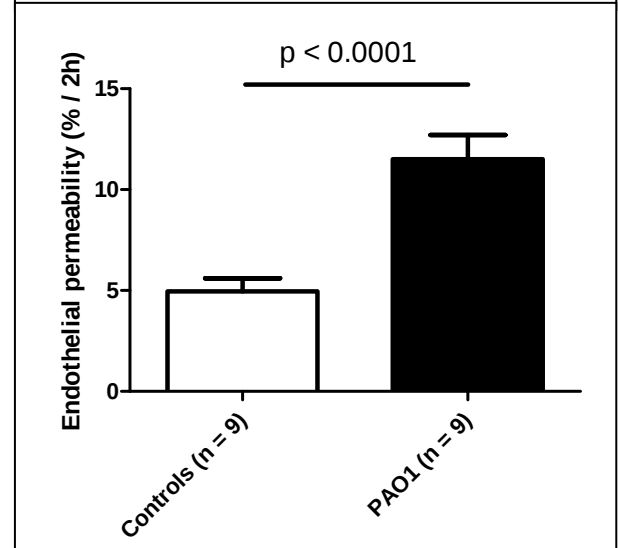
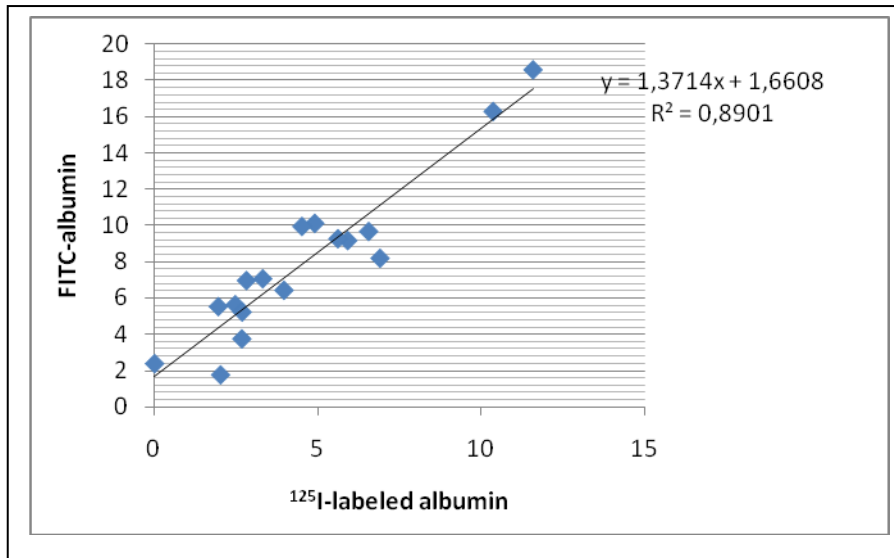


Figure 2: Comparison of endothelial permeability ratios between controls and infected mice, measured with FITC-labeled albumin.



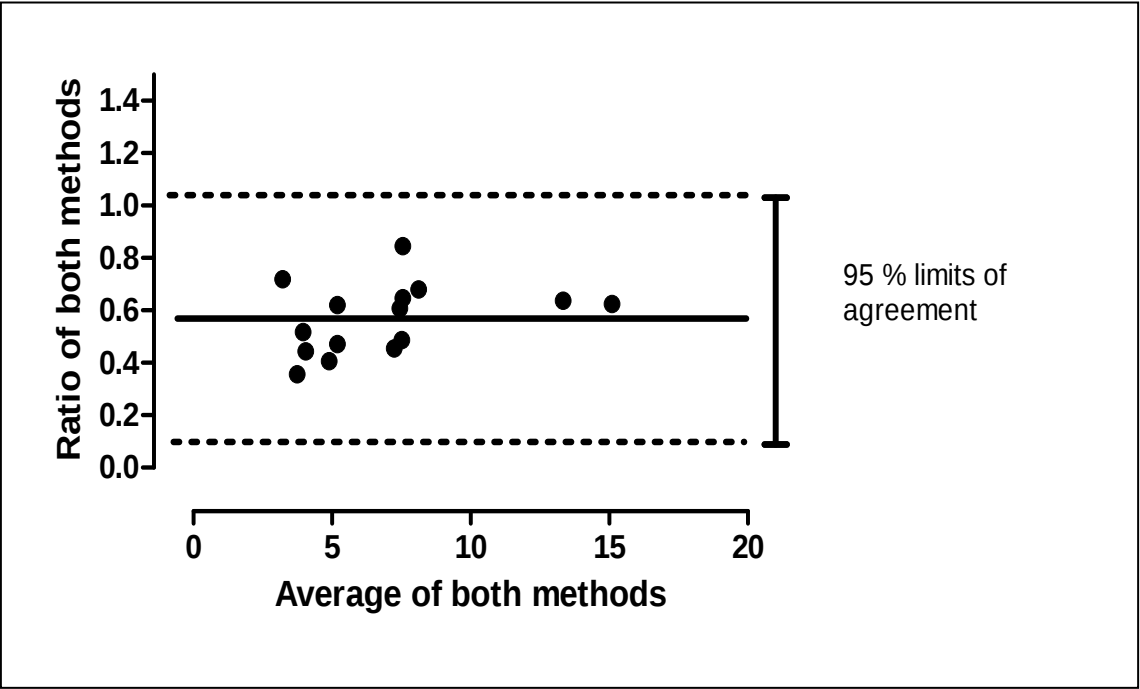
The data are means $\pm$ standard errors (SE, indicated by error bars). Ten mice were evaluated in the infected group and nine in the control group. Black bars are for the infected mice and white ones for the controls. Endothelial permeability (EP) is expressed as an evaluation of the clearance of the labeled albumin flux across endothelial barrier (%/2h), with the alveolar to plasmatic ratio of this marker at the end of the protocol (2 hours after intraperitoneal administration of the marker). The infected group gave significantly higher levels of permeability than the control mice, with the two methods.

Figure 3: Correlation between measurements of endothelial permeability ratios by ^{125}I -labeled albumin and FITC-albumin.



Spearman's rank correlation coefficient ρ between both methods is equal to 0.88 ($p < 0.0001$).

Figure 4: Bland-Altman analysis of agreement between both methods.



The Bland-Altman analysis of bias revealed that there was no significant bias between FITC-albumin-derived and ^{125}I -albumin-derived values (observed bias: 0.57 ± 0.24 ; 95% confidence intervals: from 0.1 to 1.04).

IV- PERSPECTIVES

Les questions soulevées par cette thèse sont nombreuses, et offrent de belles perspectives de travail pour l'avenir, à la fois pour la thérapeutique, et pour la compréhension des mécanismes de virulence des infections à *P. aeruginosa*.

Sur le plan de la thérapeutique antibiotique, les données obtenues dans le modèle d'endocardite expérimentale devront être confirmées dans des modèles qui se rapprochent plus de la physiopathologie des infections humaines à *P. aeruginosa*, comme les modèles de pneumonie. Des souches cliniques pourraient être étudiées cette fois. De façon à pouvoir exploiter les possibilités de simulation des paramètres humains de PK/PD, le modèle de pneumonie du lapin pourrait s'avérer judicieux.

L'influence de l'efflux sur les carbapénèmes est mal connue *in vivo*. Au moment où sortent sur le marché de nouveaux carbapénèmes comme le tomopénème ou le doripénème, qui gardent une activité *in vitro* sur les souches mutées sur OprD, mais qui subissent l'efflux, il sera intéressant de tester ces antibiotiques sur les modèles expérimentaux d'infection contre des souches exprimant ces mécanismes.

Nous avons constaté que la régulation de la virulence chez *P. aeruginosa* est multifactorielle. L'utilisation des nouveaux outils d'analyse comme les PCR en temps réel et la protéomique pourraient permettre d'avoir une idée plus précise des réseaux complexes de régulation intergénique. Qu'est ce qui fait qu'une souche surproduisant MexAB-OprM sera plus ou moins virulente que la souche sauvage dont elle est issue ? Des analyses comparatives selon l'influence constatée de MexAB-OprM sur les marqueurs de virulence seraient intéressantes à mener.

Enfin, l'hôte est grandement responsable de l'expression de la virulence chez la bactérie, que ce soit par l'affinité plus ou moins importante des récepteurs utilisés par la bactérie pour la colonisation et l'infection, que par l'intensité et l'efficacité de la réponse immunitaire innée. Ces facteurs sont modulés génétiquement, et constituent un élément fondamental de la biodiversité indispensable à la conservation de l'espèce. Certains patients « clearent » la

bactérie ou jugulent l'infection mieux que d'autres. Les rapports entre les systèmes d'efflux et l'immunité, notamment innée, constituent un vaste champ de recherche à défricher.

Perspectives thérapeutiques

Devant la résistance croissante de *P. aeruginosa* aux antibiotiques, et le ralentissement considérable de la recherche et du développement de nouveaux antibiotiques, des alternatives thérapeutiques anti-pseudomonas sont à l'étude depuis quelques années, telles que les inhibiteurs de pompes.^{93,200-202} Les différentes stratégies envisageables ont été détaillées dans une revue récente²⁰³:

- Contourner les mécanismes d'efflux : par exemple en modifiant le design moléculaire de molécules existantes pour diminuer leur affinité envers les sites dévolus à leur captation au niveau des pompes à efflux, par exemple en ajoutant des chaînes latérales aux molécules.
- Augmenter la perméabilité de la membrane externe : soit directement, par un effet de type détergent, soit par un effet canal-bloqueur.
- Soit en bloquant la capacité d'efflux de la bactérie : par inhibition compétitive ou non compétitive.

Néanmoins, à l'heure actuelle, il n'existe pas encore de composé utilisable en clinique. La première stratégie, à savoir le design de molécules capables de contourner les systèmes d'efflux, n'a pas été explorée encore. Un composé perméabilisant de membrane est en cours de développement, le polymyxine B nonapeptide.²⁰⁴

Enfin, aucun inhibiteur d'efflux n'a encore obtenu d'agrément pour une utilisation antibactérienne en médecine humaine ou vétérinaire. On se heurte encore pour ces composés aux problèmes de toxicité pour la cellule eucaryote, du fait de l'ubiquité des systèmes d'efflux au sein du Vivant.

Par ailleurs, au vu des données obtenues dans cette thèse, il sera intéressant d'étudier l'évolution de la virulence bactérienne en cas de

confrontation à un inhibiteur d'efflux. Il est probable que ces molécules doivent s'inscrire dans des associations avec des antibiotiques ou d'autres inhibiteurs de virulence.

V- CONCLUSION

Nous avons montré que l'influence de MexAB-OprM sur les infections à *P. aeruginosa* en clinique est beaucoup plus complexe que ne le laisseraient croire des travaux menés *in vitro* sur quelques souches de laboratoire.

En thérapeutique, les CMI ne rendent qu'imparfaitement compte de l'influence délétère de MexAB-OprM sur les antibiotiques anti-*Pseudomonas*, comme le prouvent les résultats discordants obtenus entre les CMI relativement basses de la pipéracilline/tazobactam et son absence d'efficacité *in vivo* sur un modèle d'infection sévère à *P. aeruginosa*. Ces résultats plaident pour un dépistage en clinique du système d'efflux MexAB-OprM, pour une lecture interprétative de l'antibiogramme obtenu pour les souches concernées, et pour une poursuite des travaux explorant l'impact *in vivo* de ce système de résistance sur les antibiotiques, et notamment sur les carbapénèmes.

Il serait dangereux de croire que les souches surproduisant MexAB-OprM seraient moins virulentes. Les travaux réalisés pour cette thèse avec des souches cliniques montrent que l'effet de MexAB-OprM sur la virulence est imprévisible de prime abord, pouvant aboutir à une modification de l'expression des facteurs de virulence à la hausse ou à la baisse. La régulation de la virulence chez *P. aeruginosa* est multifactorielle, et la modification d'un seul facteur, aussi important soit-il dans l'homéostasie bactérienne, ne suffit pas à modifier fondamentalement le comportement de la bactérie. Cette donnée est fondamentale pour l'expérimentation et l'utilisation en clinique des thérapeutiques futures dirigées contre les systèmes d'efflux et contre les déterminants de la virulence.

Cette meilleure compréhension de la résistance aux antibiotiques et de la régulation de la virulence chez *P. aeruginosa* offre de nombreuses perspectives de recherche. Nous plaçons pour que l'approche fondamentale des problèmes ne se coupe jamais de leur approche clinique, la biodiversité et les interactions hôte-microorganisme faisant d'une maladie infectieuse donnée chez un patient donné une situation particulière échappant aux généralisations hâtives.

VI- Bibliographie

R

- (1) Emori TG, Gaynes RP. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev.* 1993;6:428-442.
- (2) Spencer RC. Predominant pathogens found in the European Prevalence of Infection in Intensive Care Study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1996;15:281-285.
- (3) Rello J, Jubert P, Valles J, Artigas A, Rue M, Niederman MS. Evaluation of outcome for intubated patients with pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis.* 1996;23:973-978.
- (4) Feldman M, Bryan R, Rajan S, Scheffler L, Brunnert S, Tang H, Prince A. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect Immun.* 1998;66:43-51.
- (5) Adamo R, Sokol S, Soong G, Gomez MI, Prince A. *Pseudomonas aeruginosa* flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;30:627-634.
- (6) DiMango E, Zar HJ, Bryan R, Prince A. Diverse *Pseudomonas aeruginosa* gene products stimulate respiratory epithelial cells to produce interleukin-8. *J Clin Invest.* 1995;96:2204-2210.
- (7) Zhang S, McCormack FX, Levesque RC, O'Toole GA, Lau GW. The flagellum of *Pseudomonas aeruginosa* is required for resistance to clearance by surfactant protein A. *PLoS ONE.* 2007;2:e564.
- (8) Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect.* 2006;36:78-91.
- (9) Mattick JS. Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:289-314.
- (10) Hahn HP. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* : a review. *Gene.* 1997;192:99-108.
- (11) Gupta SK, Berk RS, Masinick S, Hazlett LD. Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1. *Infect Immun.* 1994;62:4572-4579.

- (12) Ratner AJ, Bryan R, Weber A, Nguyen S, Barnes D, Pitt A, Gelber S, Cheung A, Prince A. Cystic fibrosis pathogens activate Ca²⁺-dependent mitogen-activated protein kinase signaling pathways in airway epithelial cells. *J Biol Chem*. 2001;276:19267-19275.
- (13) Davies JC. *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: pathogenesis and persistence. *Paediatr Respir Rev*. 2002;3:128-134.
- (14) Mathee K, Ciofu O, Sternberg C, Lindum PW, Campbell JI, Jensen P, Johnsen AH, Givskov M. Muroid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology*. 1999;145 (Pt 6):1349-1357.
- (15) Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydom A, Molin S, Givskov M, Parsek MR. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol*. 2001;183:5395-5401.
- (16) Cobb LM, Mychaleckyj JC, Wozniak DJ, Lopez-Boado YS. *Pseudomonas aeruginosa* flagellin and alginate elicit very distinct gene expression patterns in airway epithelial cells: implications for cystic fibrosis disease. *J Immunol*. 2004;173:5659-5670.
- (17) Leidal KG, Munson KL, Denning GM. Small molecular weight secretory factors from *Pseudomonas aeruginosa* have opposite effects on IL-8 and RANTES expression by human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001;25:186-195.
- (18) Denning GM, Wollenweber LA, Railsback MA, Cox CD, Stoll LL, Britigan BE. *Pseudomonas* pyocyanin increases interleukin-8 expression by human airway epithelial cells. *Infect Immun*. 1998;66:5777-5784.
- (19) Allen L, Dockrell DH, Pattery T, Lee DG, Cornelis P, Hellewell PG, Whyte MK. Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *J Immunol*. 2005;174:3643-3649.
- (20) O'Malley YQ, Reszka KJ, Spitz DR, Denning GM, Britigan BE. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;287:L94-103.
- (21) O'Malley YQ, Reszka KJ, Rasmussen GT, Abdalla MY, Denning GM, Britigan BE. The *Pseudomonas* secretory product pyocyanin inhibits catalase activity in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;285:L1077-L1086.
- (22) Guzzo J, Pages JM, Duong F, Lazdunski A, Murgier M. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease: evidence for secretion genes and study of secretion mechanism. *J Bacteriol*. 1991;173:5290-5297.

- (23) Malloy JL, Veldhuizen RA, Thibodeaux BA, O'Callaghan RJ, Wright JR. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288:L409-L418.
- (24) Azghani AO. *Pseudomonas aeruginosa* and epithelial permeability: role of virulence factors elastase and exotoxin A. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996;15:132-140.
- (25) Azghani AO, Gray LD, Johnson AR. A bacterial protease perturbs the paracellular barrier function of transporting epithelial monolayers in culture. *Infect Immun*. 1993;61:2681-2686.
- (26) Azghani AO, Miller EJ, Peterson BT. Virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa* increase lung epithelial permeability. *Lung*. 2000;178:261-269.
- (27) Kon Y, Tsukada H, Hasegawa T, Igarashi K, Wada K, Suzuki E, Arakawa M, Gejyo F. The role of *Pseudomonas aeruginosa* elastase as a potent inflammatory factor in a rat air pouch inflammation model. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999;25:313-321.
- (28) Alcorn JF, Wright JR. Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *J Biol Chem*. 2004;279:30871-30879.
- (29) Mariencheck WI, Alcorn JF, Palmer SM, Wright JR. *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28:528-537.
- (30) Dulon S, Leduc D, Cottrell GS, D'Alayer J, Hansen KK, Bunnett NW, Hollenberg MD, Pidard D, Chignard M. *Pseudomonas aeruginosa* elastase disables proteinase-activated receptor 2 in respiratory epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;32:411-419.
- (31) Holm BA, Keicher L, Liu MY, Sokolowski J, Enhorning G. Inhibition of pulmonary surfactant function by phospholipases. *J Appl Physiol*. 1991;71:317-321.
- (32) Terada LS, Johansen KA, Nowbar S, Vasil AI, Vasil ML. *Pseudomonas aeruginosa* hemolytic phospholipase C suppresses neutrophil respiratory burst activity. *Infect Immun*. 1999;67:2371-2376.
- (33) Wilderman PJ, Vasil AI, Johnson Z, Vasil ML. Genetic and biochemical analyses of a eukaryotic-like phospholipase D of *Pseudomonas aeruginosa* suggest horizontal acquisition and a role for persistence in a chronic pulmonary infection model. *Mol Microbiol*. 2001;39:291-303.

- (34) Ochsner UA, Snyder A, Vasil AI, Vasil ML. Effects of the twin-arginine translocase on secretion of virulence factors, stress response, and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:8312-8317.
- (35) Pavlovskis OR, Iglewski BH, Pollack M. Mechanism of action of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A in experimental mouse infections: adenosine diphosphate ribosylation of elongation factor 2. *Infect Immun*. 1978;19:29-33.
- (36) Kudoh I, Wiener-Kronish JP, Hashimoto S, Pittet JF, Frank D. Exoproduct secretions of *Pseudomonas aeruginosa* strains influence severity of alveolar epithelial injury. *Am J Physiol*. 1994;267:L551-L556.
- (37) Shaver CM, Hauser AR. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun*. 2004;72:6969-6977.
- (38) Maresso AW, Baldwin MR, Barbieri JT. Ezrin/radixin/moesin proteins are high affinity targets for ADP-ribosylation by *Pseudomonas aeruginosa* ExoS. *J Biol Chem*. 2004;279:38402-38408.
- (39) Epelman S, Stack D, Bell C, Wong E, Neely GG, Krutzik S, Miyake K, Kubes P, Zbytniuk LD, Ma LL, Xie X, Woods DE, Mody CH. Different domains of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S activate distinct TLRs. *J Immunol*. 2004;173:2031-2040.
- (40) Lee VT, Smith RS, Tummler B, Lory S. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immun*. 2005;73:1695-1705.
- (41) Sayner SL, Frank DW, King J, Chen H, VandeWaa J, Stevens T. Paradoxical cAMP-induced lung endothelial hyperpermeability revealed by *Pseudomonas aeruginosa* ExoY. *Circ Res*. 2004;95:196-203.
- (42) Sato H, Frank DW, Hillard CJ, Feix JB, Pankhaniya RR, Moriyama K, Finck-Barbancon V, Buchaklian A, Lei M, Long RM, Wiener-Kronish J, Sawa T. The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J*. 2003;22:2959-2969.
- (43) Tamura M, Ajayi T, Allmond LR, Moriyama K, Wiener-Kronish JP, Sawa T. Lysophospholipase A activity of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretory toxin ExoU. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;316:323-331.
- (44) Pankhaniya RR, Tamura M, Allmond LR, Moriyama K, Ajayi T, Wiener-Kronish JP, Sawa T. *Pseudomonas aeruginosa* causes acute lung injury via the catalytic activity of the patatin-like phospholipase domain of ExoU. *Crit Care Med*. 2004;32:2293-2299.

- (45) Cavallo JD, Hocquet D, Plesiat P, Fabre R, Roussel-Delvallez M. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials: a 2004 French multicentre hospital study. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:1021-1024.
- (46) Nikaido H. Antibiotic resistance caused by gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin Infect Dis.* 1998;27 Suppl 1:S32-S41.
- (47) Poole K. Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-positive bacteria and the mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:2595-2599.
- (48) Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:382-402.
- (49) Pao SS, Paulsen IT, Saier MH, Jr. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62:1-34.
- (50) Van Veen HW, Konings WN. Structure and function of multidrug transporters. *Adv Exp Med Biol.* 1998;456:145-158.
- (51) Saier MH, Jr., Tam R, Reizer A, Reizer J. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol.* 1994;11:841-847.
- (52) Paulsen IT, Skurray RA, Tam R, Saier MH Jr., Turner RJ, Weiner JH, Goldberg EB, Grinius LL. The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol Microbiol.* 1996;19:1167-1175.
- (53) Brown MH, Paulsen IT, Skurray RA. The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters. *Mol Microbiol.* 1999;31:394-395.
- (54) Koronakis V, Eswaran J, Hughes C. Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem.* 2004;73:467-489.
- (55) Aires JR, Nikaido H. Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2005;187:1923-1929.
- (56) Eswaran J, Koronakis E, Higgins MK, Hughes C, Koronakis V. Three's company: component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Curr Opin Struct Biol.* 2004;14:741-747.

- (57) Kohler T, Michea-Hamzehpour M, Henze U, Gotoh N, Curty LK, Pechere JC. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*. 1997;23:345-354.
- (58) Poole K, Tetro K, Zhao Q, Neshat S, Heinrichs DE, Bianco N. Expression of the multidrug resistance operon mexA-mexB-oprM in *Pseudomonas aeruginosa*: mexR encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40:2021-2028.
- (59) Schweizer HP. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet Mol Res*. 2003;2:48-62.
- (60) Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56:20-51.
- (61) Hocquet D, Roussel-Delvallez M, Cavallo JD, Plesiat P. MexAB-OprM- and MexXY-overproducing mutants are very prevalent among clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* with reduced susceptibility to ticarcillin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:1582-1583.
- (62) Miller PF, Sulavik MC. Overlaps and parallels in the regulation of intrinsic multiple-antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 1996;21:441-448.
- (63) Evans K, Adewoye L, Poole K. 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*. 2001;183:807-812.
- (64) Srikumar R, Paul CJ, Poole K. Influence of mutations in the mexR repressor gene on expression of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2000;182:1410-1414.
- (65) Boutoille D, Corvec S, Caroff N et al. Detection of an IS21 insertion sequence in the mexR gene of *Pseudomonas aeruginosa* increasing beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;230:143-146.
- (66) Llanes C, Neuwirth C, El GF, Hocquet D, Plesiat P. Genetic analysis of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* producing PER-1 beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12:270-278.
- (67) Cao L, Srikumar R, Poole K. MexAB-OprM hyperexpression in NalC-type multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: identification and characterization of the nalC gene encoding a repressor of PA3720-PA3719. *Mol Microbiol*. 2004;53:1423-1436.

- (68) Sobel ML, Hocquet D, Cao L, Plesiat P, Poole K. Mutations in PA3574 (nalD) lead to increased MexAB-OprM expression and multidrug resistance in laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:1782-1786.
- (69) Maseda H, Sawada I, Saito K, Uchiyama H, Nakae T, Nomura N. Enhancement of the mexAB-oprM efflux pump expression by a quorum-sensing autoinducer and its cancellation by a regulator, MexT, of the mexEF-oprN efflux pump operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:1320-1328.
- (70) Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2006;4:629-636.
- (71) Hirakata Y, Srikumar R, Poole K, Gotoh N, Suematsu T, Kohno S, Kamihira S, Hancock RE, Speert DP. Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Exp Med*. 2002;196:109-118.
- (72) Frisk A, Schurr JR, Wang G, Bertucci DC, Marrero L, Hwang SH, Hassett DJ, Schurr MJ. Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* after interaction with human airway epithelial cells. *Infect Immun*. 2004;72:5433-5438.
- (73) Join-Lambert OF, Michea-Hamzehpour M, Kohler T, Chau F, Faurisson F, Dautrey S, Vissuzaine C, Carbon C, Pechere J. Differential selection of multidrug efflux mutants by trovafloxacin and ciprofloxacin in an experimental model of *Pseudomonas aeruginosa* acute pneumonia in rats. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:571-576.
- (74) Juhas M, Wiehlmann L, Huber B, Jordan D, Lauber J, Salunkhe P, Limpert AS, von Gotz F, Steinmetz I, Eber L, Tummeler B. Global regulation of quorum sensing and virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*. 2004;150:831-841.
- (75) Chen H, Hu J, Chen PR, Lan L, Li Z, Hicks LM, Dinner AR, He C. The *Pseudomonas aeruginosa* multidrug efflux regulator MexR uses an oxidation-sensing mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:13586-13591.
- (76) Cosson P, Zulianello L, Join-Lambert O, Faurisson F, Gebbie L, Benghezal M, Van Delden C, Curty LK, Kohler T. *Pseudomonas aeruginosa* virulence analyzed in a Dictyostelium discoideum host system. *J Bacteriol*. 2002;184:3027-3033.
- (77) Linares JF, Lopez JA, Camafeita E, Albar JP, Rojo F, Martinez JL. Overexpression of the multidrug efflux pumps MexCD-OprJ and MexEF-OprN is associated with a reduction of type III secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2005;187:1384-1391.
- (78) Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*. 2004;64:159-204.
- (79) Dean CR, Visalli MA, Projan SJ, Sum PE, Bradford PA. Efflux-mediated resistance to tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:972-978.

- (80) Kohler T, Kok M, Michea-Hamzehpour M, Plesiat P, Gotoh N, Nishino T, Curty LK, Pechere JC. Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40:2288-2290.
- (81) Li XZ, Zhang L, Srikumar R, Poole K. Beta-lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42:399-403.
- (82) Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44:3322-3327.
- (83) Srikumar R, Li XZ, Poole K. Inner membrane efflux components are responsible for beta-lactam specificity of multidrug efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 1997;179:7875-7881.
- (84) Li XZ, Poole K, Nikaido H. Contributions of MexAB-OprM and an EmrE homolog to intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides and dyes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:27-33.
- (85) Srikumar R, Tsang E, Poole K. Contribution of the MexAB-OprM multidrug efflux system to the beta-lactam resistance of penicillin-binding protein and beta-lactamase-derepressed mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 1999;44:537-540.
- (86) Schweizer HP. 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*. 1998;42:394-398.
- (87) Evans K, Passador L, Srikumar R, Tsang E, Nezezon J, Poole K. Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 1998;180:5443-5447.
- (88) Pearson JP, Van DC, Iglewski BH. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol*. 1999;181:1203-1210.
- (89) Cavallo JD, Plesiat P, Couetdic G, Leblanc F, Fabre R. Mechanisms of beta-lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: prevalence of OprM-overproducing strains in a French multicentre study (1997). *J Antimicrob Chemother*. 2002;50:1039-1043.

- (90) Llanes C, Hocquet D, Vogne C, ali-Baitich D, Neuwirth C, Plesiat P. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:1797-1802.
- (91) De Kievit TR, Parkins MD, Gillis RJ , Srikumar R, Ceri H, Poole K, Iglewski BH, Storey DG. Multidrug efflux pumps: expression patterns and contribution to antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1761-1770.
- (92) Mesaros N, Glupczynski Y, Avrain L, Caceres NE, Tulkens PM, Van BF. A combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:378-386.
- (93) Lomovskaya O, Lee A, Hoshino K, Ishida H, Mistry A, Warren MS, Boyer E, Chamberland S, Lee VJ. Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:1340-1346.
- (94) Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, ampC, and oprD expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50:1633-1641.
- (95) Le T, I, Couetdic G, Clermont O, Brahimi N, Plesiat P, Bingen E. In vivo selection of a target/efflux double mutant of *Pseudomonas aeruginosa* by ciprofloxacin therapy. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48:553-555.
- (96) Nakajima A, Sugimoto Y, Yoneyama H, Nakae T. High-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* due to interplay of the MexAB-OprM efflux pump and the DNA gyrase mutation. *Microbiol Immunol.* 2002;46:391-395.
- (97) Niga T, Ito H, Oyamada Y, Yamagishi J, Kadono M, Nishino T, Gotoh N, Inoue M. Cooperation between alteration of DNA gyrase genes and over-expression of MexB and MexX confers high-level fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a patient who received a liver transplant followed by treatment with fluoroquinolones. *Microbiol Immunol.* 2005;49:443-446.
- (98) Kohler T, Michea-Hamzehpour M, Plesiat P, Kahr AL, Pechere JC. Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:2540-2543.
- (99) Fukuda H, Hosaka M, Hirai K, Iyobe S. New norfloxacin resistance gene in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34:1757-1761.
- (100) Hirai K, Suzue S, Irikura T, Iyobe S, Mitsuhashi S. Mutations producing resistance to norfloxacin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31:582-586.

- (101) Legakis NJ, Tzouveleakis LS, Makris A, Kotsifaki H. Outer membrane alterations in multiresistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* selected by ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33:124-127.
- (102) Masuda N, Ohya S. Cross-resistance to meropenem, cepheems, and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36:1847-1851.
- (103) Rella M, Haas D. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO to nalidixic acid and low levels of beta-lactam antibiotics: mapping of chromosomal genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1982;22:242-249.
- (104) Kriengkauykiat J, Porter E, Lomovskaya O, Wong-Beringer A. Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49:565-570.
- (105) Gotoh N, Itoh N, Tsujimoto H, Yamagishi J, Oyamada Y, Nishino T. Isolation of OprM-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* by transposon insertion mutagenesis: evidence of involvement in multiple antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Lett.* 1994;122:267-273.
- (106) Kohler T, Epp SF, Curty LK, Pechere JC. Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 1999;181:6300-6305.
- (107) Livermore DM, Yang YJ. Comparative activity of meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* strains with well-characterized resistance mechanisms. *J Antimicrob Chemother.* 1989;24 Suppl A:149-159.
- (108) Masuda N, Sakagawa E, Ohya S. Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:645-649.
- (109) Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother.* 2001;47:247-250.
- (110) Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, Van Laethem Y, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A, Tulkens PM, Van Bambeke F. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13:560-578.
- (111) Sanchez P, Linares JF, Ruiz-Diez B, Campanario E, Navas A, Baquero F, Martinez JL. Fitness of in vitro selected *Pseudomonas aeruginosa* nalB and nfxB multidrug resistant mutants. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50:657-664.

- (112) Van DC, Iglewski BH. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis.* 1998;4:551-560.
- (113) Rumbaugh KP, Griswold JA, Hamood AN. The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbes Infect.* 2000;2:1721-1731.
- (114) Nealson KH, Platt T, Hastings JW. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol.* 1970;104:313-322.
- (115) McKnight SL, Iglewski BH, Pesci EC. The *Pseudomonas* quinolone signal regulates rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2000;182:2702-2708.
- (116) Pesci EC, Milbank JB, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, Iglewski BH. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:11229-11234.
- (117) Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR, Worrall KE, Camara M, Williams P. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Mol Microbiol.* 2003;50:29-43.
- (118) Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, Iglewski BH. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 1997;179:3127-3132.
- (119) Chugani SA, Whiteley M, Lee KM, D'Argenio D, Manoil C, Greenberg EP. QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:2752-2757.
- (120) Albus AM, Pesci EC, Runyen-Janecky LJ, West SE, Iglewski BH. Vfr controls quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 1997;179:3928-3935.
- (121) Reimann C, Beyeler M, Latifi A, Winteler H, Foglino M, Lazdunski A, Haas D. The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer N-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol Microbiol.* 1997;24:309-319.
- (122) de KT, Seed PC, Nezezon J, Passador L, Iglewski BH. RsaL, a novel repressor of virulence gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 1999;181:2175-2184.
- (123) Diggle SP, Winzer K, Lazdunski A, Williams P, Camara M. Advancing the quorum in *Pseudomonas aeruginosa*: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression. *J Bacteriol.* 2002;184:2576-2586.

- (124) Pessi G, Williams F, Hindle Z, Heurlier K, Holden MT, Camara M, Haas D, Williams P. The global posttranscriptional regulator RsmA modulates production of virulence determinants and N-acylhomoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2001;183:6676-6683.
- (125) Jude F, Kohler T, Branny P, Perron K, Mayer MP, Comte R, Van Delden C. Posttranscriptional control of quorum-sensing-dependent virulence genes by DksA in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 2003;185:3558-3566.
- (126) Lange R, Hengge-Aronis R. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 1991;5:49-59.
- (127) Loewen PC, Hengge-Aronis R. The role of the sigma factor sigma S (KatF) in bacterial global regulation. *Annu Rev Microbiol*. 1994;48:53-80.
- (128) Dong YH, Zhang XF, Xu JL, Tan AT, Zhang LH. VqsM, a novel AraC-type global regulator of quorum-sensing signalling and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*. 2005;58:552-564.
- (129) Stover CK, Pham XQ, Erwin AL et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*. 2000;406:959-964.
- (130) Lau GW, Hassett DJ, Britigan BE. Modulation of lung epithelial functions by *Pseudomonas aeruginosa*. *Trends Microbiol*. 2005;13:389-397.
- (131) Juhas M, Eberl L, Tummeler B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Environ Microbiol*. 2005;7:459-471.
- (132) Kondo A, Hirakata Y, Gotoh N, Fukushima K, Yanagihara K, Ohno H, Higashiyama Y, Miyazaki Y, Nishide K, Node M, Yamada Y, Kohno S, Kamihira S. Quorum sensing system lactones do not increase invasiveness of a MexAB-OprM efflux mutant but do play a partial role in *Pseudomonas aeruginosa* invasion. *Microbiol Immunol*. 2006;50:395-401.
- (133) Garrison PK, Freedman LR. Experimental endocarditis I. Staphylococcal endocarditis in rabbits resulting from placement of a polyethylene catheter in the right side of the heart. *Yale J Biol Med*. 1970;42:394-410.
- (134) Durack DT, Beeson PB. Experimental bacterial endocarditis. I. Colonization of a sterile vegetation. *Br J Exp Pathol*. 1972;53:44-49.
- (135) Sande MA, Irvin RG. Penicillin-aminoglycoside synergy in experimental *Streptococcus viridans* endocarditis. *J Infect Dis*. 1974;129:572-576.

- (136) Bugnon D, Potel G, Xiong YQ, Caillon J, Kergueris MF, Le Conte P, Baron D, Drugeon H. In vivo antibacterial effects of simulated human serum profiles of once-daily versus thrice-daily dosing of amikacin in a *Serratia marcescens* endocarditis experimental model. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40:1164-1169.
- (137) Dall L, Barnes WG, Lane JW, Mills J. Enzymatic modification of glycocalyx in the treatment of experimental endocarditis due to *viridans streptococci*. *J Infect Dis.* 1987;156:736-740.
- (138) Cozens RM, Tuomanen E, Tosch W, Zak O, Suter J, Tomasz A. Evaluation of the bactericidal activity of beta-lactam antibiotics on slowly growing bacteria cultured in the chemostat. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986;29:797-802.
- (139) Cremieux AC, Maziere B, Vallois JM, Ottaviani M, Azancot A, Raffoul H, Bouvet A, Pocard JJ, Carbon C. Evaluation of antibiotic diffusion into cardiac vegetations by quantitative autoradiography. *J Infect Dis.* 1989;159:938-944.
- (140) Li XZ, Livermore DM, Nikaido H. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38:1732-1741.
- (141) Zihra-Zarifi I, Llanes C, Kohler T, Pechere JC, Plesiat P. In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:287-291.
- (142) Perlman BB, Freedman LR. Experimental endocarditis. II. Staphylococcal infection of the aortic valve following placement of a polyethylene catheter in the left side of the heart. *Yale J Biol Med.* 1971;44:206-213.
- (143) Cash HA, Woods DE, McCullough B, Johanson WG, Jr., Bass JA. A rat model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am Rev Respir Dis.* 1979;119:453-459.
- (144) Wong-Beringer A, Wiener-Kronish J, Lynch S, Flanagan J. Comparison of type III secretion system virulence among fluoroquinolone-susceptible and -resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:330-336.
- (145) Essar DW, Eberly L, Hadero A, Crawford IP. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol.* 1990;172:884-900.
- (146) Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol.* 1997;179:5756-5767.

- (147) Jeannot K, Elsen S, Kohler T, Attree I, Van DC, Plesiat P. Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:2455-2462.
- (148) Berka RM, Gray GL, Vasil ML. Studies of phospholipase C (heat-labile hemolysin) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*. 1981;34:1071-1074.
- (149) Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986;1:307-310.
- (150) Li XZ, Nikaido H, Poole K. Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:1948-1953.
- (151) Robaux MA, Dube L, Caillon J, Bugnon D, Kergueris MF, Navas D, Le Conte P, Baron D, Potel G. In vivo efficacy of continuous infusion versus intermittent dosing of ceftazidime alone or in combination with amikacin relative to human kinetic profiles in a *Pseudomonas aeruginosa* rabbit endocarditis model. *J Antimicrob Chemother*. 2001;47:617-622.
- (152) Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH. *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:1306-1311.
- (153) Osmon S, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. Hospital mortality for patients with bacteremia due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest*. 2004;125:607-616.
- (154) Llanes C, Hocquet D, Vogne C, ali-Baitich D, Neuwirth C, Plesiat P. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:1797-1802.
- (155) Lodise TP, Jr., Lomaestro B, Drusano GL. Piperacillin-tazobactam for *Pseudomonas aeruginosa* infection: clinical implications of an extended-infusion dosing strategy. *Clin Infect Dis*. 2007;44:357-363.
- (156) Mattoes HM, Capitano B, Kim MK et al. Comparative pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of piperacillin/tazobactam 3.375G Q4H and 4.5G Q6H. *Chemotherapy*. 2002;48:59-63.
- (157) Alou L, Aguilar L, Sevillano D, Gimenez MJ, Echeverria O, Gomez-Lus ML, Prieto J. Is there a pharmacodynamic need for the use of continuous versus intermittent infusion with ceftazidime against *Pseudomonas aeruginosa*? An in vitro pharmacodynamic model. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55:209-213.

- (158) Boselli E, Breilh D, Rimmele T, Poupelin JC, Saux MC, Chassard D, Allaouchiche B. Plasma and lung concentrations of ceftazidime administered in continuous infusion to critically ill patients with severe nosocomial pneumonia. *Intensive Care Med.* 2004;30:989-991.
- (168) EUCAST Definitive Document E.DEF 2.1, August 2000: Determination of antimicrobial susceptibility test breakpoints. *Clin Microbiol Infect.* 2000;6:570-572.
- (159) Shaver CM, Hauser AR. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung. *Infect Immun.* 2004;72:6969-6977.
- (160) Feltman H, Schulert G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology.* 2001;147:2659-2669.
- (161) Fleiszig SM, Wiener-Kronish JP, Miyazaki H, Vallas V, Mostov KE, Kanada D, Sawa T, Yen TS, Frank DW. *Pseudomonas aeruginosa*-mediated cytotoxicity and invasion correlate with distinct genotypes at the loci encoding exoenzyme S. *Infect Immun.* 1997;65:579-586.
- (162) Lee VT, Smith RS, Tummier B, Lory S. Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted by the Type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immun.* 2005;73:1695-1705.
- (163) Bratu S, Gupta J, Quale J. Expression of the las and rhl quorum-sensing systems in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* does not correlate with efflux pump expression or antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58:1250-1253.
- (164) Rakhimova E, Munder A, Wiehlmann L, Bredenbruch F, Tummier B. Fitness of isogenic colony morphology variants of *Pseudomonas aeruginosa* in murine airway infection. *PLoS ONE.* 2008;3:e1685.
- (165) Lee DG, Urbach JM, Wu G, Liberati NT, Feinbaum RL, Miyata S, Diggins LT, He J, Saucier M, Deziel E, Friedman L, Li L, Grills G, Montgomery K, Kucherlapati R, Rahme LG, Ausubel FM. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. *Genome Biol.* 2006;7:R90.
- (166) Bollinger N, Hassett DJ, Iglewski BH, Costerton JW, McDermott TR. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of iron override effects on quorum sensing and biofilm-specific gene regulation. *J Bacteriol.* 2001;183:1990-1996.
- (167) Heurlier K, Denervaud V, Haas D. Impact of quorum sensing on fitness of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol.* 2006;296:93-102.

- (188) Cash HA, Woods DE, McCullough B, Johanson WG, Jr., Bass JA. A rat model of chronic respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am Rev Respir Dis*. 1979;119:453-459.
- (189) Folkesson HG, Matthay MA, Hebert CA, Broaddus VC. Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms. *J Clin Invest*. 1995;96:107-116.
- (190) Rogers DF, Boschetto P, Barnes PJ. Plasma exudation. Correlation between Evans blue dye and radiolabeled albumin in guinea pig airways in vivo. *J Pharmacol Methods*. 1989;21:309-315.
- (191) Green TP, Johnson DE, Marchessault RP, Gatto CW. Transvascular flux and tissue accrual of Evans blue: effects of endotoxin and histamine. *J Lab Clin Med*. 1988;111:173-183.
- (192) Wang IF, Patel M, Razavi HM et al. Role of inducible nitric oxide synthase in pulmonary microvascular protein leak in murine sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:1634-1639.
- (193) Lecuona E, Saldias F, Comellas A, Ridge K, Guerrero C, Sznajder JI. Ventilator-associated lung injury decreases lung ability to clear edema and downregulates alveolar epithelial cell Na,K-adenosine triphosphatase function. *Chest*. 1999;116:29S-30S.
- (194) Mizgerd JP, Skerrett SJ. Animal models of human pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294:L387-L398.
- (195) Kern DF, Malik AB. Microvascular albumin permeability in isolated perfused lung: effects of EDTA. *J Appl Physiol*. 1985;58:372-375.
- (196) Rippe B, Taylor A. NEM and filipin increase albumin transport in lung microvessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H34-H41.
- (197) Frossard JL, Saluja AK, Mach N et al. In vivo evidence for the role of GM-CSF as a mediator in acute pancreatitis-associated lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;283:L541-L548.
- (198) Xu N, Rahman A, Minshall RD, Tiruppathi C, Malik AB. beta(2)-Integrin blockade driven by E-selectin promoter prevents neutrophil sequestration and lung injury in mice. *Circ Res*. 2000;87:254-260.

- (199) Kyriakides C, Austen W, Jr., Wang Y et al. Membrane attack complex of complement and neutrophils mediate the injury of acid aspiration. *J Appl Physiol.* 1999;87:2357-2361.
- (200) Yoshida K, Nakayama K, Ohtsuka M et al. MexAB-OprM specific efflux pump inhibitors in *Pseudomonas aeruginosa*. Part 7: highly soluble and in vivo active quaternary ammonium analogue D13-9001, a potential preclinical candidate. *Bioorg Med Chem.* 2007;15:7087-7097.
- (201) Stavri M, Piddock LJ, Gibbons S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:1247-1260.
- (202) Adonizio A, Kong KF, Mathee K. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plant extracts. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:198-203.
- (203) Mahamoud A, Chevalier J, Ibert-Franco S, Kern WV, Pages JM. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59:1223-1229.
- (204) Tsubery H, Ofek I, Cohen S, Fridkin M. Structure activity relationship study of polymyxin B nonapeptide. *Adv Exp Med Biol.* 2000;479:219-222.

RESUME

Les systèmes d'efflux, chez les bactéries, rejettent un large éventail de substrats du milieu intracellulaire vers le milieu extérieur, dont les antibiotiques. Chez *Pseudomonas aeruginosa*, MexAB-OprM entre en synergie avec les autres mécanismes de résistance naturels ou acquis. Ces effets sont bien caractérisés *in vitro*, mais leur impact *in vivo* est moins clair. Comment doit-on interpréter sur l'antibiogramme l'expression de l'efflux sur les antibiotiques concernés : restent-ils efficaces dans les infections sévères ? Sur la virulence, MexAB-OprM interfère en rejetant vers l'extérieur les homosérine-lactones, auto-activateurs transcriptionnels impliqués dans la régulation du quorum-sensing, et diminuerait l'expression des facteurs de virulence. Cet effet a été montré jusqu'ici essentiellement *in vitro*, sur des souches de laboratoire. Qu'en est-il en pratique clinique : les souches concernées sont-elles réellement moins virulentes ? Cette thèse a eu pour buts d'éclaircir ces interrogations. Dans une première partie, nous avons observé l'impact de MexAB-OprM sur plusieurs β -lactamines anti-*Pseudomonas* dans un modèle d'endocardite expérimentale chez le lapin, en simulant la pharmacocinétique humaine de ces molécules. Dans la deuxième partie, nous avons étudié la relation entre MexAB-OprM et la virulence, à la fois *in vitro* par l'étude d'un certain nombre de déterminants de la virulence et des auto-inducteurs impliqués dans le quorum-sensing, et *in vivo* dans différents modèles murins d'agression bactérienne pulmonaire.

ABSTRACT

Bacterial efflux systems extrude antibiotics, amongst a wide range of substances from the intracellular middle toward the outside. In *Pseudomonas aeruginosa*, MexAB-oprM acts synergistically with other natural or acquired mechanisms of resistance. Efflux is well characterized *in vitro*, but its *in vivo* effects are less clear. In particular, how must they be interpreted on the antibiogram : are the implicated antibiotics still efficient in severe infections ? MexAB-oprM interferes with virulence by extruding the homoserine lactones, *i.e.* the transcriptional autoactivators that regulate quorum-sensing, and then might decrease expression of bacterial virulence determinants. This was shown essentially *in vitro* on laboratory strains. But in clinical practice, are the concerned strains really less virulent ? In this work, we tried to bring a few elements of answers to these questions. In a first part, we studied the impact of MexAB-OprM on antipseudomonal β -lactams, in an experimental model of rabbit endocarditis, using a simulation of human pharmacokinetics. In a second part, we studied the supposed relationship between MexAB-OprM and the expression of virulence, *in vitro* by assessing several virulence factors and quorum-sensing autoinducers, and *in vivo* in different murine models of pulmonary aggression.