UNIVERSITÉ
FRANÇOIS - RABELAIS
TOURS

INRA

UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS TOURS

École Doctorale: Santé, Sciences, Technologies

Année universitaire: 2007-2008

THESE POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE TOURS

Discipline: Sciences de la Vie

Spécialité: Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement
par:

Yousef Abouzeed

Le 19 Mars 2008

Étude du rôle des opérons *mar*, *sox*, *ram* dans la multirésistance aux antibiotiques chez *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium

Directeur de thèse: Dr. Axel Cloeckaert

JURY:

Mr Alain Goudeau	Professeur des Universités, Université François Rabelais, Tours, France
Mr Guillaume Arlet	Professeur des Universités, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 6 France
Mr Stefan Schwarz	Professeur, Institut für Tierzucht, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Neustadt, Germany
Mme Corinne Arpin	Maître de conférence, HDR Université Victor Segalen Bordeaux2, Bordeaux, France
Mr Axel Cloeckaert	Directeur de Recherche, Institut National de la Recherche Agronomique, Tours, France

UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS TOURS

École Doctorale: Santé, Sciences, Technologies

Année universitaire: 2007-2008

THESE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE TOURS

Discipline: Sciences de la Vie

Spécialité: Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement par:

Yousef Abouzeed

Le 19 Mars 2008

Étude du rôle des opérons *mar*, *sox*, *ram* dans la multirésistance aux antibiotiques chez *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium

Directeur de thèse: Dr. Axel Cloeckaert

JURY:

Mr Alain Goudeau	Professeur des Universités, Université François Rabelais, Tours, France
Mr Guillaume Arlet	Professeur des Universités, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 6 France
Mr Stefan Schwarz	Professeur, Institut für Tierzucht, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Neustadt, Germany
Mme Corinne Arpin	Maître de conférence, HDR Université Victor Segalen Bordeaux2, Bordeaux, France
Mr Axel Cloeckaert	Directeur de Recherche, Institut National de la Recherche Agronomique, Tours, France

REMERCIEMENTS

Les travaux de cette thèse ont été réalisés au sein de l'équipe Plasticité Génomique Biodiversité Antibiorésistance de l'unité de recherche 1282, Infectiologie Animale et Santé Publique du centre INRA de Tours- Nouzilly, sous la direction de Monsieur Axel Cloeckaert.

Je remercie tout d'abord Monsieur Axel Cloeckaert, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, ainsi que pour l'encadrement et suivi de mes recherches.

Je souhaite maintenant remercier toutes les personnes qui ont contribué, dune manière ou d'une autre, à la réalisation de ce travail de thèse.

Je remercie Messieurs Alain Goudeau et Stefan Schwarz pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse, ainsi que Monsieur Guillaume Arlet et Madame Corinne Arpin pour avoir accepté d'en être les rapporteurs.

Je tiens à remercier toute les membres de l'équipe Plasticité Génomique Biodiversité Antibiorésistance et plus particulièrement Sylvie Baucheron, Benoît Doublet et Christian Mouline pour leur aide technique et pour leur gentillesse.

Je tiens également à remercier Madame Elisabeth Chaslus-Dancla, ex-responsable de notre équipe pour son accueil et sa gentillesse.

Un grand merci à ma femme, Rania pour sa patience et ses encouragements tout au long de ce travail, et à mes enfants Rafid et Mohamed pour toutes les joies et le bonheur qu'ils m'apportent.

RESUME

Les salmonelles non-typhoïdes sont responsables de la majorité des toxi-infections alimentaires collectives en Europe. Elles sont le plus souvent dues à la consommation de produits alimentaires d'origine animale. L'antibiothérapie est réservée aux patients fragilisés (enfants, personnes âgées ou immunodéprimés). Les fluoroquinolones sont les molécules de choix dans les cas d'infection causés par des souches résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques. C'est particulièrement le cas des souches du sérovar Typhimurium de lysotypes DT104 et DT204 multirésistantes. L'émergence de souches résistantes aux fluoroquinolones pose un problème thérapeutique majeur en médecine humaine et vétérinaire. Les principaux mécanismes mis en œuvre pour résister aux antibiotiques sont l'expulsion de l'antibiotique hors de la cellule par efflux actif et la modification des enzymes cibles des fluoroquinolones (la gyrase et la topoisomérase IV). Le système d'efflux AcrAB-TolC est un mécanisme essentiel dans la multirésistance aux antibiotiques chez *E. coli*. Les gènes *acrAB* font effectivement partie d'un ensemble de gènes régulés par les opérons *mar*, *sox* et *rob*. La surexpression de ce système entraîne une augmentation importante du niveau de résistance à plusieurs familles d'antibiotiques. Ceci se produit suite à l'apparition de mutations dans les régulateurs globaux *mar* et *sox*, ainsi que dans le régulateur local *acrR* de ce système. Par homologie avec ce qui se passe chez *E. coli*, les opérons *mar* et *sox* pourraient contrôler l'expression de la pompe AcrAB-TolC chez *S.* Typhimurium DT104.

Nous avons pu mettre en évidence que l'inactivation de *marRA*, ou *soxRS* n'a aucun effet dans le phénotype de résistance de *S.* Typhimurium DT104, suggérant que ces régions ne participent pas dans l'acquisition d'un phénotype de résistance, ou encore dans la régulation du système AcrAB-TolC. Dans cette optique, notre hypothèse était qu'il existait un régulateur potentiel autre que *mar* et *sox* de la pompe AcrAB et impliqué dans la multirésistance aux antibiotiques chez *S.* Typhimurium DT104 et DT204.

Chez *S.* Typhimurium, la surexpression du gène *ramA* a été relié à la multirésistance aux antibiotiques via l'activation de la pompe AcrAB. Dans cette étude, ce gène a été inactivé pour mieux comprendre son rôle dans la multirésistance, et nous avons mis en évidence que l'inactivation de *ramA* entraîne une diminution d'un facteur 4 du niveau de résistance à divers antibiotiques. Dans ce travail de thèse nous avons identifiés pour la première fois un nouveau gène que nous avons dénommé *ramR*. Ce gène est situé immédiatement en amont de *ramA* sur le chromosome de *S.* Typhimurium LT2. Il code une protéine régulatrice RamR de 193 acides aminés, une protéine homologue faisant partie de la famille TetR. L'inactivation de *ramR* entraîne une augmentation d'un facteur 4 ou plus du niveau de résistance à divers antibiotiques chez une souche sensible de *S.* Typhimurium DT104. Des expériences de RT-PCR ont montré que l'inactivation de *ramR* conduit à une augmentation d'un facteur 4 du niveau d'expression de *ramA* suggérant que RamR agit comme répresseur du gène *ramA*.

Des mutations ou des éléments IS*1* ont été identifiés dans le gène *ramR* chez des souches de *S.* Typhimurium DT104 et DT204 hautement résistantes aux fluoroquinolones. Ces mutants surexpriment la pompe AcrAB. Des expériences de complémentation avec le gène *ramR* sauvage ont montré que ces mutations sont responsables de la résistance aux antibiotiques via la surexpression de *acrAB*

L'analyse par Western blot révèle une augmentation de la production de la protéine AcrA (d'un facteur 4 à 6) chez touts les mutants *ramR*. En effet, cette augmentation du niveau d'expression de AcrA corrèle bien avec la surexpression du gène *ramA*, suggérant que RamA agit comme activateur de la pompe AcrAB-TolC et étant partiellement responsable du phénotype de la multirésistance. En conclusion, la surexpression du système d'efflux AcrAB semble être due essentiellement à des mutations dans le gène régulateur *ramR* qui induisent, par dé-répression, la surexpression de *ramA*, laquelle va activer l'expression de *acrAB*.

SOMMAIRE

INTRODUCTION 5

ETUDE BIBLOGHAPHIQUE 7

1. **Salmonelles et salmonelloses** 7
   1.1. Salmonelles 7
   1.2. Les salmonelloses 8
      1.2.1. Salmonelloses humaines 8
      1.2.2. Salmonelloses animales 9
   1.3. Sources de contamination des aliments humains 9
   1.4. Importance de salmonelles non typhoïde en santé publique 10
   1.5. Les moyens de lutte 10
2. **Les antibiotiques** 11
   2.1. Familles d'antibiotiques et leurs modes d'action 12
      2.1.1. La paroi: Inhibition de la synthèse du peptidoglycane 12
      2.1.2. La membrane plasmique: Formation de pore par les antibiotiques 12
      2.1.3. Le ribosome: Inhibition de la synthèse protéique 13
      2.1.4. L'ARN polymérase: Inhibition de la transcription 13
      2.1.5. Inhibition de la synthèse de l'acide folique 13
      2.1.6. L'ADN gyrase et la topoisomérase IV: inhibition des réaction de modification de la l'ADN 14
   2.2. Les quinolones 14
3. **Les résistances aux antibiotiques** 18
   3.1. Mécanismes spécifiques de résistance aux antibiotiques 18
      3.1.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique 18
      3.1.2. La modification ou le remplacement de la cible 19
      3.1.3. Efflux spécifiques 19
   3.2. Mécanismes non spécifiques de résistance aux antibiotiques 19
      3.2.1. Perméabilité de la membrane externe 20
   3.3. Mécanisme de résistance aux antibiotiques par efflux actif 22
   3.4. Classification des transporteurs 22
      3.4.1. Transporteurs ABC (ATP-binding cassette) 23
      3.4.2. Transporteur de la famille MFS (Major Facilitor Superfamily MFS) 24
      3.4.3. Transporteurs de la famille MATE (Multidrug And Toxic Extrusion) 24
      3.4.4. Transporteurs de la famille SMR (Small Multidrug Resistance) 24
      3.4.5. Transporteurs de la famille RND (Resistance Nodulation Division) 25
   3.5. Système AcrAB-TolC d'*E. coli* 25
      3.5.1. La protéine de la membrane externe TolC 27
      3.5.2. Le transporteur AcrB 28
      3.5.3. La protéine de fusion membranaire AcrA 30
   3.6. Rôle physiologique des systèmes d'efflux 31
4. **Régulation des systèmes d'efflux** 32
   4.1. Régulateurs globaux 33
      4.1.1. Famille AraC 33
   4.2. Régulateurs locaux 37
      4.2.1. Les répresseurs 38
   4.3. Systèmes à deux composants 43
   4.4. Quorum sensing 43

5. **Régulation du système d'efflux AcrAB-TolC chez *E. coli*** 43
6. **Rôle des éléments transposables** 48
6.1. L'IS*1* et IS*10*, deux exemples d'éléments transposables 48
6.1.1. L'élément IS*1* 48
6.1.2. L'élément IS*10* 49
7. **Resistance aux antibiotiques chez *Salmonella*** 50
7.1. Émergence de *S.* Typhimurium multirésistantes 50
8. **Régulation du systeme d'efflux AcrAB-TolC chez *S.* Typhimurium** 52

ETUDE EXPERIMENTALE **54**

1. **Objectifs du Travail** 54
2. **Matériel et méthodes** 56
2.1. Matériel biologique 56
2.1.1. Souches bactériennes 56
2.1.2. Plasmides et bactériophages 58
2.1.3. Conditions de culture 58
2.2. Méthodes de bactériologie 59
2.2.1. Sensibilité aux antibiotiques 59
2.3. Méthodes de biologie moléculaire 61
2.3.1. Extraction et purification des ADN génomiques et plasmidiques 61
2.3.2. Inactivation d'un gène par délétion 61
2.3.3. Transduction d'une mutation 64
2.4. Détection de mutations ou d'IS insères en amont de *ramA* 66
2.4.1. Séquençage de l'opéron *ramRA* 67
2.5. Expériences de complémentation 68
2.5.1. Clonage du gène *ramR* sauvage 68
2.6. Technique de RT-PCR 69
2.7. Estimation du niveau de l'expression de la protéine AcrA par « Western blot » (immuno-empreinte) 71

RÉSULTATS **73**

1. **Étude des opérons *mar* et *sox*** 73
1.1. Rôle dans la resistance intrinsèque aux antibiotiques 73
2. **Étude de l'opéron *ramRA*** 74
2.1. Identification du répresseur (RamR) du gène *ramA* 74
2.2. Rôle dans la resistance intrinsèque aux antibiotiques 74
2.3. Identification de mutations dans *ramR* et la région intergénique (*ramRA*) 75
2.4. Identification d'éléments IS*1* dans le gène *ramR* 79

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES **83**

1. **Rôle des opérons mar et sox dans la multirésistance aux antibiotiques chez *S.* Typhimurium** 84
2. **Identification d'un nouveau gène *ramR* chez *S.* Typhimurium** 84
3. **Implication de l'opéron *ramRA* dans la multirésistance aux antibiotiques** 87

CONCLUSION **89**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **90**

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Salmonelles 5
Figure 2. Cibles des principales familles d'antibiotiques..... 11
Figure 3. Structure chimiques de quinolone et fluoroquinolone 15
Figure 4. Enveloppe *d'Escherichia coli.* 20
Figure 5. Organisation des systèmes d'efflux 23
Figure 6. Modèle propose pour la pompe AcrAB–TolC 26
Figure 7. Structure de la protéine TolC. 27
Figure 8. Diagramme de la topologie du monomére TolC..... 28
Figure 9. La motif H-T-H 32
Figure 10. Les protéines Rob et MarA. 35
Figure 11. Fixation des MarA, SoxS et Rob 36
Figure 12. Alignement d'acides aminées séquence de RamA, SoxS et MarA..... 36
Figure 13. Structure du complexe TetR-TetO. 39
Figure 14. Modèle de régulation de l'expression de la pompe TetA. 40
Figure 15. Modèle de régulation de l'expression de la pompe QacA de S. aureus..... 41
Figure 16. Organisation des α-hélices et des feuillets β du répresseur MarR.. 42
Figure 17. Régulation de la pompe AcrAB-TolC chez *E.coli*..... 45
Figure 18. Mutations retrouvées dans l'opéron *mar* et dans le gène *acR* 47
Figure 19. Inactivation d'un gène par délétion..... 62
Figure 20. Représentation schématique de l'opéron *ramRA* 67
Figure 21. Représentation schématique du clonage de *ramR* 69
Figure 22. La région intergénique *ramRA* 75
Figure 23. Mutation identifiée dans la région intergénique *ramRA*.. 76
Figure 24. Mutations identifiées dans le gène *ramR* 77
Figure 25. Transcription des gènes *ramA* et *gyrB* mesurée par RT-PCR.....78
Figure 26. PCRs réalisées pour détecter la présence des modifications en amont de gène *ramR* et dans la région intergénique *ramRA*.. 80
Figure 27. Le gène *ramR* chez les souches 902SA92 et 102SA00 portant une IS*1*..... 81
Figure 28. Alignement de acides aminées séquences de TetR et RamR..... 81

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Principales familles et molécules d'antibiotiques et leur mode d'action 17
Tableau 2 : Les souches de terrain et de mutants de *Salmonella* 56
Tableau 3 : Caractéristiques des souches de terrain et mutants de *Salmonella* 57
Tableau 4 : Amorces utilisés pour la production de mutants 65
Tableau 5: Amorces utilisées pour le séquençage la région *ramRA*, du clonage du *ramR* et des expériences de RT-PCR 68
Tableau 6 : Sensibilité aux antibiotiques des mutants *marA*, *marR*, *soxR*, *soxS* 73
Tableau 7 : Niveaux de résistance aux antibiotiques des souches complémentées avec *ramR* 82

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Depuis de nombreuses années, les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) représentent un souci permanant dans les pays industrialisés et un véritable danger pour la santé publique, principalement celles dues aux salmonelles non-typhoïdes. Ces bactéries sont le plus souvent d'origine animale et causent des pertes importantes en élevage. Nous avons assisté, successivement, à une augmentation de l'incidence des infections humaines à *Salmonella* causées par des sérovars non typhiques, notamment par les sérovar Typhimurium (*S.* Typhimurium) et Enteritidis (*S.* Enteritidis), entre les années 1940 et 1990, puis à une diminution de cette incidence depuis la fin des années 1990 (83, 190). En Europe, 200 000 cas d'infections humaines à *Salmonella* étaient signalés en 1998 (190). Aux Etats-Unis, les salmonelles non typhoïdales atteignent de façon pathologique 1,4 million de personnes par an et sont maintenant la deuxième cause, après *Campylobacter*, des maladies bactériennes d'origine alimentaire (150, 201, 249).



Figure 1. Salmonelles (*S.* Typhimurium) en rouge sur une culture de cellules humaines (Wikipédia).

L'infection à salmonelle non typhique disparaît généralement sans traitement chez des adultes de condition physique normale. L'antibiothérapie est donc réservée, aux patients présentant des risques de salmonellose invasive dont l'évolution peut être fatale. La résistance aux quinolones chez *Salmonella* est un problème en médecine humaine puisque c'est le traitement de choix dans les cas d'infection causés par des souches résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques dont les β-lactamines, les aminosides, les phénicolés, les sulfamides, le triméthoprime et les tétracyclines (17, 241). C'est particulièrement le cas des souches du

sérovar Typhimurium de lysotype DT104 pentarésistantes qui se sont répandues de façon épidémique au niveau mondial dans les années 1990, et qui présentent maintenant, en plus, une diminution de sensibilité aux fluoroquinolones (186, 241). La résistance aux fluoroquinolones reste encore rare chez *S.* Typhimurium (141).

L'émergence de la résistance aux fluoroquinolones chez *Salmonella* pose également un problème en médecine vétérinaire puisque certaines molécules appartenant à cette famille sont utilisées pour le traitement de nombreuses pathologies en élevage. Les animaux constituant le principal réservoir de ce genre bactérien, des souches de salmonelles d'origine vétérinaire et résistantes aux antibiotiques peuvent être transmises à l'homme, principalement par la chaîne alimentaire.

La résistance aux fluoroquinolones chez *Salmonella* a été attribuée aux modifications de l'ADN gyrase et la topoisomérase IV, deux enzymes impliquées dans le surenroulement de l'ADN bactérien et indispensables à la réplication et à la transcription. La diminution de la concentration intracellulaire des antibiotiques est mise en cause dans la multirésistance, elle peut être due à une diminution de la perméabilité membranaire, mais surtout à l'efflux actif en ce qui concerne les quinolones. Ainsi, les transporteurs multidrogues posent un sérieux problème en antibiothérapie puisqu'ils confèrent simultanément la résistance à divers antibiotiques couramment employés (200). Des études récentes montrent que la pompe AcrAB-TolC joue un rôle prédominant dans la résistance aux quinolones et la diminution de la sensibilité aux fluoroquinolones chez *S.* Typhimurium DT104 (20, 22). En effet cette pompe est soumise à de multiples niveaux de régulation. Chez *E. coli* l'opéron *acrAB* est régulé localement par AcrR, une protéine possédant un domaine hélice-tout-hélice de liaison à l'ADN caractéristique de la famille des répresseurs transcriptionnels TetR (145). La fine régulation de l'expression de AcrAB est assurée par des régulateurs globaux comme MarA, SoxS, Rob ou encore SdiA (202, 204, 208). Les loci *acrAB* et *tolC* font effectivement partie d'un ensemble de gènes régulés par les opérons *mar*, *sox* et *rob*(176, 204, 255). Par homologie avec ce qui se passe chez *E. coli,* les opérons *mar* et *sox* pourraient contrôler l'expression de la pompe AcrAB-TolC chez *S.* Typhimurium DT104. Nous nous sommes donc intéressés dans cette étude de rechercher le rôle des gènes *marRA*, *soxRS* et *ramA* dans la multirésistance aux antibiotiques chez *S.* Typhimurium.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ETUDE BIBLOGHAPHIQUE

1. Salmonelles et salmonelloses

1.1. Salmonelles

Les salmonelles sont des bactéries potentiellement pathogènes pour l'homme et les animaux. Elles proviennent généralement d'excréta humains ou animaux, malades ou porteurs sains qui les hébergent dans leur système digestif. Ce phénomène de portage est inquiétant car il augmente la dissémination des bactéries et leur transmission aux autres hôtes. En conséquence les salmonelles peuvent être retrouvées dans l'eau et diverses denrées alimentaires.

Le genre *Salmonella* appartient à la famille des *Enterobacteriacae* qui sont des bacilles Gram-négatif anaérobies facultatif et mobiles (à l'exception de *S.* Gallinarum et *S.* Pullorum). Elles sont classiquement caractérisées en fonction de leur profile antigénique et de leur propriétés biochimiques et également de leur sensibilité aux bactériophages. La taxonomie des salmonelles a été longtemps un sujet de controverses. Néanmoins, selon Le Minor et Popff le genre *Salmonella* comporte uniquement deux espèces: *Salmonella enterica* et *Salmonella bongori* (33, 132). L'espèce *Salmonella bongori* est adaptée aux animaux à sang froid. L'espèce *Salmonella enterica* comprend six sous-espèces "*Salmonella enterica* subsp *arizonae*", "*Salmonella enterica* subsp *diarizonae*", "*Salmonella enterica* subsp *enterica*", "*Salmonella enterica* subsp *houtenae*", "*Salmonella enterica* subsp *indica*" *Salmonella enterica* subsp *salamae*". Chacune des sous-espèces est subdivisée en sérovars sur la base de leur profile antigénique somatique (O), fallgellaire (H) et (Vi). Il existe ainsi plus de 2500 sérovars identifiés. Parmi les 2500 sérovars identifiés, seuls les 1500 sérovars de *Salmonella enterica* subsp *enterica* portent un nom (par exemple Typhimurium, Typhi, Paratyphi A, Enteritidis, Choleraesuis.....etc) (196). Ainsi, la sous-espèce la plus importante et la plus fréquemment rencontrée dans les isolats en médicine humaine et vétérinaire est *Salmonella enterica* subsp *enterica*. Enfin, les sérovars sont également divisés en lysotypes en fonction de leur sensibilité aux bactériophages qui définit différents lysotypes à l'interieur de chaque sérovar par exemple le sérovar *S.* Typhimurium comprend de nombreux lysotypes (DT 104, DT 204, DT 108 .....etc) (33).

1.2. Les salmonelloses

Les salmonelloses sont des maladies infectieuses et contagieuses atteignant l'homme et de nombreuses espèces animales. Les infections salmonelliques se manifestent principalement par des entérites, des septicémies et des avortements, chacune d'elles pouvant se présenter seule ou associée, ceci dépendant à la fois du sérovar et de l'hôte infecté (246).

1.2.1. Salmonelloses humaines

Chez l'homme, les salmonelloses comprennent deux principaux types d'infections: les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes et les gastro-entérites. Les fièvres typhoïdes et paratyphoïdes sont provoquées par les sérovars uniquement humains Typhi et Paratyphi A et B qui sont la cause de fièvres entériques et constituent un problème majeur de santé dans les pays en voie de développement (99). Ces salmonelles sont dites majeures pour la gravité de la maladie qu'elles provoquent et dans ce cas le traitement antibiotique est requis.

Les gastro-entérites sont provoquées par les salmonelles dites mineures et représentées par les sérovars ubiquistes majeurs, *S.* Typhimurium et *S.* Enteritidis (213, 237). En effet l'évolution de la gastro-entérite est en général bénigne et s'estompe en quelques jours sans traitement antibiotique. Cependant, les gastro-entérites peuvent être très dangereuses pour les jeunes enfants, les femme enceintes les personnes âgées ou immunodéprimées, car les salmonelles peuvent franchir la barrière intestinal et provoquer un syndrome septicémique de type typhoïdique (37).

D'après le rapport du centre national de référence des salmonelles (CNRSS) près de 13000 isolements de salmonella ont été effectués en France sur l'année 2000 (29). Les sérovars Typhimurium et Enteritidis sont les plus souvent responsables de gastro-entérites chez l'homme et impliquées dans les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). Pour cela, nous nous intéresserons plus particulièrement dans cette étude au sérovar *S.* Typhimurium.

1.2.2. Salmonelloses animales

Le pouvoir pathogène de *Salmonella* chez les animaux dépend du sérovar et de la souche bactérienne et de l'age, l'espèce animale infectée. Les animaux peuvent être infectés par différents sérovars de *Salmonella*. Plusieurs espèces animales à sang chaud comme les porcs, les bovins, les volailles sont parmi les hôtes les plus convoités par *S.* Typhimurium, et *S.* Enteritidis (75). Chez les bovins, elles peuvent engendres des pathologies digestives, d'avortement voire des septicémies. Des épidémies à *S.* Typhimurium peuvent entraîner des mortalités de 40% en l'absence de traitement (151). Par contre, chez les volailles la majorité des infections se terminent par un portage sain. Alors que, *S.* Choleraesuis est un pathogène adapté au porc provoquant la paratyphoïde porcine avec des manifestations cliniques d'entérocolites et de septicémie. Quelquefois il peut provoquer la maladie chez l'homme et autres espèces animales (40).

1.3. Sources de contamination des aliments humains

Les salmonelloses humaines sont principalement dues à l'ingestion de produits contaminés: les viandes les œufs crus ou peu cuits (60) ou encore une transmission à partir de l'eau. La transmission d'homme à homme est rare dans les pays développés mais se produit parfois, notamment dans les services de soins néonatals et les résidences pour personnes âgées. La contamination directe de l'animal à l'homme concerne les adultes qui travaillent régulièrement au contact avec le bétail. La consommation simultanée par plusieurs personnes d'un aliment massivement contaminé peut entraîner un tableau de gastro-entérites, qui simulant un véritable empoisonnement est appelé toxi-infection alimentaire collective (TIAC) (83). La filière avicole est la plus souvent incriminée. Les œufs et produits à base d'œufs ont été responsable de 64% à salmonelles sur les années 1999 et 2000 et plus particulièrement de 35,5% des TIAC à *S.* Typhimurium (83). Bien souvent, les niveaux de contamination par salmonelles dans les produits alimentaires sont faible mais ce sont les conditions de stockage a température ambiante et de rupture de la chaîne du froid qui permettent la multiplication des bactéries.

1.4. Importance de salmonelles non typhoïde en santé publique

Dans les pays industrialisés, *Salmonella* représente la principale cause de TIAC. En Europe, les cas de salmonelloses ont augmenté de 1985 jusqu'aux années1990 avec deux pics, un en 1992 (244) et l'autre en 1997 (231). Entre les années 1993 et 1998, l'espèce *Salmonella* représentait 67,5% des cas d'intoxications alimentaires dont un tiers étaient dues à Enteritidis (19,5%) (244). De 1998 à 2003 les cas de salmonelloses humaine ont diminué en Europe (63) notamment pour les sérovars Enteritidis, Typhimurium, Virchow et Hadar (28).

En France, en 2001, les sérovars Enteritidis et Typhimurium représentaient encore 64% des cas de foyers de TIAC (84). A cette période trois décès dûs à *Salmonella* ont été recensés dont deux survenus en maison de retraite (à cause de *S.* Enteritidis) et un dans le cadre d'une épidémie communautaire due à *S.* Newport qui a été à l'origine d'au moins six foyers de TIAC dans plusieurs départements du Sud-Est de la France. C'est en restauration familiale que l'on trouve le plus de sources d'infection à *Salmonella* avec 58% des cas contre 20% en restauration collective et 31% en restauration commerciale (84). Le sérovar Virchow continue sa décroissance amorcée depuis 1996, il est aujourd'hui dépassé par le sérovar Hadar lequel une diminution a toutefois été observée depuis 1999 et depuis 2002 par le sérovar Infantis. Hadar représente actuellement le 3^{éme} sérovar isolé chez l'homme en France.

1.5. Les moyens de lutte

Les bactéries appartenant à ce genre ne sont pas de bons compétiteurs à l'intérieur de l'hôte. Cependant, elles peuvent résister bien dans les milieux extérieures et survivent pendant de longues périodes dans l'environnement (126). Le principal moyen de lutte contre l'infection à salmonelles est donc le traitement préventif, reposant une bonne hygiène générale. Les salmonelles sont en effet sensibles à de nombreux désinfectants. Cependant, une fois déclarées les infections gastro-intestinales à *Salmonella* peuvent être traitées par des antibiotiques appartenant à la famille des fluoroquinolones, comme la ciprofloxacine apparue dans les années 1980 (15, 96). Beaucoup d'antibiotiques utilisées chez les humains sont également utilisées en élevage, et l'antibiothérapie est largement utilisée pour combattre les infections à *Salmonella* chez l'animal. Ainsi les fluoroquinolones sont également utilisées en médicine vétérinaire, avec la précaution de ne pas utiliser les mêmes molécules que celle

administrées chez l'homme (228). En effet cela est supposé empêcher l'émergence dans le monde animal de souches résistantes aux antibiotiques utilisés chez l'homme.

2. Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules de bas poids moléculaire produites par le métabolisme secondaire de certains micro-organismes, bactéries ou champignons, comme *Streptomyces*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, etc. Les antibiotiques sont capables de détruire les bactéries, un effet bactéricide ou inhibant la croissance bactérienne, un effet bactériostatique (250). Les antibiotiques efficaces contre de nombreuses bactéries à Gram positif et négatif sont dits à "large spectre" tandis que ceux qui sont actif uniquement contre certaines bactéries à Gram positif ou bien à Gram négatif sont dits à "spectre étroit" (250). Certains antibiotiques naturellement produits par des micro-organismes, ont été modifiés par synthèse chimique ou hémisynthèses permettant ainsi leur spectre d'activité. Les agents antibactériens obtenus par synthèse totale sont également assimilés à des antibiotiques. Cependant, le terme antibiotique est désormais utilisé pour désigner tout composé non toxique pour l'hôte et possédant une activité antibactérienne (250).

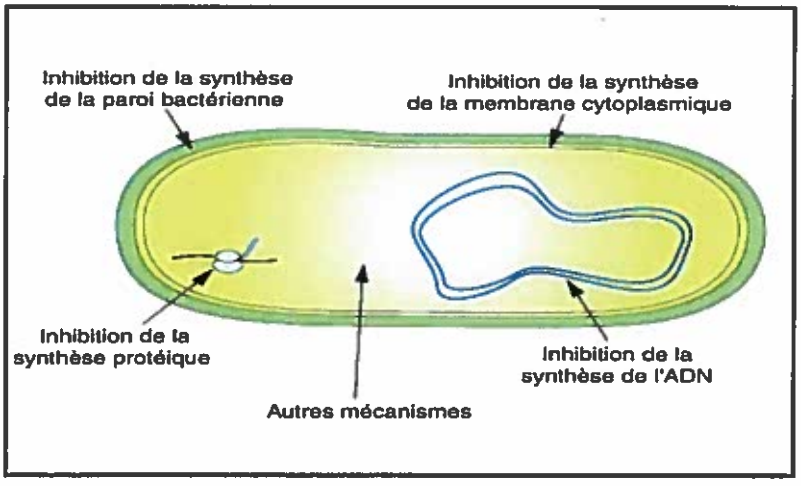


Figure 2. Cibles des principales familles d'antibiotiques.

D'après (http://www.123bio.net/cours/antiobio/modedaction.html)

2.1. Familles d'antibiotiques et leurs modes d'action

Les antibiotiques agissent à différents niveaux dans la cellule bactérienne. La figure 2 illustre les cibles principales des antibiotiques que sont la synthèse de la paroi, l'intégrité de la membrane plasmique, la synthèse protéique, la synthèse des acides nucléiques ou encore certaines enzymes impliquées dans le métabolisme. Les antibiotiques sont principalement classés en différentes familles selon leur origine, leur nature chimique, leur différent mode d'action et enfin leur spectre d'action.

2.1.1. La paroi: Inhibition de la synthèse du peptidoglycane

La cellule bactérienne possède à l'extérieur de sa membrane cytoplasmique un polymère réticulé, le peptidoglycane, formé de longues chaînes osidiques linéaires pontées par de courtes chaînes peptidiques. Cette structure, totalement absente chez l'eucaryote, participe au maintient de la forme de la cellule bactérienne et protége la membrane cytoplasmique des variations de la pression osmotique. La synthèse du peptidoglycane est un processus complexe dont plusieurs étapes constituent des cibles pour des antibiotiques. Les ß-lactamines et les glycopeptides sont les plus importantes familles d'antibiotiques qui inhibent la synthèses du peptidoglycane, cependant les antibiotiques comme la cyclosérine, la bacitracine et la fosfomycine peuvent intervenir également à ce niveau (78, 250) (Tableau 1).

2.1.2. La membrane plasmique: Formation de pore par les antibiotiques

Les antibiotiques ayant pour cible la membrane interne des bactéries sont regroupés sous le terme général de peptides cationiques. La plupart de ces agents interagissent avec les membranes et perturbent la bicouche de phospholipides (34, 87). Ils déstabilisent la membrane externe en se liant aux groupements phosphates des phospholipides et du lipopolysaccharide (LPS) et perméabilisent la membrane externe en déplaçant les cations divalents comme le Mg et le Ca qui stabilisent les molécules de LPS entre elles (87, 265). Le principal site d'action de cette famille d'antibiotiques est la membrane interne où ils s'assemblent pour former des pores et ainsi conduire à la lyse de la cellule bactérienne. Les polymyxines sont la principale famille d'antibiotiques détruisant les membranes (Tableau 1).

2.1.3. Le ribosome: Inhibition de la synthèse protéique

L'activé sélective de cette famille est basée sur les différences structurales des ribosomes procaryotes et eucaryotes, qui concernent à la fois leur composante protéique et leur composante ribonucléique (250). Ces différences sont reflétées entre autres par les coefficients de sédimentation des sous-unités ribosomales, 50S et 30S chez les cellules procaryotes comme les bactéries et 60S et 40S chez les cellules eucaryotes. L'inhibition de la synthèse protéique a lieu à différentes étapes selon les familles d'antibiotiques. Certaines familles d'antibiotiques comme les anminosides inhibent l'initiation de la traduction en particulier la fixation de l'aminoacyl-ARNt initiateur, d'autres familles d'antibiotiques comme les tétracyclines empêchent la liaison des ARNm à ARNt, les phénicolés inhibent par fixation au site accepteur de l'ARNt, les lincosamides et les macrolides inhibent par la fixation à la sous-unité 50S et enfin l'acide fusidique inhibe la synthèse protéique par la fixation au facteur d'élongation de la traduction EF-G, empêchant la fixation de l'ARNt (250) (Tableau 1).

2.1.4. L'ARN polymérase: Inhibition de la transcription

L'ARN polymérase–ADN dépendante assure la transcription de l'ARN messager nécessaire aux synthèses des protéines. Les antibiotiques de la famille des rifamycines inhibent la transcription de l'ADN en se fixant à la sous-unité β de l'ARN polymérase bactérienne.

2.1.5. Inhibition de la synthèse de l'acide folique

Contrairement aux cellules animales, les bactéries synthétisent l'acide folique *de novo*. Or ce composé est un intermédiaire indispensable à la synthèse des nucléotides puriques et de la thymidine, ainsi qu'à d'autres réactions comme la synthèse de certains acides aminés. C'est sur cette spécifique métabolique que repose l'action de deux familles d'antibiotiques: les sulfamides et les diaminopyrimidines, dont le représentant le plus important est le triméthoprime (250). Ces deux familles d'antibiotiques sont des analogues structuraux des substrats entrant dans les réactions de synthèse des folates (250).

2.1.6. L'ADN gyrase et la topoisomérase IV: inhibition des réaction de modification de la l'ADN

L'ADN gyrase et topoisomérase IV sont des enzymes tértamériques composées respectivement de 2 sous-unités; GyrA, GyrB et ParC, ParE. Ces deux enzymes utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour catalyser des changements topologiques dans le génome bactérien (134). Elles sont capables de séparer ou d'enlacer des ADN circulaires bicaténaires en réalisant une coupure simultanée sur les deux brins d'un des deux ADN, puis en faisant passer l'autre ADN à travers cette coupure (144). La fonction essentielle de l'ADN gyrase catalyser le surenroulement négatif de l'ADN alors que la fonction de topoisomérase IV semble être associée à la decaténation l'ADN après la réplication. Les antibiotiques de la famille des quinolones sont responsables de l'inhibition de la réplication et de la transcription de l'ADN. Cette famille d'antibiotiques provoque la formation d'un complexe ternaire entre l'ADN, topoisomérase et la quinolone, bloquant ainsi la progression de la fourche de réplication (134).

2.2. Les quinolones

Les quinolones sont des molécules synthétiques qui sont très efficaces contre une grande variété de microorganismes, importants d'un point de vue clinique, aussi bien chez l'homme que chez l'animal (59). La structure de base commune à toutes les quinolones consiste en deux cycles aromatiques accolés, dont un cycle pyridine portant une fonction cétone en 4, un groupement carboxylique en 3 et un azote en 1. Le deuxième cycle peut être un hétérocycle ou un benzène (Figure 3).

Acide Nalidixique **Ciprofloxacine**

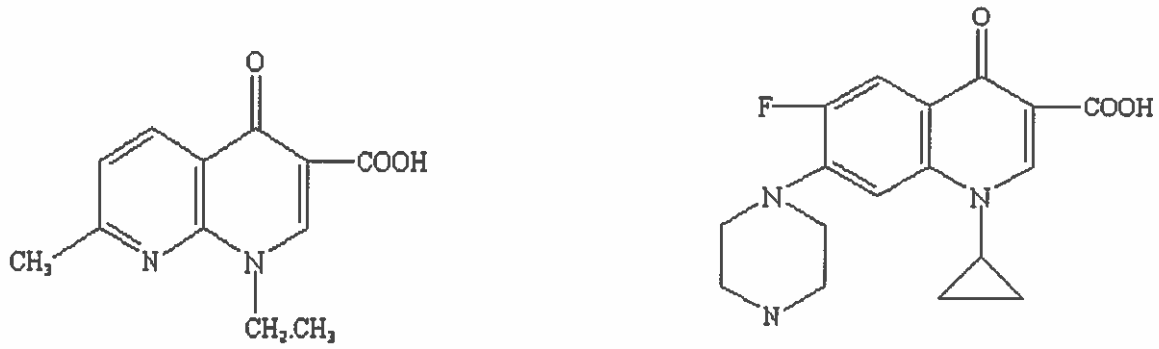


Figure 3. Structure chimiques de quinolone **(acide nalidixique)** et fluoroquinolone **(ciprofloxacine)**

Le premier représentant de la famille des quinolones est l'acide nalidixique qui a été obtenu en 1962 par synthèse chimique. Il a été autorisé pour la première fois en 1964 pour le traitement des infections du tractus urinaire apparues chez l'homme et causées par des entérobactéries. L'activité antibactérienne des quinolones de première génération comme l'acide nalidixique, l'acide pipémidique ou l'acide oxolinique est limitée aux entérobactéries et à quelques bactéries à Gram négatif telles que *Neisseria* ou *Haemophilus* (11, 71). En 1980, l'incorporation d'un atome de fluor en position 6 a donné naissance à une nouvelle génération de molécules. Ces nouvelles molécules appelées fluoroquinolones sont caractérisées par un spectre d'action plus large et une meilleure activité contre les bactéries à Gram négatif non fermentaires, comme *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ou *Acinetobacter*, ainsi que certains coques à Gram positif comme *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (18, 59, 71). D'autres modifications en positions 1, 5, 7 et 8 changent l'activité et la toxicité des fluoroquinolones et ont permis le développement d'une très grande variété de molécules.

Les fluoroquinolones sont classées en trois générations de molécules selon leur spectre d'activité. La deuxième génération de fluoroquinolones (1975-1991) incluant la norfloxacine, la ciprofloxacine et l'ofloxacine présente une excellente activité contre les bactéries à Gram négatif. La troisième génération (1992-1997), représentée par la levofloxacine, montre une amélioration de l'activité vis à vis des bactéries à Gram positif, telle que *S. aureus*. La quatrième génération (1998-2003) inclue la moxifloxacine et la gémifloxacine et présente une amélioration de l'activité et un élargissement du spectre à d'autres bactéries à Gram positif,

incluant *Streptococcus pneumoniae*, ainsi qu'à des organismes atypiques tels que *Mycoplasma pneumoniae*, ou à des bactéries anaérobies telles que *Bacteroides fragilis*. Ces nouvelles molécules jouent un rôle majeur dans le traitement des infections du tractus respiratoire (11, 18, 59, 95, 217).

Les fluoroquinolones représentent environ 11 % de la totalité des prescriptions d'antibiotiques en médecine humaine et sont les antibiotiques de choix pour le traitement d'une grande variété de maladies infectieuses (1, 17). La ciprofloxacine est de nos jours l'antibiotique le plus utilisé dans le monde (1). Les fluoroquinolones ont également été introduites en médecine vétérinaire pendant les années 1987 et 1993 (1987 aux Pays Bas, 1989 en Allemagne, 1990 en France, 1993 en Angleterre). Elles font maintenant partie des antibiotiques les plus utilisés dans tous les pays de l'Union européenne (17, 228).

Tableau 1. Principales familles et molécules d'antibiotiques et leur mode d'action

Familles d'antibiotiques	Mécanismes d'action	Principales molécules
β-lactamines	Inhibition des transpeptidases dans la synthèse du peptidoglycane.	Pénicillines, Ampicilline, Amoxicilline, Ceftiofur, Cefalexine, Cefoxitine, Cefotaxime, Ceftriaxone.
Glycopeptides	Blocage de la synthèse du peptidoglycane (se fixent au motif D-Ala_D-Ala).	Vancomycine, Téicoplanine, Avoparcine
Fosfomycine	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane (inhibe la pyruvate transférase)	Fosfomycine
Polymixines	Déstabilisation de la membrane externe par fixation aux phospholipides membranaire	Polymixine B, Colistine
Gramicidines	Inhibition de la synthèse du peptidoglycane (bloque le lipide C_{55})	Bacitracine
Aminosides	Inhibition de la synthèse protéique (inhibent l'initiation et la translocation)	Streptomycine, Spectinomycine, Kanamycine, Gentamicine, Amikacine, Nétilmicine
Phénicolés	Inhibition de l'activité peptidyl transférase par fixation à la sous-unité 50S	Chloramphénicol, Thiamphénicol, Florafénicol, Azidamfénicol
Tétracyclines	Inhibition de la synthèse protéique (empêchent la liaison ARNm/ARNt)	Tétracycline, Doxcline, Minocycline
Macrolides/Lincosamides	Inhibition de la synthèse protéique (se fixent fixation à la sous-unité 50S)	Erythromycine, Azithromycine, Clarothromycine, Lincomycine, Clindamycine
Acide fusidique	Fixation au facteur d'élongation de la transduction EF-G	Acide fusidique
Rifamycines	Inhibition de l'ARN polymérase par fixation à la sous-unité β	Rifampicine
Sulfamide/Diaminopyrimidine	Inhibition de la synthèse des folates	Sulfadiazine, Slufadiméthoxine, Triméthoprime.
Quinolones/fluoroquinolones	Blocage de la réplication d'ADN par fixation aux topoisomérases	Acide nalidixique, Acide oxolinique, Fluméquine, Ciprofloxacine, Enrofloxacine, Moxifloxacine.

3. Les résistances aux antibiotiques

Une souche bactérienne est considérée comme résistante à un antibiotique quand elle supporte une concentration d'antibiotique notablement plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (233). Les bactéries ont rapidement répondu à l'utilisation des antibiotiques en mettant en œuvre différents mécanismes pour résister à l'action de ces composés. Chaque famille d'antibiotiques est caractérisée par un spectre d'actions sur certaines bactéries et par un mode d'action qui lui est propre. Les bactéries ont en retour développé des mécanismes de résistance spécifiques à chaque famille d'antibiotiques mais également, de manière plus inquiétant, des mécanismes de résistance non spécifiques permettant de pallier à l'action de toute une série d'antibiotiques différents.

3.1. Mécanismes spécifiques de résistance aux antibiotiques

Il existe trios mécanismes majeurs impliqués dans la résistance spécifique aux antibiotiques: l'inactivation enzymatique de l'antibiotique, la protection, la modification ou le remplacement de la cible et puis l'efflux spécifique de l'antibiotique.

3.1.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

De nombreuses enzymes sont connues pour inactiver les antibiotiques par transfert de groupement acétyle, adenyle ou phosphate sur la molécule, détruisant leur activé antimicrobienne. C'est ainsi que peuvent être inactivées les molécules de chloramphénicol, les aminosides, les macrolides ou encore dans certains cas les tétracyclines. D'autres enzymes, comme les β-lactamases, hydrolases et estérases, attaquent directement les antibiotiques comme les β-lactamines ou les macrolides et les détruisent. Le substrat de ces enzymes est souvent limité à un certain nombre d'antibiotiques d'une classe donnée (228).

3.1.2. La modification ou le remplacement de la cible

La modification chimique d'une molécule ciblée par un antibiotique permet de la rendre inaccessible à cet antibiotique. La protection de certaines molécules cibles comme les ribosomes par des protéines qui inhibent la liaison à l'antibiotique a été rapportée dans la résistance à la tétracycline (49). Des modifications chimiques des ARN ribosomaux ciblés par macrolides ont également été décrites (142, 232). La surexpression de molécules ciblés, mais aussi le remplacement d'une molécule ciblés par une molécule ayant moins d'affinité pour l'antibiotique, représentent un autre moyen pour la bactérie de résister à l'action d'un antibiotique. Les molécules ciblées par le triméthoprime, les sulfamides, les β-lactamines ou les glycopeptides peuvent par exemple être remplacées de cette manière. De plus, de nombreuses mutations ont été identifiées dans les gènes codant pour les molécules cibles des antibiotiques, qui les rendent moins sensible à leur action. Cela a notamment été décrit pour les cibles des quinolones, des tétracyclines, des β-lactamines, des macrolides, de la streptomycine ou de la rifampicine (228).

3.1.3. Efflux spécifiques

Les systèmes d'efflux spécifiques exportent principalement un spectre étroit de molécules apparentées en dehors de la cellule bactérienne par un système énergie dépendant. L'exemple le plus étudié est celui des pompes spécifiques des tétracyclines. L'efflux actif des tétracyclines est réalisées par deux types de transporteurs appartenant à la famille MF (228). Ces protéines transmembranaires échangent un proton contre un complexe tétracycline cation. Le premier groupe de transporteurs qui est constitué de 12 segments transmembranaires (12TMS) est essentiellement retrouvé chez les entérobactéries, *Pseudomonas*, *Aeromonas* et *Vibrio*. Le second type de transporteurs à 14 TMS est principalement présent chez les bactéries à Gram négatif (228). Il existe également des pompes d'efflux spécifique de la famille des phénicolés, notamment du chloramphénicol et florfénicol (31).

3.2. Mécanismes non spécifiques de résistance aux antibiotiques

Il existe deux principaux mécanismes par lesquels les bactéries résistent non spécifiquement à l'action des antibiotiques: la modification de la perméabilité de la membrane

externe des bactéries à Gram négatif et le mécanisme d'efflux actif par des pompes dites "multidrogues".

3.2.1. Perméabilité de la membrane externe

Deux composants principaux déterminent la perméabilité de la membrane externe des bactéries à Gram négatif: le lipopolysaccharide (LPS) et les porines (Figure 4).

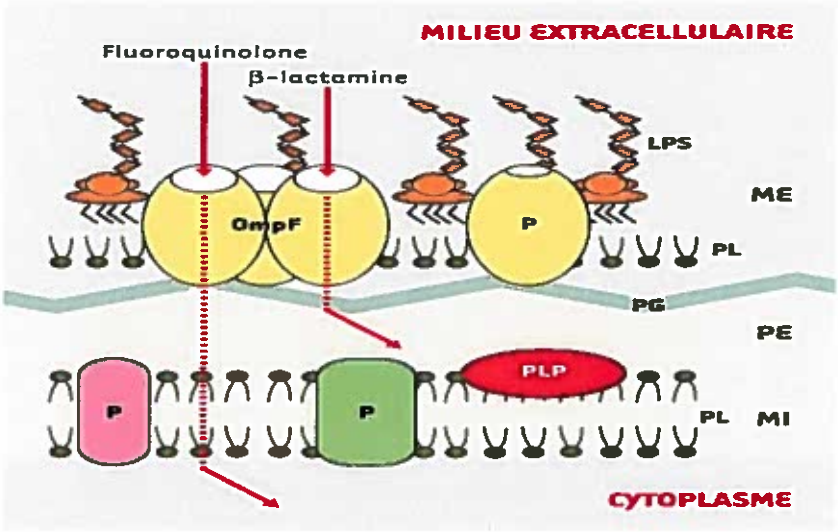


Figure 4. Enveloppe *d'Escherichia coli*. L'enveloppe des bactéries à Gram négatif comprend deux membranes: la membrane interne (MI) et la membrane externe (ME) séparées par le périplasme (PE). La membrane interne est un double feuillet phospholipidique contenant diverses protéines (transporteurs, enzymes...).La membrane externe est une bicouche asymétrique constituée du lipopolysaccharide (LPS) et de phospholipides (PL) où s'insèrent de nombreuses protéines. Cette représentation simplifie la barrière que constitue la membrane externe pour les molécules hydrophiles (ici, β-lactamine ou fluoroquinolone) qui utilisent la porine OmpF (OmpF). P: protéines; PG: peptidoglycane; PLP:protéine de liaison aux pénicillines. D'après (184).

3.2.1.1. Le lipopolysaccharide

La membrane externe des bactéries à Gram négatif forme une bicouche lipidique asymétrique constituée d'une monocouche interne phospholipidique et d'une monocouche externe glycolipidique. Les molécules de sucres bordant la structure externe de cette bicouche forment ce qu'on appelle le LPS. Le LPS est typiquement composé du lipide A inséré dans la membrane, du core oligosaccharidique et de l'antigène O, constitué d'un enchaînement de polysaccharides faisant face au milieu extérieur. Cette surface polyanionique

formée par les sucres du LPS est partiellement neutralisée par des cations divalents comme Mg^{2+} ou Ca^{2+} qui stabilisent les molécules du LPS. La capacité de certaines molécules, dont des antibiotiques, de chélater ces ions est déterminante pour leur pénétration à travers la membrane externe (86, 168, 184). Des modifications dans le lipide A du LPS et des défauts de phosphorylation dans les core du LPS ont été associés à une hypersensibilité aux antibiotiques (194).

3.2.1.2. Les porines

Les porines sont des protéines qui forment des canaux permettant la diffusion à travers la membrane externe de petites molécules hydrophiles (Figure 4). Chez les entérobactéries, les porines majeures sont OmpC, OmpF et PhoE (166). La protéine OmpD est une autre protéine majeure retrouvée chez *S.* Typhimurium (215). Ces molécules fonctionnent sous forme de trimère et constituent les principales porines non spécifiques utilisées par les entérobactéries comme *E. coli* et *S.* Typhimurium (86, 166). Ils permettent la diffusion des molécules polaires de poids moléculaire inférieur à 600 Da.

Le mode de pénétration des antibiotiques à travers la membrane externe dépend de leur poids moléculaire, mais aussi de leur hydrophobicité et de leur charge. Les composés hydrophiles diffusent rapidement au travers de la membrane par la voie des porines. Au contraire, la membrane externe constitue une barrière d'exclusion très efficace contre les antibiotiques hydrophobes (86). Des modifications dans le lipide A du LPS et des défauts de phosphorylation dans les core du LPS ont été associés à une hypersensibilité aux antibiotiques hydrophobes chez plusieurs bactéries à Gram négatif (194). Le LPS contribue donc à la sensibilité des bactéries vis-à-vis des antibiotiques hydrophobes et donc à leur résistance intrinsèque mais peu de modifications dans le LPS associés à une résistance aux antibiotiques ont été décrite (194).

Des mutations affectant l'expression des porines ont été décrites comme pouvant intervenir dans la résistance à certaines antibiotiques (184). Il a été montré chez plusieurs bactéries que la baisse d'expression des porines fait intervenir l'opéron *mar* qui peut affecter l'expression de l'ARN messager de la porine par le biais d'un petit ARN antisens, *micF* conjointement à l'expression des pompes d'efflux (4, 53) (Figure p 37). Certaines substances comme la tétracycline, le chloramphénicol ou encore l'acide salicylique peuvent induire

l'expression de *micF* (4). Les gènes *soxS*, *marA* et *ramA* sont aussi impliquées dans la diminution de l'expression des porines en repose à une modification chimique de l'environnement de la bactérie (41, 184).

3.3. Mécanisme de résistance aux antibiotiques par efflux actif

En dépit de sa faible perméabilité, la membrane externe des bactéries à Gram négatif ne peut que ralentir la pénétration des antibiotiques. L'efflux actif intervient de façon à maintenir à un niveau sub-inhibiteur les concentrations intracellulaires des antibiotiques. La résistance intrinsèque générale des bactéries à Gram négatif est déterminée par la présence de pompes à large spectre de substrats, dites "multidrogues". Toutes les bactéries, sensibles comme résistantes aux antibiotiques présentent des pompes à efflux. L'acquisition d'une résistance aux antibiotiques par un mutant d'efflux, peut se traduire de deux manières: une augmentation de l'expression de la pompe ou une modification de sa séquence permettant un meilleur transport des antibiotiques (189).

La résistance aux antibiotiques par efflux a été rapportée pour la première fois à la fin des années 1970 pour les tétracyclines. Depuis, la résistance par efflux à un grand nombre d'antibiotiques a été décrite chez de nombreuses espèces bactériennes et une panoplie de pompes ont été identifiées. De plus, la mise à disposition d'un grand nombre de séquences de génomes bactériens a permis par la suite d'apprécier la grande distribution des gènes codant pour telles pompes (136). Les bactéries dont les systèmes d'efflux ont été les plus étudies sont *E. coli* et *P. aeruginosa* (136).

3.4. Classification des transporteurs

Les systèmes d'efflux dérivent d'une famille plus large de transporteurs impliqués dans capture de nutriments ou d'ions, dans l'excrétion de produits du métabolisme ou de substances délétères pour la bactérie ou encore de substance permettant la communication entre la cellule et l'environnement (211). Les transporteurs bactériens impliqués dans l'efflux se regroupent en cinq familles de transporteurs, établies sur la base de la taille ou de la similarité des structures. Parmi celle-ci, il y'a deux très grandes et anciennes familles connues comme la superfamille adénosine triphosphate (ATP)-binding cassette (ABC) et la

superfamille major facilitor (MFS). Les trois autres sont: la famille multidrug and toxic compound extrusion (MATE), la famille small multidrug resistance (SMR) et la famille resistance-nodulation division (RND) (136, 188, 200) (Figure 5).

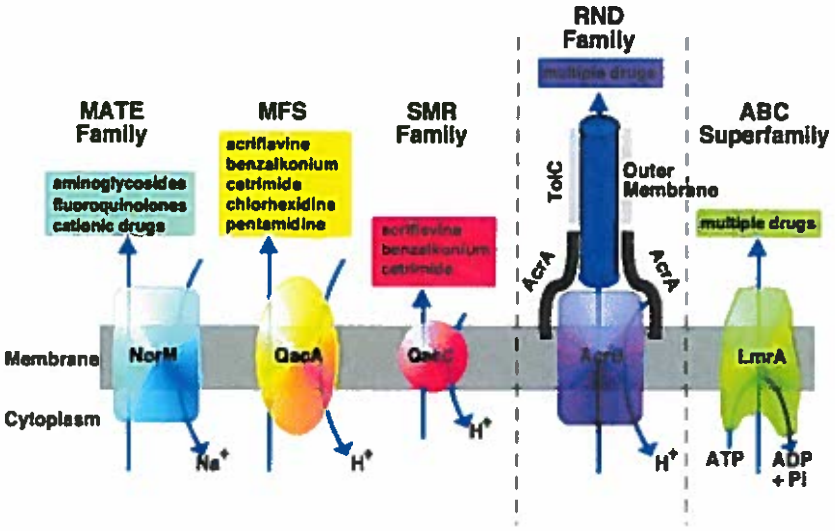


Figure 5. Organisation des systèmes d'efflux appartenant aux cinq familles différents chez les bactéries à gram négatif. D'après (189).

3.4.1. Transporteurs ABC (ATP-binding cassette)

Les transporteurs ABC appartiennent à une des plus larges superfamilles des protéines. Ils utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter des nombreuses substances incluant les sucres, les acides aminés, les ions, les drogues pharmaceutiques, les complexes ferreux, les polysaccharides et les protéines (93, 113). Un transporteur ABC consiste en une protéine membranaire comprenant typiquement six segments transmembranaires (TMS) en hélices α et une sous-unité liant l'ATP, localisée du côté cytoplasmique de la membrane. Les deux protéines peuvent être associées de façon non covalente ou liées de façon covalente en une seule chaîne polypeptidique, et le système complet est généralement un dimère contenant douze TMS. Les systèmes d'efflux de type ABC ne sont pas très courants chez les bactéries. Néanmoins ils ont été décrits à la fois chez des bactéries à Gram négatif comme la pompe d'efflux spécifique MacAB d'*E .coli* (119) et

la pompe VcaM de *Vibrio cholerae* (98) et à Gram positif comme la pompe multi drogue LmrA de *Lactococcus lactis* (192) et EfrAB chez *Enterococcus faecalis* (133). Il a été mis en évidence que la pompe MacAB de *Salmonella* était impliquée dans la virulence et était sous contrôle du système à deux composants PhoP/PhoQ (170).

3.4.2. Transporteurs de la famille MFS (Major Facilitor Superfamily)

Ces transporteurs utilisent la force proton motrice et comprennent des systèmes impliqués dans le transport par antiport ou symport des sucres, des métabolites, des anions et des drogues. (Figure 5) (136, 200). Les transporteurs de la famille MFS comportent douze ou quatorze TMS. Ils fonctionnent généralement comme de simples pompes d'efflux, comme par exemple NorA de *Staphylococcus aureus* ou la pompe FloR chez *S.* Typhimurium (31, 136, 187). Cependant, des associations avec des composants périplasmiques et la protéine de membrane externe ont été décrites chez des bactéries à Gram négatif comme par exemple la pompe EmrB avec EmrA périplasmique et TolC chez *E. coli*. Ces transporteurs comportent 12 ou 14 TMS et peuvent transporter des antibiotiques spécifiques comme la pompe FloR, TetG, ou être multidrogues (136).

3.4.3. Transporteurs de la famille MATE (Multidrug And Toxic Extrusion)

La topologie des transporteurs de cette famille est identique à celle de la famille MFS mais n'a été trouvée que chez les bactéries à Gram négatif (136, 200). Ces transporteurs confèrent la résistance aux colorants cationiques, aux aminosides et aux fluoroquinolones en utilisant souvent un gradient Na^+ comme force motrice. Cette famille comprend NorM de *Vibrio parahaemolyticus* et YdhE d'*E. coli* (136, 200).

3.4.4. Transporteurs de la famille SMR (Small Multidrug Resistance)

Les transporteurs SMR fonctionnent avec la force proto-motrice (Figure 5) (136, 200). Ils contiennent seulement environ 110 résidus d'acides aminés, comprennent quatre TMS, et fonctionnent possiblement en homo-oligomères. Les exemples bien caractérisés de cette famille comprennent la protéine Smr de *S. aureus* et la protéine EmrE d'*E. coli*. Bien que ce soit des pompes multidrogues, leur gamme de substrats est limitée aux cations lipophiles, incluant les antiseptiques et les désinfectants (136, 200).

3.4.5. Transporteurs de la famille RND (Resistance Nodulation Division)

La famille RND est constituée de sept sous-familles, (1) les métaux lourds (HME), (2) hydrophobe/amphiphile efflux-1 (HAE1) à Gram négatif, (3) « la nodulation factor exporter » (NFE), (4) « the SecDF protein-secretion accessory protein » (SecDF), (5) the hydrophobe/amphiphile efflux-2(HAE2) à Gram positif, (6) the eukaryotic sterol homeostasis (ESH) et (7) the hydrophobe/amphiphile efflux-3 (HAE3)(245). Ils utilisent le plus souvent un antiport drogue/proton (Figure 5). Les pompes de type RND jouent un rôle majeur dans la résistance intrinsèque et la résistance acquise des bactéries à Gram négatif pour une variété d'antimicrobiens cliniquement relevant, mais elles existent aussi chez les eucaryotes (136, 200). Généralement, le transporteur forme un complexe avec deux protéines: une protéine périplasmique (MFP:membrane fusion protein) et une protéine de la membrane externe (OMP: outer membrane protein) et fonctionne comme une pompe à composants multiples qui permet de traverser les membranes interne et externe des bactéries à gram négatif. La topologie de ces transporteurs consiste en douze TMS avec deux grandes boucles périplasmiques entre les TMS 1 et 2 et les TMS 7 et 8. Toutes les pompes RND sont des transporteurs multidrogues et comprennent AcrB (organisé en système AcrAB-TolC) d'*E. coli* et MexB (organisé en système MexAB-OprM) de *P. aeruginosa* (136, 200).

3.5. Système AcrAB-TolC d'*E. coli*

Le system d'efflux AcrAB-TolC d'*E. coli* est un exemple de régulation complexe des systèmes d'efflux et est le mieux caractérisé à ce jour (136). Un système homologue a été décrit chez *Salmonella enterica* (169). Les trois composants AcrA, AcrB et TolC du système sont requis pour l'efflux d'un grand nombre de molécules (65, 146, 263). La terminologie « acr » a été initialement attribuée à un locus de gènes responsables de la résistance aux acridines (147), « tol » signifie tolérance à la colicine (65). Les gènes codant pour les protéines AcrA et AcrB sont organisés en un opéron *acrAB*, alors que le gene codant pour la protéine de membrane externe TolC se trouve à un autre endroit du génome.

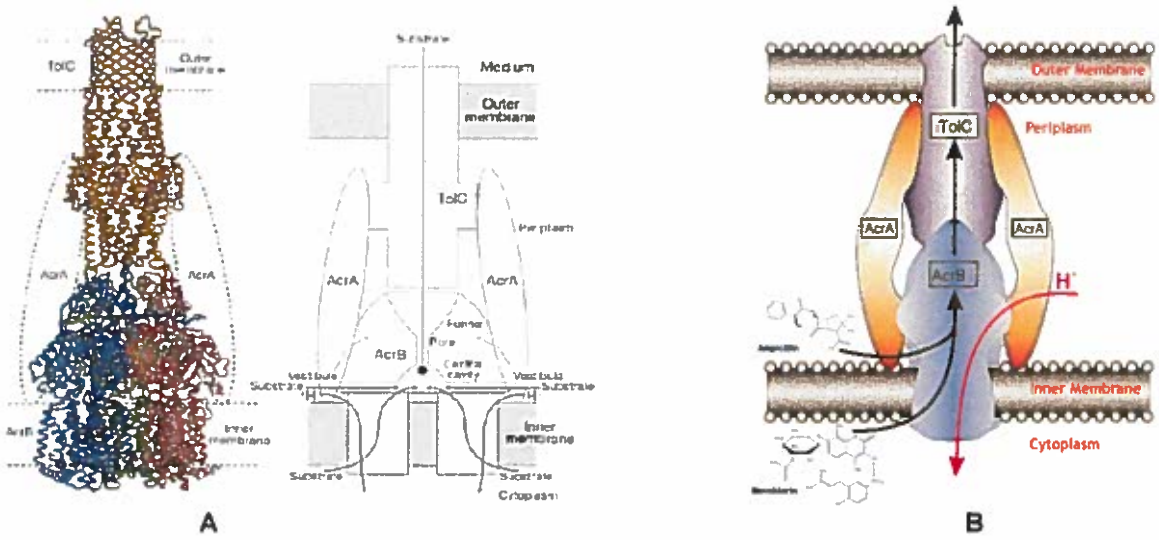


Figure 6. A/Modèle propose pour la pompe AcrAB–TolC chez les bactéries à gram-négatif. B/mécanisme d'efflux de drogues par ce système. D'après (162, 198).

TolC est recruté par plusieurs systèmes de translocases membranaires pour exporter des protéines, par exemple des toxines, l'ensemble constituant alors un système de sécrétion de type I (238), mais aussi pour exporter des molécules nocives telles que les détergents, les solvants, les métaux lourds ou les antibiotiques (121, 167, 188, 262). TolC peut être requis pour le fonctionnement d'autres systèmes d'efflux (65). AcrA coordonne l'association opérationnelle de AcrB et de TolC. Les régions C-terminales seraient importantes pour la fonction des protéines de fusion membranaire (136). Le transporteur de la membrane interne est responsable de la reconnaissance des drogues, comme il a été montré en combinant les composants de différents systèmes tripartites (136).

La compréhension du fonctionnement des systèmes d'efflux passe inévitablement par la connaissance de leur structure, par l'identification des résidus d'acides aminés essentiels à la liaison avec les drogues et par l'élucidation des changements conformationnels associés à la translocation. Jusque récemment, la prédiction à partir des structures primaires des protéines ne fournissait qu'une indication de la topologie des transporteurs plutôt que leur structure (26, 200). Malgré la difficulté d'obtention de protéine pure en quantité suffisante pour la cristallisation, certaines structures tridimentionnelles à haute résolution, dont AcrB et TolC, sont dorénavant disponibles (26).

3.5.1. La protéine de la membrane externe TolC

La structure cristallographique de TolC, déterminée à une résolution de 2,1 Å, révèle que trois monomères formés chacun de 428 résidus d'acides aminés sont assemblés en homotrimère pour former un tunnel de plus de 14 nm de long qui traverse la membrane externe et une grande partie du périplasme (121). L'extrémité distale de cette structure est ouverte vers l'extérieur et donc accessible aux solvants, alors que l'extrémité proximale se termine en pointe fermée. La topologie de chaque monomère correspond à un domaine de quatre chaînes β antiparallèles, un domaine de quatre hélices α antiparallèles et un domaine de structure mixte α/β où sont localisées les extrémités C- et N- terminales.

La structure tridimensionnelle du trimère (Figure 7A) correspond à un canal, d'une longueur de 4 nm, formé de douze chaînes β antiparallèles contiguës, enroulées à droite et enchâssées dans la membrane externe, qui se termine par trois petites boucles extracellulaires. Il se poursuit, du côté périplasmique, par un cylindre de 10 nm de long et de 3,5 nm de diamètre extérieur, constitué d'hélices α enroulées à gauche et formant douze brins antiparallèles surenroulés. Le domaine équatorial présente une structure mixte α/β. La surface interne de la cavité est apolaire de la partie distale jusqu'au domaine équatorial et devient électronégative vers l'extrémité proximale (121).



A B

Figure 7. A/ structure de la protéine TolC ; B/ modification des états fermé et ouvert de la protéine TolC. D'après (121).

L'extrémité périplasmique est scellée par l'ensemble des quatre hélices H7, H8, H3 et H4 (Figure 8) des trois protomères (7, 121, 136). Les six résidus aspartate, D371 et D374 de chaque protomère, sont neutres à pH acide et favorisent alors la fermeture (8-10). Un relâchement de la structure au niveau du domaine équatorial jusqu'à l'extrémité proximale permet aux brins en hélices α de se dérouler et ainsi d'ouvrir le tunnel (Figure 7B) (121). L'extrémité C-terminale, en aval du résidu 414, n'est pas impliquée dans le fonctionnement. La leucine 413 et surtout la leucine 412, engagées dans l'hélice H9 du domaine mixte α/β, sont impliquées dans le maintien de la conformation active (257).

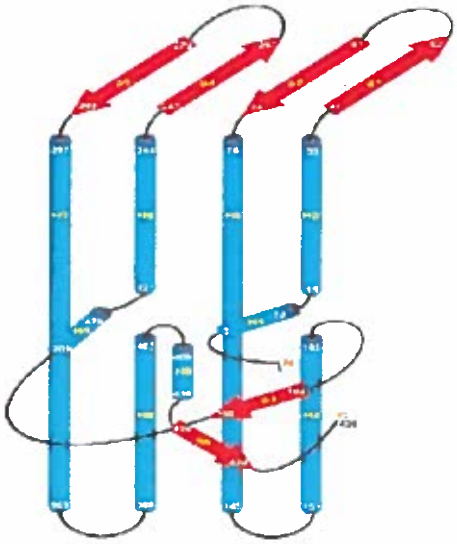


Figure 8. Diagramme de la topologie du monomère TolC. Les éléments de structure secondaire sont : hélices α (H) en bleu, feuillets β (S) en rouge. D'après (121)

3.5.2. Le transporteur AcrB

AcrB est un homotrimère qui se présente sous la forme d'une méduse (162). Chaque monomère (110 kDa) est composé de 1049 résidus d'acides aminés et présente la topologie classique des transporteurs RND. Ces transporteurs sont constitués d'une région transmembranaire formée de douze segments en hélices α et d'une tête périplasmique formée par deux grandes boucles, d'environ 300 acides aminés chacune, localisées entre les TMS 1 et 2 et les TMS 7 et 8 (67, 147, 162).

La structure cristalline de la protéine AcrB a été récemment déterminée avec une résolution de 3,5 Å (162). C'est la première structure à haute résolution d'un transporteur multidrogue élucidée (136, 163). Le domaine transmembranaire mesure environ 5 nm d'épaisseur, à ce niveau les monomères interagissent entre les TMS 1 et 8. Les TMS 4 et 10 sont localisés au centre de chaque monomère où trois résidus d'acides aminés chargés Asp407, Asp480 et Lys940 forment des pairs d'ions (162). La tête périplasmique, haute d'environ 7 nm, comprend le domaine du pore et le domaine de contact avec TolC. Le pore central est composé de trois hélices α. Chaque hélice α provient de la boucle entre les TMS 1 et 2 de chacun des trois monomères. Le pore est ouvert sur l'entonnoir formé par la partie haute, et sur la cavité centrale localisée entre la tête et la région transmembranaire. La cavité centrale est ouverte sur le périplasme via trois vestibules creusés entre les monomères et via un sillon dans le domaine transmembranaire de chaque monomère, entre les TMS 7 et 8 (162, 163).

La structure tridimensionnelle de AcrB fournit des éléments permettant de formuler des hypothèses de mécanisme moléculaire de l'efflux (163). Les vestibules, situés entre les domaines périplasmiques des protomères voisins, permettraient l'entrée des substrats, depuis le périplasme ou le côté externe de la membrane interne (Figure 6B). L'entrée des substrats serait aussi possible à travers le sillon vers la cavité centrale, à partir du cytoplasme ou du côté interne de la membrane interne (Figure 6B) (162). Ces données sont nouvelles et essentielles à la compréhension du mécanisme d'efflux, d'autant plus que jusqu'alors les hypothèses suggéraient que les transporteurs multidrogues ne captaient leurs substrats qu'à partir de la bicouche lipidique (200), mais cette nouvelle hypothèse n'a encore pas été confirmée expérimentalement (136).

La construction de chimères par échange de boucles périplasmiques entre AcrB et AcrD a révélé que la reconnaissance des substrats est déterminée par les deux boucles périplasmiques (58).

Certains acides aminés sont très conservés chez les transporteurs RND et sont requis pour le fonctionnement de la pompe (162, 212). Ce sont des résidus chargés localisés dans le domaine transmembranaire, comme par exemple Asp407-Asp408 dans TMS4 et Lys940 dans TMS10. La structure de AcrB révèle que ces trois résidus forment des paires d'ions, semblent

essentiels à la fonction d'efflux et seraient des candidats pour la translocation des protons (162).

Très récemment, ont été déterminées aux rayons X les structures cristallographiques de AcrB avec certains de ses ligands (ethydium, rhodamine 6G, dequalinium et ciprofloxacine) (260). Les molécules sont liées aux parois de la grande cavité interne formée par les trois domaines transmembranaires du trimère et elles sont localisées au niveau de la limite externe de la membrane interne. Ceci suggère que les molécules diffusent latéralement à travers les vestibules entre les monomères tant qu'elles sont associées à la couche externe de la membrane lipidique (162). Il n'y a pas de résidus anioniques d'acides aminés à proximité qui pourraient neutraliser les charges cationiques de ces substrats. Cette observation soutient l'hypothèse que les charges positives des substrats sont neutralisées par les groupements anioniques des phospholipides dans la cavité (136, 260, 261). Selon ce point de vue, les sites liant les substrats de AcrB sont des sites composites impliquant à la fois les phospholipides et les chaînes protéiques. La flexibilité et la mobilité des phospholipides sont probablement importantes dans la large gamme de substrat des pompes d'efflux de cette classe (136).

3.5.3. La protéine de fusion membranaire AcrA

AcrA est une longue protéine de fusion membranaire de 42 kDa qui comprend 397 résidus d'acides aminés incluant une séquence signal de 24 résidus d'acides aminés, et localisée dans l'espace périplasmique (16, 67, 114, 147, 262). Dans sa forme mature, la lipoprotéine AcrA est insérée dans la membrane interne, du côté externe, par son extrémité N-terminale où le résidu cystéine (Cys25) porte un groupement diacylglycérol et une chaîne d'acide palmitique (16, 114). Cette partie lipidique n'est pas impliquée dans la fonction d'efflux (57, 262). La longueur de la molécule et l'hydrophobicité des extrémités indiquent que AcrA pourrait traverser le périplasme en étant reliée de part et d'autre aux membranes externe et interne (262).

La structure cristallographique à basse résolution (20 Å) de AcrA, dépourvue de la séquence signal et de la chaîne lipidique, confirme qu'un monomère aurait une forme tubulaire d'environ 2,5 nm d'épaisseur et une très grande longueur d'environ 21 nm, mais suggère une structure tridimensionnelle en anneau. La protéine purifiée est hautement asymétrique et très flexible en solution, ses extrémités N- et C- terminales sont hydrophobes

(16, 262). La partie centrale de la séquence comprend deux domaines en hélices α, capables de se surenrouler et favorisant l'oligomérisation, flanqués de deux domaines de type β (16, 109).

Une région comprenant 67 résidus d'acides aminés, proche de l'extrémité C-terminale, interagit spécifiquement avec AcrB (57). Le pH du milieu environnant induit des changements conformationnels réversibles et un pH acide favorise l'oligomérisation. Ainsi, AcrA serait une protéine dynamique et pas un simple pont périplasmique entre AcrB et TolC (103). De plus, AcrA s'associe spécifiquement à AcrB en formant un complexe avec un ratio 2/1 ou 3/1, et indépendamment de TolC (57, 264).

Certaines prédictions avancent que la structure des protéines de fusion membranaire ressemblerait à celle de TolC. A partir de la structure des MFP homologues EmrA et AcrA, il est déduit que AcrA interagirait avec le transporteur et TolC pour induire un changement conformationnel afin que TolC ouvre son extrémité périplasmique (Figure 7B) permettant l'entrée du substrat. La structure β pourrait agir comme un domaine receveur des drogues libérées par le transporteur, pendant que le cylindre en hélices α, formé par l'assemblage d'hélices α d'un oligomère putatif de AcrA, pourrait transitoirement chevaucher l'extrémité fermée en hélices α de TolC, induisant son ouverture. Des études récentes ont montré que EmrA peut lier des substrats du transporteur EmrB, prouvant ainsi qu'une MFP peut jouer un rôle direct dans la translocation des drogues à travers le périplasme (26).

3.6. Rôle physiologique des systèmes d'efflux

L'expression des pompes d'efflux multidrogues est généralement constitutive ce qui pose la question du rôle physiologique de ces pompes. La capacité à restreindre l'entrée des composés hydrophobes à travers la membrane externe est cruciale pour les bactéries entériques qui doivent survivre dans l'intestin en présence de sels biliaires et d'autres agents hydrophobes nocifs. Les sels biliaires sont des composés amphiphiles avec une activité détergente prononcée qui causent la désagrégation de la bicouche de la membrane cellulaire (82). Chez les bactéries à Gram négatif, la protection apportée par la présence de LPS dans la membrane externe n'est que partielle et nécessite comme pour les antibiotiques la présence d'un mécanisme d'efflux. Les sels biliaires sont d'excellents substrats des pompes multidrogues (85, 139, 199). Les systèmes AcrAB-TolC chez *E coli* (208) et *S.* Typhimurium

pourraient contribuer à la résistance aux sels biliaires (21, 199) et le système AcrAB-TolC de *V. cholerae*, inductible par les sels biliaires (256). Chez *S.* Typhimurium et *S.* Enteritidis, il a été montré que la protéine de membrane externe TolC était essentielle à la colonisation du tractus intestinal en modèle murin (234) ou aviaire (21).

Ces exemples illustrent la relation entre resistance aux antibiotiques et fitness, voire virulence, de la bactérie et soulignent l'importance pour la bactérie de réguler finement l'expression des systèmes d'efflux.

4. Régulation des systeme d'efflux

La régulation des systèmes d'efflux fait intervenir des protéines capables de se lier à l'ADN. Il existe de nombreux motifs protéiques impliqués dans la liaison avec l'ADN (leucine zipper, doigt de zinc) (183) mais chez les procaryotes, la régulation des systèmes d'efflux ne fait intervenir quasiment que des protéine à motif Hélice-tour-Hélice (H-T-H) (32).

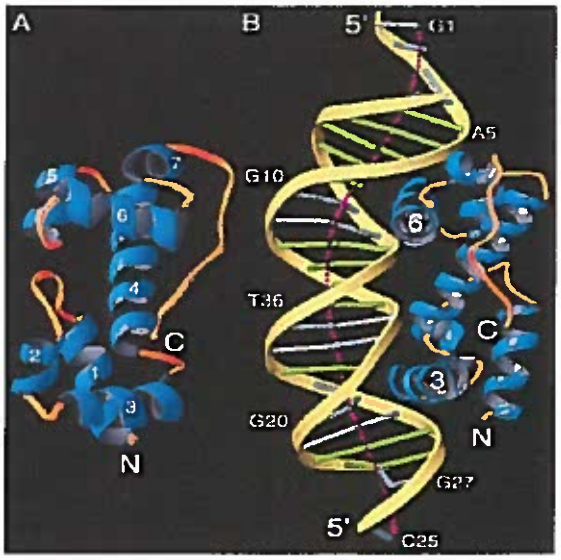


Figure 9. La motif H-T-H s'insere dans les sillons de de l'ADN. D'après (207).

Le motif H-T-H consiste en deux hélices empilées, séparées par un coude comprenant 4 résidus avec une glycine en position 2 (89). Le motif H-T-H n'est pas suffisant pour assures un repliement et une troisième hélice stabilise le motif sous forme d'un domaine globulaire. Lors de la reconnaissance de l'ADN par la protéine, la première hélice du motif se place au

dessus du sillon majeur et crée des contacts avec le squelette phosphate de l'ADN *via* sa partie N-terminale (183). La deuxième hélice du motif s'insère dans le sillon majeur de l'ADN et détermine la spécificité de reconnaissance (Figure 9) (100, 183).

Les résidus présents dans le domaine H-T-H sont essentiels pour se liée avec les bases de l'ADN au niveau du site répété inversé, établant des liaison avec les phosphates de l'ADN pour assures une géométrie correct pour la fixation à l'ADN et enfin interagir avec les autre acides amines de la protéine pour orienter les hélices de façon adéquate pour leur fixation à l'ADN (Figure 9) (236).

Pour être stable, cette interaction a besoin de liaison symétrique de deux motifs H-T-H sur l'ADN (demérisation de la protéine ou présence de deux motifs H-T-H sur la protéine). Les régulateurs présentant ces motifs reconnaissent une séquence répétée inversée (IR) de l'ADN localisée dans la région promotrice du système d'efflux (183, 203, 225).

L'expression des systèmes d'efflux multidrogues comme le système AcrAB-TolC est très contrôlée au sein de la cellule. Cependant, des mutations peuvent conduire à une surexpression ou à l'expression de systèmes non exprimés et aboutir à une résistance clinique par ce seul mécanisme ou en association avec d'autres mécanismes de résistance. Il y a trois types de régulations différents: (i) par des régulateurs globaux (ii) par des régulateurs locaux (activateurs ou répresseurs) et (iii) par des systèmes à deux composants (136).

4.1. Régulateurs globaux

Contrairement aux régulateurs locaux, les régulateurs globaux peuvent se situer n'importe où dans le génome de la bactérie. L'expression de ces régulateurs, le plus souvent des activateurs, sont fréquemment contrôlés par des répresseurs locaux (ex: MarR, et *marA*, SoxR et *soxS* chez *E. coli* et *S. enterica*) et régulent l'expression de nombreux gènes différents(5, 19, 80).

4.1.1. Famille AraC

La protéine AraC est la première à avoir été identifiée, purifiée et caractérisée biochimiquement (77, 218-221). Les protéines appartenant à cette famille sont, dans le plupart des cas, des activateurs transcriptionnels mais certaines peuvent exercer un rôle de répresseur,

voire une double fonction activateur/répresseur selon le site de fixation et/ou les effecteurs présents (69). Ces protéines sont impliquée dans la régulation de diverses fonctions dans la bactérie, comme le catabolisme des sucres, la réponse aux stress et la virulence. Les protéines impliquées dans la régulation du catabolisme des sucres comme AraC par exemple, sont actives sous forme de dimère et sont constituées d'un domaine de fixation à l'ADN en C-terminal et d'un domaine de dimérisation et de fixation des sucres en N-terminal (23, 56). Cette sous famille des régulateurs AraC active les promoteurs de classe II (le site de fixation de l'activateur empiète sur la séquence -35 du promoteur) souvent conjointement avec les protéines activateurs du catabolisme CAP (23, 56, 92, 108).

MarA, SoxS, Rob et RamA appartenant à une autre sous-famille des régulateurs AraC (intervenant dans la réponse aux stress) et sont actives sous forme de monomère (41, 61, 62, 104-106). Ces protéines peuvent ne contenir qu'un domaine de fixation à l'ADN (MarA et SoxS) ou peuvent avoir comme Rob un domaine C-terminale additionnel (13, 125).

La co-cristallisation des protéines MarA et Rob avec leur site de fixation à l'ADN a permis de mieux comprendre le mécanisme d'action de ces protéines.

La protéine MarA est constituée de 7 hélices α séparées en deux domaines structuraux similaire et d'une grande boucle C-terminale. Les deux domaines de MarA sont connectés par l α-hélice 4 et présentent chacun un motif H-T-H de fixation à l'ADN. Chaque domaine établit des liaisons non covalentes avec l'autre permettant un réarrangement particulier des motifs H-T-H et engendrant une courbure de l'ADN lors de sa fixation (207).

La structure N-terminal de la protéine Rob est similaire à celle de MarA (125, 207). Le domaine C-terminale additionnel n'est pas essentiel à l'activité transcriptionnelle de Rob, mais présente de nombreuses identités structurales avec la protéine GalT d'*E. coli*. (125). La différence entre Rob et MarA réside dans le mécanisme d'interaction avec l'ADN. A la différence de MarA, Rob n'insère que le domaine H-T-H N-terminale dans le grand sillon de l'ADN, un seul contact étant établi entre le domaine H-T-H C-terminale et l'ADN(125, 207) (Figure 10).

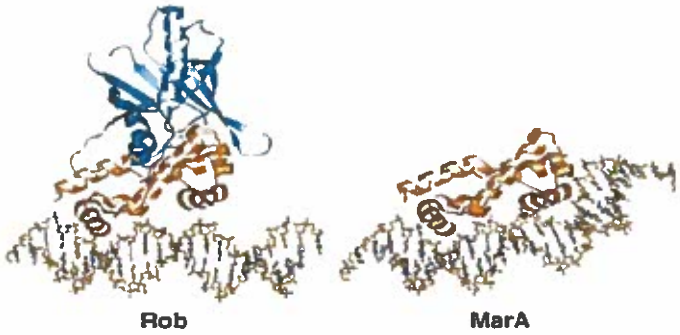


Figure 10. Les protéines Rob et MarA. Mécanisme d'interaction avec l'ADN. D'après(125)

A la différence des protéines MarA et soxS qui sont finement régulées localement et qui ne semblent pas être sujettes à une régulation directe par des ligands, Rob est exprimée de manière basale dans la cellule et son activé est augmentée en présence de sels biliaires et de dipyridyl (209). Il semblerait que la fixation d'inducteurs sur la protéine amène à un changement de conformation du domaine C-terminale et à un passage de Rob d'un état non actif vers un état actif (209). En revanche, les protéines MarA et SoxS sont rapidement dégradées par des protéases lorsque le stimulus ayant amené leur transcription disparaît (79).

Les régulateurs AraC intervenant dans la reponse aux stress (MarA, Rob, SoxS, RamA) se fixent sur des séquences répétées inversées dégénérées du promoteur. Cette séquence, appelée *mar/rob/sox*-box est située à proximité du promoteur (Figure 11).

Une étude a montrée que RamA de *S.* Typhimurium présente respectivement 37et 52% d'identité avec SoxS et MarA, et respectivement 80% et 100% d'homologie avec RamA de *K. pneumoniae* et Rma de *S.* Paratyphi B (248). Ces protéines possèdent un domaine H-T-H de liaison à l'ADN qui est très conservé (Figure 12), suggérant que ces protéines peuvent activer des promoteurs du régulon *mar sox* ou *Rob* de classe I ou de classe II (la «*mar*-box ») et règulent les mêmes gènes (41, 155).

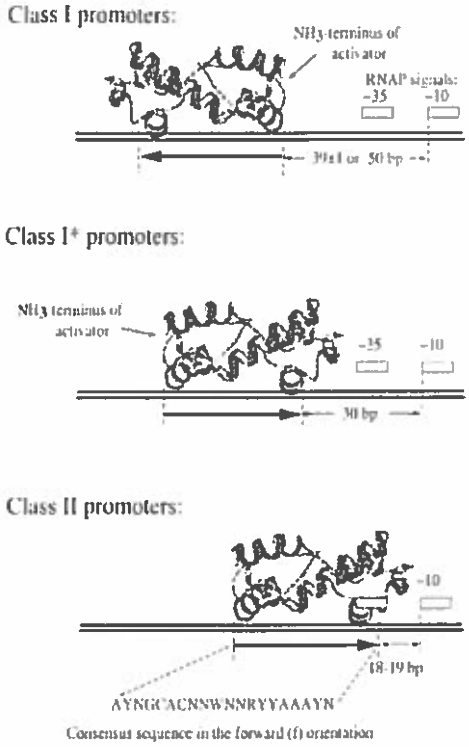


Figure 11. Fixation des MarA, SoxS et Rob sur les promoteurs du régulon mar/sox/rob. Les fléches en gras représentent l'orientation fonctionnelle du site de fixation des différents promoteurs et les fléches claire représentent la distance depuis la séquence -10 du promoteur. D'après (155)

```
RamA (S.t) MTISAQVIDTIVEWIDDNLNQPLRIDDIARHAGYSKWHLQRLFMQYKGESLGRY
SoxS         MSHQQIIQTLIEWIDEHIDQPLNIDVVAKKSGYSKWYLQRMFRTVTHQTLGEY
RamA (K.p) MTISAQVIDTIVEWIDDNLHQPLRIDDIARHAGYSKWHLQRLFLQYKGESLGRY
MarA  MTMSRRNTDAITIHSILDWIEDNLESPLSLEKVSERSGYSKWHLQRMFKKETGHSLGQY

RamA VRERKLKLAARDLLDTDQKVYDICLKYGFDSQQTFTRIFTRTFNLPPGAYRKEKHGRTHZ
SoxS IRQRRLLLAAVELRTTERPIFDIAMDLGYVSQQTFSRVFRREFDRTPSDYRHRLZ
RamA IRERKLLLAARDLRDTDQRVYDICLKYGFDSQQTFTRVFTRTFNQPPGAYRKENHSRAHZ
MarA IRSRKMTEIAQK
```

Figure 12. Alignement d'acides aminées séquence de RamA, SoxS et MarA de *S.* Typhimurium (*S. t*). RamA de K. *pneumoniae* (*k. p*). Les hélices des H-T-H sont soulignées. D'près (248).

Ces protéines peuvent indifféremment activer des promoteur de classe I (la « *mar-box* » est située en amont de la séquence -35 du promoteur) ou des promoteurs des classe II (152, 155). De plus, toute les « *mar-box* » ne sont pas orientées dans le même sens, on distingue

l'orientation «backward », dans le cas où la patrie N-terminale de la protéine est du côté du promoteur, et l'orientation «backward » lorsque la protéine est fixée en sens opposé. Une « *mar-box* » d'orientation «backward» a été décrite en amont du gène *ramA* chez *E. aerogenes* (41). Cette orientation de « *mar-box* » ainsi que l'espacement avec la séquence -35 du promoteur (séquence de reconnaissance de l'ARN polymérase (RNP)) est critique pour l'activation de la transcription (153).

L'activation de la transcription *via* les régulateurs MarA, SoxS et Rob est particulière. Une étude réalisée par Martin et *al* en 2002 a montré que les protéines MarA et SoxS étaient capables de former un complexe avec l'holoenzyme ou le core (ARN polymérase sans le facture sigma) de l'ARN polymérase en absence d'ADN et que ce complexe pouvait scanner le chromosome à la recherche d'un des promoteurs du régulons *mar* et *sox* (152). L'interaction entre MarA et l'ARN polymérase se fait grâce au domaine des sous unités α (α-CTD) de l'ARN polymérase. Un des (α-CTD) se fixe à MarA, alors que le deuxième (α-CTD) se fixe à l'ADN (50).

En plus de son rôle d'activateur transcriptionnel, MarA peut également réprimer l'expression de certains gènes comme *rob* (223), *purA* et *hdeA* (222). Ces gènes possédant une « *mar-box* backward » et promoteur de classe II pour *purA* et *hdeA* (222) une est une « *mar-box* » suitée entre les séquences -10 et -35 du promoteur pour *rob* (223). Le mécanisme de répression par MarA n'a toujours pas été élucidé, toutefois dans le cas de la répression de *rob*, il semblerait que la fixation de MarA sur le promoteur n'empêche pas la fixation de l'ARN polymérase, mais empêche la formation, par l'ARN polymérase, d'un complexe ouvert (séparation des brins d'ADN en vue du début de la transcription (223).

4.2. Régulateurs locaux

Les régulateurs locaux sont généralement situés en amont du gène qu'ils régulent et sont transcrits en général de manière divergente par rapport à l'opéron qu'ils contrôlent. Les répresseurs contrôlent ainsi leur propre régulation (81).

4.2.1. Les répresseurs

Jusqu'à présent, quatre familles différentes des répresseurs sont connues et impliquées dans la régulation des systèmes d'efflux. Les répresseurs des types TetR et MarR sont de loin les plus représentés (80, 81), mais quelques groupes ont également décrit l'implication de régulateurs de la famille LacI (195) ou PadR (101).

4.2.1.1. Famille TetR

La majorité des répresseurs de systèmes d'efflux de drogues décrits est homologue au répresseur TetR comme les répresseurs QacR, AcrR, CmeR, EthR, MexR, MtrR, SmeT (80, 203, 214).

Les répresseurs de la famille TetR se dimérisent pour être actif (80, 81, 203). Chaque monomère est constituée de deux domaines fonctionnels: Un domaine N-terminal très conservé de fixation à l'ADN (domaine H-T-H) et un domaine C terminal moins conservé de fixation des ligands qui permet de moduler l'activé des répresseurs (203, 225). L'oligomérisation du répresseur va conférer une spécificité de reconnaissance à la protéine régulatrice. En effet, c'est la combinaison d'hélices qui va permettre une discrimination au niveau d'ADNs présentant des superstructures différentes. Quatre répresseurs de cette famille ont été cristallisés en présence d'ADN, ou en présence de ligand : TetR (90, 179-182), QacR (225-227), CprB (165) et EthR (54, 66). Tous ces répresseurs présentent la même structure N terminale avec l'α-hélice 1 qui stabilise le domaine H-T-H (α-hélice 2 et 3) et l'α-hélice 4 permettant de joindre le domaine H-T-H au domaine C terminal de dimérisation et fixation des ligands. La dimérisation des répresseurs implique la formation d'une poche de 4α-hélice constituée de deux α-hélice antiparallèles provenant de chacun des monomères (ex α-8/8' et α-10/10'pour TetR et α-8/8' et α-9/9'pour QacR) (80).

La répression exercée par ces protéines sur l'opérateur, peut généralement être levée par des ligands (25, 38, 66, 181, 182, 226) comme les substrats naturels de la pompe régulée, les antibiotiques. Grâce à la cristallisation de différents répresseurs en présence ou en absence de ligand, le mécanisme d'action de ces ligands au niveau des répresseurs a été élucidé. La fixation du ligand au niveau de la poche formée lors de la dimérisation des sous-unités

entraînerait un écartement des deux hélices α 3 ce qui empêcherait les répresseur de se fixer au niveau de la région répétée inversée de l'ADN(80, 81, 203) (Figure 13).

TetR est capable de fixer une molécule de tétracycline par monomère. Une fois que la tétracycline se trouve au niveau du répresseur, de nombreuses liaisons hydrogènes s'établissent entre la drogue et les α-hélices 4, 5 et 7. La fixation de la tétracycline modifie la position de l'α-hélice 6, ce qui repousse également l'α-hélice 4 et l'oblige à effectuer une rotation qui écarte les α-hélices 3 et 3' de 3 A. Cet écartement perturbe les contacts entre les α-hélice 3 et le sillon majeur de l'ADN ce qui entraîne le décrochement du répresseur (181). La fixation du ligand, bien que localisée au niveau du domaine C-terminal de la protéine, fait intervenir une communication de type domaine–domaine. En effet, il a récemment été montré que l'affinité de la tétracycline pour une protéine TetR complète était environ 500 fois supérieures que sur une protéine TetR tronquée du domaine de fixation à l'ADN (N-terminal) (206).

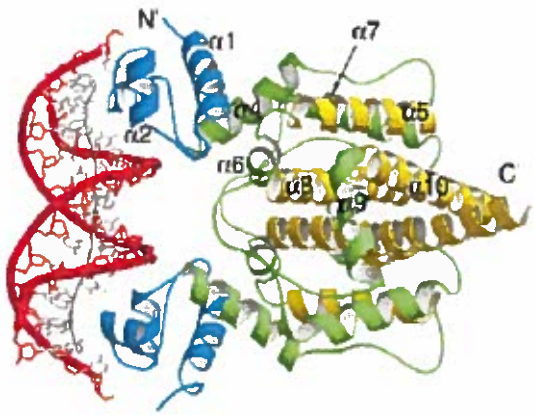


Figure 13. Structure du complexe TetR-TetO. L'ADN est représenté en rouge, les domaines de liaison à l'ADN sont représentés en bleu, les α-hélices impliquées dans les changements conformationnels sont représentés en vert, les α-hélices ayant un repliement rigide sont en jaune. D'après (181).

L'effet d'une mutation dans le gène codant un répresseur de la famille TetR est en générale modeste: un facteur 2 de diminution de la sensibilité aux antibiotiques a été décrit pour les mutations dans les gènes *acrR* chez *E. coli* (198), *cmeR* chez *Campylobacter* (138), *mtrR* chez *N. gonorrhaeae* (85) mais, il a été décrit chez *S.* Typhimurium qu'une mutation

ponctuelle dans le gene *acrR* peut conduire à la diminution de la sensibilité aux antibiotiques par un facteur 4 (178).

TetR, qui se fixe sous forme de dimère sur son opérateur, recouvre une partie du promoteur de la pompe d'efflux TetA et réprime totalement sa synthèse (203). Cette répression totale s'explique par un étroit contact entre le domaine H-T-H de TetR et l'ADN (80, 181), impliquant une très forte affinité du répresseur pour sa séquence répétée inversée (112). La séquence répétée inversée de TetR est de 15 pb avec 3pb centrale(80, 181) (Figure 14).

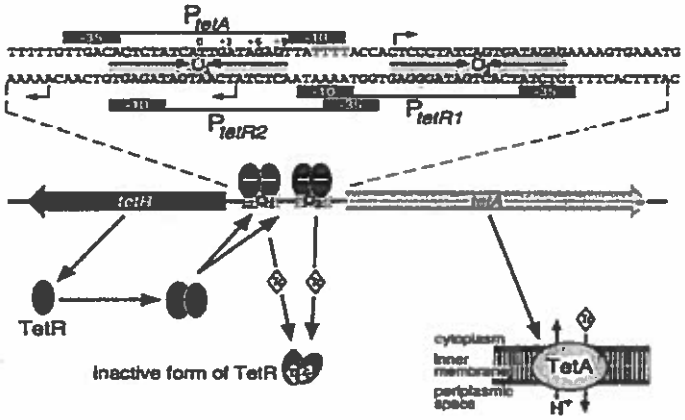


Figure 14. Modèle de régulation de l'expression de la pompe TetA. D'après (80).

D'autres répresseurs comme par exemple QacR ou EthR qui créent moins de contact avec l'ADN et ont une affinité moindre pour leur séquence répétée peuvent se fixer en paire de dimères (QacR) voir par 4 dimères (EthR). QacR se fixe à raison d'un dimère par demi site sur une séquence répétée inversée « IR » de 2 fois 15 pb sépares d'un «spacer » de 6 pb. La fixation de QacR sur IR1 empêche la transition du complexe RNA polymérase-promoteur vers un état processif actif (224) (Figure 15).

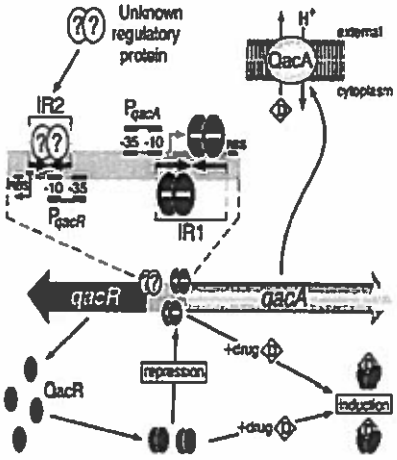


Figure 15. Modèle de régulation de l'expression de la pompe QacA de S. aureus. QacR (ellipses noires) réprime l'expression de QacA en se fixant sous forme de dimére à chaque demi-site de IR1. En présence de ligand, QacR se dissocie de IR1. D'après (80).

Lors de la reconnaissance de IR1 par QacR, le premier polypeptide du dimère 1 se fixe sur la région -1 à -8 de l'IR1 (3pb de région centrale+ 4pb IR). Ce premier monomère est appelé proximal (par rapport au centre de l'IR1) et le second monomère du dimère 1 sera appelé distal. La sous unité distale du dimère 1 se fixe des nucléotide +4 à +12 de l'IR1(226). Le 2ème dimère crée des interactions similaires au premier mais de manière opposée.

Les deux dimères de QacR se fixent de manière coopérative au niveau de l'IR1. En effet la fixation du premier dimère impose un changement de conformation de la double hélice d'ADN, ce qui a pour effet d'augmenter légèrement la largeur du grand sillon et donc de rendre l'environnement plus propice à la fixation du second dimère (226). La fixation de QacR est dépendant de la séquence de ces demi sites et de leur espacement correct (224).

4.2.1.2. Famille MarR

Le premier régulateur de ce type à avoir été mis en évidence est le répresseur MarR d'*E. coli*, qui réprime l'opéron *marRAB* et indirectement la pompe d'efflux AcrAB-TolC (3, 6, 154). Depuis, d'autres répresseurs de ce type ont été identifiés, comme par exemple MexR (195), EmrR (143) et MepR (159). Comme les répresseurs de la famille TetR, ils se dimérisent spontanément pour se fixer sur une séquence répétée inversée de l'ADN.

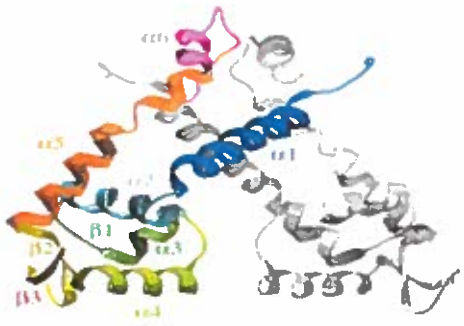


Figure 16. Organisation des α-hélices et des feuillets β du répresseur MarR. D'après (6).

Trois répresseurs de cette famille ont été cristallisés: MarR (6) et MexR (137) (impliquée dans la résistance aux antibiotiques) et OhrR (94) (réponse au stress oxydatif). Le repliement de ces trios protéines est similaire en six α-hélices et 3 feuillets β (6, 94, 137) (Figure 16).

Chaque sous-unité du dimère est divisée en deux domaines fonctionnels. Le premier domaine, de dimérisation, implique les régions N et C terminales, et plus particulièrement les hélices α1 α2 α5 α6. Ce domaine présente une surface accessible aux substrats de l'ordre de 3000 à 5000 A^2

Le deuxième domaine permet la fixation à l'ADN et consiste en un motif dérivé du motif H-T-H de base appelé «winged Helix-Turn-Helix » (w H-T-H). Ce motif, au centre de la protéine, est constitué des structures β1, α4, β2 et β3 (6, 94, 137) (Figure 16).

Comme pour les régulateurs de la famille TetR, la répression exercée par les régulateurs de type MarR est réversible. Des ligands, comme par exemple des antibiotiques ou des composés anioniques, sont capables de lever la répression en se fixant au niveau du répresseur (80). Dans le cas du répresseur MarR, la modulation de la répression pourrait passer par deux mécanismes distincts. Le premier mécanisme consiste en une fixation des ligands au niveau de la poche formée lors de la dimérisation. Le salicylate est par exemple capable de se fixer au niveau de deux sites sur chaque monomère, à proximité de l'hélice α4. (6). Le deuxième mécanisme de modulation de la répression de MarR, pourrait, suite à un stress par exemple, en une phosphorylation qui inactiverait la protéine (135, 225).

4.3. Systèmes à deux composants

Les systèmes à deux composants sont d'une partie " sensor kinase " qui détecte le signal et d'une partie « response regulator » qui transmet le signal en agissant en tant que régulateur de l'expression des gènes (91).

Plusieurs exemples ont été décrits l'implication de ces systèmes dans la régulation de l'expression de systèmes d'efflux par exemple le transporteur MFS NorA de *Staphylococcus aureus* est contrôlée par le système AlsSR (64) et le transporteur ABC AdeABC de *Acinetobacter baumanii* est contrôlée par le système AdeSR (149).

4.4. Quorum sensing

Un récepteur du signal du quorum sensing appartenant à la famille LuxR, SdiA a été décrit chez *Salmonella* et *E. coli* (2). SdiA est un protéine régulatrice des systèmes AcrAB et AcrEF chez *E. coli* (202, 254). Chez *P. aeruginosa* une des molécules signal (C4-HSL) augmente l'expression de la pompe MexAB-OprM (157, 216).

5. Régulation du système d'efflux AcrAB-TolC chez *E. coli*

Lorsque les niveaux d'expression des systèmes d'efflux constitutifs augmentent, ou lorsque des systèmes d'efflux normalement réprimés deviennent exprimés, la résistance aux antibiotiques peut atteindre des niveaux élevés (80, 136). Il a été montré que la surexpression de AcrAB peut devenir toxique chez *E. coli*, alors cette toxicité est peut-être la raison pour laquelle l'expression de nombreuses pompes est contrôlée par un mécanisme élaboré. Comme la plupart des transporteurs RND et MFS, la régulation du système AcrAB-TolC se passe au niveau transcriptionnel (136). Cette régulation a été bien étudiée chez *E.coli*, elle se produit localement au niveau de l'opéron *acrAB* et de *tolC* qui est éloigné sur le chromosome, mais elle se produit principalement au niveau global (80, 136).

Le répresseur local AcrR se lie aux promoteurs de *acrAB* ou de *acrR* et ainsi réprime la transcription de *acrAB* ou sa propre transcription. La fonction de AcrR serait de moduler l'expression de *acrAB* et préviendrait ainsi une production excessive de la pompe d'efflux AcrAB (Figure 13) (80, 136). Il a été montré que des mutations inactivant AcrR résultent en

un accroissement de l'expression de *acrAB* et une augmentation de la résistance aux fluoroquinolones, pour des souches cliniques de *E. coli* (80), mais aussi pour des mutants *in vitro* de *S.* Typhimurium (178) ou des souches cliniques de *S.* Choleraesuis (97).

Cependant, le système de régulation principal de l'opéron *acrAB* fait intervenir les quatre activateurs globaux de transcription : MarA, SoxS, Rob et SdiA (Figure 17) (80, 136, 190).

Le locus *mar* (multiple antibiotic resistance) est constitué de deux unités de transcription, *marRAB* et *marC* transcrites de façon divergente à partir d'une région promoteur/opérateur centrale *marO* (Figure 17) (80, 136, 190). La régulation par le système *mar* agit exclusivement par la régulation des niveaux de MarA, en réponse à divers agents environnementaux incluant les antibiotiques tels que les quinolones, les tétracyclines et les phénicolés. MarA active la transcription de l'opéron *acrAB* tandis que MarR contrôle le niveau d'expression de *marA* par répression, mais les fonctions de MarB et MarC restent inconnues (Figure 17). La surproduction du système d'efflux AcrAB est due essentiellement à des mutations du gène régulateur *marR* qui induisent, par dé-répression, la surproduction de MarA, laquelle va sur-activer l'expression de *acrAB* (4, 5, 80, 136, 190). Une étude chez *E. coli* a montré que MarA contrôle l'expression différentielle de plus de 60 gènes, dont l'opéron AcrAB (19).

Comme MarA, les protéines SoxS et Rob sont capables d'activer l'expression de l'opéron *marRAB* en se liant à *marO* (Figure 17). SoxS est l'effecteur du régulon *soxRS* activé en réponse à un stress oxydatif (80, 136). La surexpression de SoxS et de Rob chez *E. coli* et *S. enterica* induit une multirésistance aux antibiotiques (136). Une « *mar-box* » putative a été identifiée en amont des gènes *tolC, acrA et acrB* chez *E. coli* (Figure 17), ainsi leur niveaux d'expressions seraient augmentés avec la surproduction de MarA, SoxS ou Rob (80, 136). MarA, SoxS et Rob sont capables aussi de réprimer la synthèse de la porine OmpF en augmentant le niveau de transcription de l'ARN antisens *micF*. Ainsi la baisse de perméabilité de la membrane externe et l'augmentation de l'activité d'efflux contribuent de façon synergique, à élever le niveau de résistance (136).

Récemment, il a été démontré que l'expression de AcrAB est régulée positivement par SdiA (Figure 17), une protéine dont la régulation dépend elle-même du quorum sensing (2, 80, 136, 202).

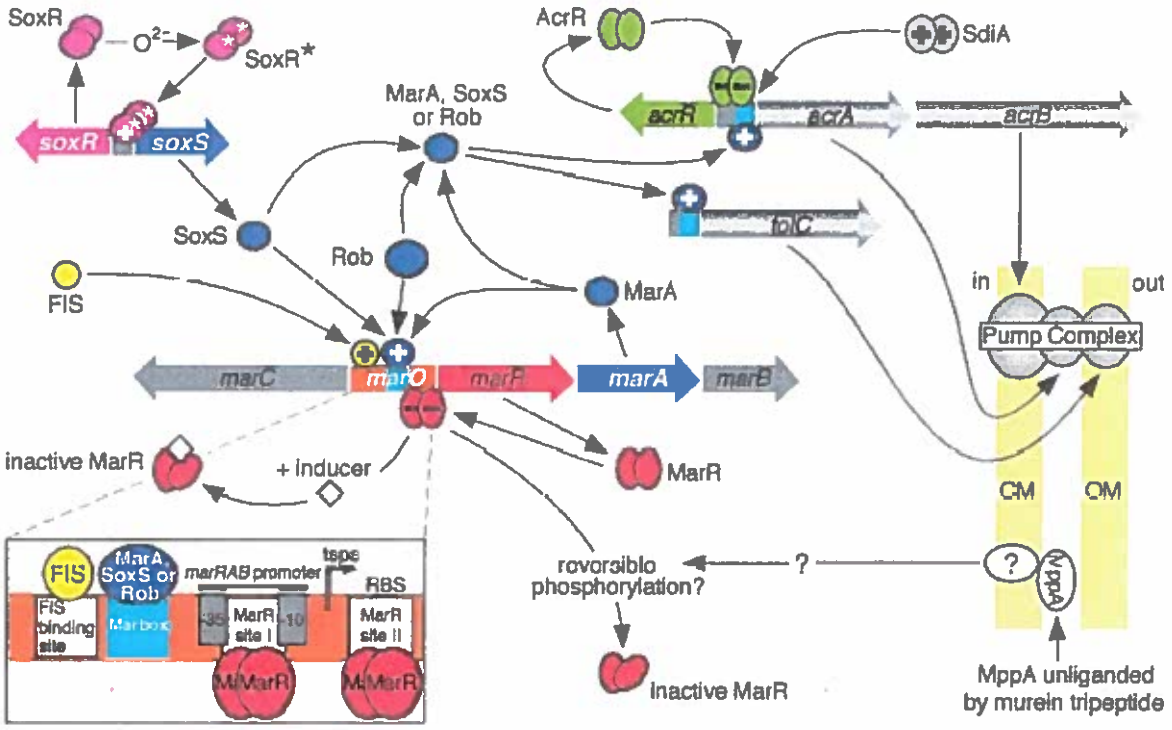


Figure 17. Régulation de la pompe AcrAB-TolC chez E.coli. Symboles : répresseur local AcrR (en vert), prévention d'expression excessive (-), régulateurs globales MarA, SoxS, Rob (en bleu foncé) et SdiA (en gris), augmentation de l'expression de AcrAB (+), région centrale marO (en orange), activateur MarA (en bleu foncé), répresseur de marA MarR (en rouge). D'après (80).

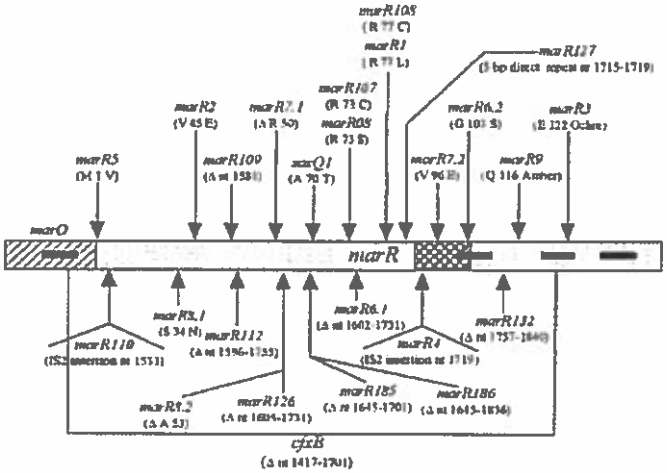
La pompe d'efflux AcrEF, homologue à AcrAB (80% d'identité entre AcrB et AcrF chez *S.* Typhimurium LT2), peut être surexprimée chez des mutants *acrAB* inactifs soumis à une pression de sélection, en présence de fluoroquinolones ou de solvants organiques, *in vitro*. Les mutants initialement sensibles deviennent multirésistants grâce à l'intégration de séquences d'insertion dans la région immédiatement en amont de *acrEF* chez *E. coli* (107, 118). Des résultats équivalents ont été obtenus chez *S.* Typhimurium (177). De plus, il a été mis en évidence une augmentation de l'expression de *acrF* et de *acrD* (ou *acrB* et *acrD*) ainsi que de *marA*, en réponse à la délétion de *acrB* (ou *acrF*) chez *S.* Typhimurium (55). AcrD

présente respectivement 64 et 65 % d'identité avec AcrB et AcrF. Ainsi AcrF et AcrD sont dé-réprimés en réponse à la délétion de AcrB mais sont réprimés en présence de AcrB fonctionnel. L'ensemble de ces données suggère qu'il existe une coordination dans la régulation de systèmes d'efflux homologues.

La résistance par efflux aux antibiotiques survient suite à l'apparition de mutations chromosomiques dans les gènes régulateurs ou la région régulatrice des systèmes d'efflux qui cause une augmentation coordonnée de l'expression des composants de la pompe. Il a par exemple été montré que des mutations donnant lieu à une augmentation de l'expression de MarA affectaient l'expression de différents gènes incluant *acrAB* et *ompF* (176, 255). L'ARNm de la porine OmpF peut en effet être déstabilisé par un petit ARN antisens, *micF*, dont l'expression dépend des régulateurs des systèmes *mar*, sox et *rob*. Il en résulte une diminution de l'expression de la porine combinée à l'augmentation des mécanismes d'efflux, ce qui permet à la cellule bactérienne d'accumuler moins d'antibiotiques (Figure 17) (4, 42, 53). De plus l'expression de *marA* et *soxS* est inductible par un grand nombre de substances incluant des antibiotiques comme le tétracycline et chloramphénicol, mais aussi d'autres agents comme le salicylate de sodium (4, 46, 154). Il a été montré que des mutants surexprimant MarA étaient tolérante à la présence de solvants organiques (14, 255) ou résistants à celle de désinfectants comme l'huile de pin (161), Enfin, la surexpression de la protéine SoxS a également été reliée, chez *E. coli* à un phénotype de resistance aux fluoroquinolones ou de tolérance aux solvants organiques (164).

Des mutations conférant une résistance aux antibiotiques, principalement par le biais de la surexpression de AcrAB-TolC, ont été décrites à diverses reprises dans les loci *marOR* (5, 14, 115, 120, 140, 146, 171, 173, 176, 253, 258) et *acrR* (107, 120, 251, 253) de *E. coli* (Figure 18 A et B). Les mutations sont très diverses et ne se limitent pas à une région particulière du gène. Toutefois, certaines mutations sont retrouvées chez plusieurs souches, par exemple comme les substitutions d'acides aminés Lys62Arg et Leu78Met de MarR et les substitutions Thr5Asn, Met201Arg, Ala212Ser, Thr213Ile, Asn214Thr, et Phe215Ala de AcrR.

A



B

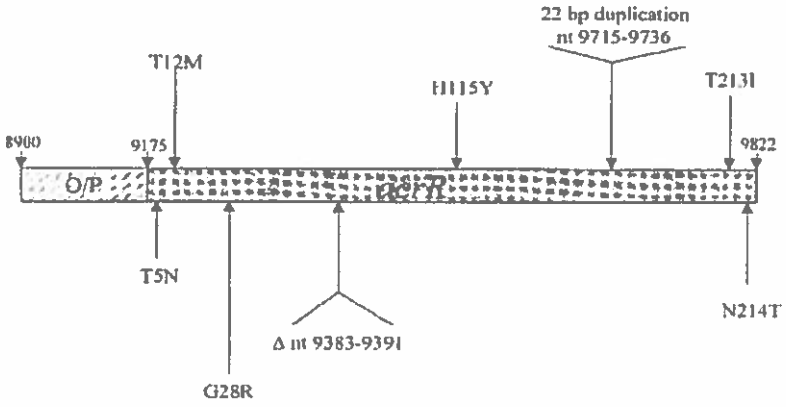


Figure 18. Mutations retrouvées dans l'opéron *mar* **(A)** et dans le gène *acR* **(B)**. D'après (5, 251).

Par ailleurs, deux études décrivent la présence de mutations dans le locus *soxRS* (164, 253). Ces mutations touchent le gène *soxR* et provoquent une surexpression de la protéine SoxS associée à un phénotype de multirésistance à divers antibiotiques (253), ou à un phénotype de tolérance aux solvants organiques (164).

6. Rôle des éléments transposables

La resistance des bactéries aux antibiotiques peut être expliquée soit par l'accumulation d'une séries de mutation dans la cellule hôte modifiant certaines voies métaboliques ou molécules cibles des antibiotiques, soit par l'acquisition d'éléments génétiques mobiles tels que des, plasmides, transposons ou intégrons disséminant de manière horizontal entre les bactéries (35, 228).

Chez les bactéries deux classes principales d'éléments transposables ont été identifiées: les transposons et les séquences d'insertion (IS) (68). Les transposons sont des éléments transposables qui contiennent un matériel génétique additionnel n'ayant aucun lien avec la transposition. Chez certains transposons, deux éléments IS complets encadrent un à plusieurs gènes bactériens fonctionnels. Les gènes de resistance aux antibiotiques sont souvent insérés dans les transposons qui se répandent rapidement parmi une population de bactéries auparavant sensible à ces antibiotiques (68). Les séquences d'insertion sont des éléments transposables ne portant aucune information génétique si ce n'est celle qui est nécessaire à la transposition. Les composants clés comprennent des séquences terminales spécifiques, ainsi que des régions codant pour une enzyme (la transposase). Ces sont éléments présents parfois en quelques copies et parfois en plusieurs centaines des copies dans le génome bactérien. L'insertion de ces éléments peut provoquer l'inactivation de gènes situes au site de l'insertion ou dans d'autres l'activation de gènes dormants situés à proximité de l'insertion. De tells insertions peuvent également provoquer des délétions, des inversions et des fusions de chromosomes, conférant aux bactéries les hébergeant une plasticité génomique plus grande (252).

6.1. L'IS*1* et IS*10*, deux exemples d'éléments transposables

6.1.1. L'élément IS*1*

L'IS*1* est une des premières IS à avoir été caractérisée. C'est l'élément le plus petit, avec 768 pb incluant deux régions répétées inversées imparfaites d'environ 23 pb localisées aux deux extrémités (IRR et IRL) et deux phases ouvertes de lecture, *insA* et *insB* , en partie superposées (110, 175). Le nombre de copies de cet élément varie considérablement d'une souche bactérienne à l'autre. Le plupart des *E. coli* K12 de laboratoire portent entre 6 et 10

copies de l'*IS1*, alors que certaines souches de *Shigella* en possèdent plus d'une cinquantaine (172, 174). L'insertion de l'*IS1* s'accompagne généralement d'une duplication de 9 pb de la séquence cible, mais des variations dans la longueur de cette région sont fréquemment observées. Cet élément montre de plus une préférence pour les sites d'ADN riches en A+T. Chaque extrémité de l'*IS1* contient un promoteur assez faible dirigé vers l'intérieur et l'un des deux, pIRL, permet la transcription des gènes *insA* et *insB* (148). Le transcrit initié à partir de ce promoteur est traduit pour donner deux protéines: InsA et InsAB, InsA est la protéine la plus abondante et se lie spécifiquement aux séquences répétées et réprime ainsi la transcription de pIRL. La protéine InsAB est la transposase. Sa production résulte d'une variation de phase de lecture au moment de la traduction entre *insA* et *insB*, à une fréquence de 1% environ. L'*IS1* possède également un site de liaison à des protéines chaperons de type histone like (IHF) à chacune des extrémités (39). Enfin, une région se comportant comme un terminateur de transcription Rho-dépendant a été identifiée à la fin du gene *insA* (39).

L'*IS1* génère des insertions simples et des co-intégrats composés de deux copies répétées de l'*IS*. Cet élément semble donc être à la fois capable de transposition conservative et réplicative (39). Des études ont également décrit la présence de copies circulaires de transposons dérivés de l'*IS1* (229). Il a été montré que de hauts niveaux d'expression de InsAB pouvaient induire une réponse SOS, reflétant peut-être ainsi l'activité de la transposase de l'*IS1* (131).

6.1.2. L'élément *IS10*

L'*IS10* est une séquence de 1329 pb incluant deux séquences répétées inversées "imparfaites" d'environ 29 pb à chaque extrémité (IRR and IRL) et une phase ouverte de lecture de 1209 pb codant une transposase (39). Son insertion s'accompagne d'une duplication de 9 pb de la séquence cible (116). La séquence de l'*IS10* possède un promoteur intérieur pour la transposase, pIN, et deux promoteurs situés aux et oriéntés vers l'extérieur, pOUT et OUTIIp (43, 156, 230). L'expression de la transposase de l'*IS10* est contrôlée à différents niveaux. Elle est régulée en *trans* par un petit ARN antisens, transcrit à partir du promoteur pOUT situé à proximité de l'IRL. Elle contient également un site de liaison à la Dam méthylase situé dans l'hexamer -10 du promoteur pIN. Ce site devient hémiméthyle de manière transitoire après la réplication du chromosome, augmentant ainsi la force du promoteur et donc le niveau d'expression de la transposase (39). L'*IS10* possède également

un site de liaison à des protéines IHF à l'intérieur de IIRL, qui influence la nature des produits de transposition. La transposition site-spécifique de l'*IS10* est non réplicative, assurant qu'une réplication passive de l'*IS10* ait lieu avant la transposition (39).

7. Resistance aux antibiotiques chez *Salmonella*

7.1. Émergence de *S.* Typhimurium multirésistantes

Des souches de *S.* Typhimurium de lysotype DT104 ont émergé à la fin des années 1980 chez des bovidés en Grande-Bretagne. Ces clones présentant une multirésistance stable à l'ampicilline, la streptomycine et la spectinomycine (S), au chloramphénicol et au florfénicol (C), aux tétracyclines (T), et aux sulfamides (Su), dite de type penta-résistant (phénotype $ACSSuT^R$) s'est répandu très rapidement (24, 45, 52, 76, 197, 240). Des épidémies similaires de ce lysotype DT104 penta-résistant ($ACSSuT^R$) ont eu lieu, à partir du début des années 1990 en Europe, puis en Amérique du nord (237, 240). Ces souches ont diffusé dans le monde entier chez diverses espèces animales et ont atteint l'homme à travers la chaîne alimentaire (240). En France par exemple, ce phénotype $ACSSuT^R$ était retrouvé chez près de 50% de la totalité des souches *S.* Typhimurium isolées en 2000 (29). En Grande-Bretagne, plus de 50% des infections chez l'homme étaient due à souches penta-résistantes en 1995. Aux Etats-Unis, ces souches représentaient près de 31% des isolats de *S.* Typhimurium en 1999, et étaient estimées comme la cause de 7% des infections à *Salmonella* (186). En Belgique, des souches de *S.* Typhimurium du variant Copenhagen DT204 multirésistantes et présentant un haut niveau de résistance aux fluoroquinolones (CMI enrofloxacine 64 $mg.l^{-1}$) sont apparues entre 1991 et 1994 (102). Ces souches ont diffusé dans d'autres pays européens (102).

Le phénotype $ACSSuT^R$ est conféré par des gènes présents dans un locus chromosomique de multirésistance de 13 kb portant les gènes bla_{PSE-1}, *floR*, *aadA2*, *sulI*, et *tet(G)*. Ces gènes confèrent respectivement la résistance à l'ampicilline, au chloramphénicol et florfénicol, à la streptomycine et à la spectinomycine, aux sulfamides et aux tétracyclines (45). Ce locus de multirésistance est situé à l'intérieure d'un îlot génomique appelé SGI1 (*Salmonella* Genomic Island 1) de 43 kb (30). La présence des gènes conférant ce phénotype $ACSSuT^R$ chez plusieurs sérovars suggère un transfert horizontal de SGI1 entre les souches de *S.* enterica (45).

En plus de la penta-résistance, un nombre d'isolats portant une résistance additionnelle au triméthoprime et occasionnellement à la ciprofloxacine a été rapportée en Angleterre depuis 1994 (239, 242). Ce phénomène a été observé dans d'autres pays européens et aux Etats-Unis et en Asie et concerne les souches humaines comme les souches animales. Ainsi sur 1168 souches de *S.* Typhimurium DT104 isolées en Angleterre en 2000, 11% avaient une résistance additionnelle au triméthoprime, 10% présentaient un faible niveau de résistance à la ciprofloxacine et 1% possédait les deux types de résistance (186, 239).

Un phénotype de multirésistance aux antibiotiques est également retrouvé chez d'autres salmonelles. En France, une multirésistance a été observée chez les souches non humaines du sérovar Hadar, ces souches sont résistantes aux céphalosporines de première génération, à l'ampicilline à l'association amoxicilline- acide clavulanique à streptomycine, à la tétracycline, aux quinolones et même aux fluoroquinolones, puisque près de 45% des ces souches montrent une sensibilité diminuée à l'enrofloxacine et 10 % sont résistantes à cet antibiotique (130). Les souches du sérovar Enteritidis restent par contre sensibles à la plupart des antibiotiques (29, 111, 130).

La multirésistance aux antibiotiques et la résistance aux quinolones chez *Salmonella* a essentiellement été attribuée à des mutations dans les gènes cibles et des mécanismes d'efflux actif. L'importance du système d'efflux AcrAB-TolC a été démontré dans la multirésistance aux antibiotiques et la résistance aux quinolones (20, 44, 74, 191). Il semble que l'implication de système d'efflux dans la multirésistance aux antibiotiques soit expliquée par la surexpression de ce système. Chez *E. coli* la surexpression du système d'efflux AcrAB est due essentiellement à des mutations du gène régulateur *marR* qui induisent, par dé-répression, la surproduction de MarA, laquelle va activer l'expression de *acrAB* (4, 80, 136, 190). Chez *Salmonella* l'implication de *mar* et *sox* dans la régulation du système AcrAB n'a pas encore été élucidé et de plus, nous avons constatée que les mutations fréquemment décrites dans les opérons *mar* et *sox* de *E.coli* n'ont, jusqu'à présent, pas été retrouvée chez *Salmonella* (178, 191).

8. Régulation du systeme d'efflux AcrAB-TolC chez *S.* Typhimurium

Les opérons *marRAB* et *soxRS* présent chez *S.* Typhimurium sont structurellement analogues à cells de *E. coli* (47, 122, 124, 191, 193, 235). Une étude de Rondall et al. sur 44 sérovars de *Salmonella* a montré que tous contenaient une séquence homologue à *marA* de *S.* Typhimurium en une seule copie (205). L'opéron *marRAB* a en effet été décrit chez beaucoup de membres de la famille des entérobactéries. Une autre étude a montré que *marA* était également présent chez *S.* Choleraesuis et qu'un phénotype de multirésistance était inductible chez cette souche, peut-être par surexpression des gènes *marA* et la pompe AcrAB (243).

Par homologie avec ce qui a été mis en évidence chez *E. coli*, les opérons *mar* et *sox* pourraient contrôler l'expression de système d'efflux AcrAB chez *Salmonella*. Une étude a établi une corrélation entre la résistance aux quinolones d'un isolat clinique de *S.* Typhimurium et l'apparition d'une mutation dans le gène *soxR* conduisant à l'expression constitutive de *soxRS* (122). Une autre étude a montré la présence d'une mutation dans *acrR* (Gln78Stp) chez des souches de *S.* Choleraesuis résistantes aux fluoroquinolones et le système d'efflux actif AcrAB avait été mis en évidence (97). Récemment, une étude a également montré la présence de mutation dans *acrR* (duplication des acide amines Ile75 et Glu76) chez des mutants de *S.* Typhimurium obtenus *in vitro* et hautement résistants aux quinolones (178). Cependant, si les bases génétiques du phénotype de multirésistance chez différents mutants de *E. coli* reposent sur des mutations inactivant le gène *marR*, les différentes tentatives pour identifier des mutations dans *mar* chez *Salmonella* ont échoué (88).

Dans une étude de Casin et al., la région *marORA* a été séquencé chez des isolats de *S.* Typhimurium hautement résistants à la ciprofloxacine portant des mutations dans les gènes cibles, et montrant une surexpression de l'efflux actif, n'a révèle la présence d'aucune mutation dans la région *marORA* (36). Une autre étude chez des mutants de *Salmonella* hautement resistants aux quinolones a montré que la mutation identifiée dans le gène *marR* ne participait pas à cette résistance (88). Récemment, une étude d'Olliver et al. a également montré l'absence de mutations dans les régions *marORA* et *soxRS* chez des mutants de *S.* Typhimurium obtenus *in vitro* et chez des souches de *S.* Typhimurium hautement résistants aux quinolones et surexperimant acrAB (178). Alors que, une étude de Eaves et al. a établi une augmentation du niveau d'expression du gène *marA* chez trois isolats de *S.* Typhimurium

alors que, le niveau d'expression du gène *soxS* restait inchangée. Une étude réalisée par Piddock et al. sur 6 souches multirésistantes de *S.* Typhimurium et chez qui des mécanismes d'efflux actif ont été mis en évidence, aucune ne surexprimait les gènes *marA* ou *soxS* et aucune ne portait de mutations dans *acrR*. Selon cette étude, il y aurait un autre mécanisme responsable de la surexpression de la pompe AcrAB chez *S.* Typhimurium. Des études récentes ont établi une corrélation entre la surexpression de gène *ramA* ou (*rma*) et une phénotype de multirésistance aux antibiotiques modulée par AcrAB chez *S.* Typhimurium et *S.* Paratyphi B (247, 248, 259). Nous reviendrons plus en détail sur l'opéron *ram* dans la partie « objectifs du travail ».

ETUDE EXPERIMENTALE

ETUDE EXPERIMENTALE

1. Objectifs du Travail

Les salmonelles non typhoïdales sont, chez l'homme, des pathogènes gastro-intestinaux causant des maladies allant des simples gastro-entérites à des infections systémiques graves. Les sérotypes ubiquistes, *S.* Enteritidis et *S.* Typhimurium, sont à l'origine de la majorité des salmonelloses dans de nombreux pays industrialisés. L'homme se contamine généralement par la chaîne alimentaire dans laquelle les salmonelles entrent principalement à cause du portage sain chez la volaille. Les salmonelles peuvent aussi causer des pathologies chez l'animal, par exemple chez les bovins, et provoquer des pertes importantes dans l'élevage. L'antibiothérapie est réservée chez l'homme aux patients présentant un risque d'infection systémique. Cependant, les salmonelles sont devenues résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques comme les β-lactamines, les phénicolés, les aminosides, les sulfamides, les tétracyclines et le triméthoprime ce qui traduit une résistance multiple. Dans ce cas, les molécules de la famille des quinolones correspondent, chez l'adulte, au traitement de choix. Cependant la capacité d'adaptation des bactéries a permis l'émergence de souches résistantes aux quinolones, le risque d'échec thérapeutique est alors grandissant. En élevage, des molécules de cette famille sont aussi prescrites, augmentant la pression de sélection en faveur des souches de sensibilité diminuée.

Afin de tenter de résoudre ce problème, il est très important d'identifier les gènes impliqués dans la multirésistance aux antibiotiques. Plusieurs études récentes ont décrit l'implication de efflux actif dans cette résistance. Un système majeur d'efflux, AcrAB-TolC a été décrit chez *Salmonella* et relié à la resistance aux quinolones et à la résistance multiple aux antibiotiques (20, 22, 74, 191).

L'objectif de ce travail était donc de déterminer le rôle des opérons *mar*, *sox* et *ram* dans la résistance aux quinolones et la résistance multiple chez *S.* Typhimurium de lysotypes DT104 et DT204.

La première partie de cette thèse est consacrée à l'étude des opérons *mar* et *sox*, afin de déterminer leurs rôles dans la résistance aux quinolones et la multirésistance aux antibiotiques chez *S.* Typhimurium de lysotypes DT104 et DT204.

En effet, de manière similaire à ce qui se passe chez *E. coli*, la pompe AcrAB-TolC semble fortement impliquée dans la multirésistance aux antibiotiques et la résistance aux quinolones chez *S* Typhimurium. Chez *E. coli*, la surexpression de la pompe AcrAB-TolC semble due à une dérégulation, suite à l'apparition de mutations dans les gènes codant pour des régulateurs globaux, tels que *marRAB* et *soxRS*, ainsi que dans le gène codant pour le régulateur local *acrR* de la pompe (5, 14, 107, 115, 120, 122, 140, 146, 164, 171, 173, 176, 251, 253, 258). Cependant, les mutations décrites dans l'opéron *mar* de *E. coli* n'ont pas été retrouvées chez les souches de *S.* Typhimurium qui sont multirésistantes et qui surexpriment la pompe AcrAB-TolC (178, 191). Nous nous sommes donc demandés si l'inactivation des gènes *marRA* et *soxRS* peut affectes le niveau de résistances aux antibiotiques.

La deuxième partie de cette thèse est consacrée à l'étude de l'opéron *ram* et son rôle dans la multirésistance aux antibiotiques et la régulation la pompe AcrAB-TolC.

Le gène *ramA* a initialement été décrit chez *K. pneumoniae*, mais des homologues ont été décrits chez *E. aerogenes*, *S.* Paratyphi B et plus récemment chez *S.* Typhimurium (41, 70, 248, 259). Dans tous les cas, la surexpression de ce gène confère un phénotype de résistance multidrogue via l'activation de l'expression des gènes *acrAB*. Cependant, il semble que l'implication du gène *ramA* dans multirésistance est principalement expliquée par sa surexpression. Le gène *ramA* code une protéine RamA, un activateur transcriptionnel appartenant à la famille AraC. Comme pour les autres activateurs de la famille AraC, RamA ne semble pas être assujettie à une régulation direct par des ligands, c'est pourquoi sa transcription est probablement contrôlée par une autre protéine régulatrice. Notre intérêt était donc d'identifier cette protéine régulatrice. Nous avons supposé que le gène codant cette protéine est situé immédiatement en amont du gène *ramA*.

Il nous a donc paru important d'étudier l'opéron *ram*, qui n'existe pas dans le génome de *E. coli* (248), afin de mieux comprendre son rôle dans la resistance aux antibiotiques chez *S.* Typhimurium.

2. Matériel et méthodes

2.1. Matériel biologique

2.1.1. Souches bactériennes

L'étude a été réalisée sur une collection de souches de *Salmonella* déjà caractérisées et répertoriées dans le tableau 2. Différentes souches de *S.* Typhimurium de lysotype DT104 et DT204 y sont représentées. Cette collection comporte 8 souches de terrain isolées en élevage et exprimant différents niveaux de résistance aux fluoroquinolones ainsi que trois mutants dérivés de la souche BN18, obtenus *in vitro* après une série de passages sur enrofloxacine ou *in vivo* chez les poulets sous pression de sélection par enrofloxacine (72, 73).

Tableau 2. Les souches de terrain et de mutants de *Salmonella*

			Origine			
Souche	**Sérovar**	**Lysotype**	**Année**	**Pays**	**Isolement**	**Référence**
BN9181	Typhimurium	DT104	1995	France	Bovin	(12)
BN10055	Typhimurium	DT104	1997	France	Bovin	(22)
BN9945	Typhimurium	DT104	1996	France	Bovin	(22)
S92/1495	Typhimurium	DT104	1992	Écosse	Bovin	(30)
543SA98	Typhimurium	DT104	1998	Belgique	Bovin	(22, 102)
102SA00	Typhimurium	DT204	2000	Belgique	Aliment pour animaux (Importé de Chine)	(20)
902SA92	Typhimurium	DT204	1992	Belgique	Bovin	(20)
BN18	Typhimurium	ND	1973	France	Pigeon	(72)
BN18/21	Typhimurium	ND		France	Mutation *in vitro*	(72)
BN18/41	Typhimurium	ND		France	Mutation *in vitro*	(72)
BN18/71	Typhimurium	ND		France	Mutation *in vitro*	(72)

ND : non déterminé

Tableau 3. Caractéristiques des souches de terrain et mutants de *Salmonella*

souche	Phénotype de résistance	CMI (µg/ml)				Mutations codantes dans les QRDR				Mutations codantes dans les régulateurs de acrAB				WB
		Nal	Enr	Mar	Cip	*gyrA*	*gyrB*	*parC*	*parE*	*marRAB*	*soxRS*	*acrR*	*acrA*	AcrA ratio
S.Typhiumurium														
902SA92	ApCmFfSmSpSuTC	>4096	64	32	32	Ser83Ala; Asp87Asn	Ser464Phe	Ser80Ile	–	–	–	–	–	++
102SA00	ApCmFfSmSpSuTC	>4096	64	64	32	Ser83Ala; Asp87Asn	Ser464Phe	Ser80Ile	–	–	–	–	–	++
BN10055	ApCmFfSmSpSuTC	>4096	2	2	1	Ser83Tyr	–	–	–	–	–	–	–	+++
543SA98	ApCmFfSmSpSuTC	1024	2	2	0.5	Ser83Phe	–	–	–	–	–	–	–	+++
BN9945	ApCmFfSmSpSuTC	1024	1	1	0,5	–	–	–	–	–	–	–	–	++
BN9181	ApCmFfSmSpSuTC	4	0.030	0,030	0,015	–	–	–	–	–	–	–	–	+
SA/921495	sensible	4	0.030	0,030	0,015	–	–	–	–	–	–	–	–	+
BN18	sensible	4	0.030	0,06	0,015	–	–	–	–	–	–	–	–	+
BN18/21	ND	64	0.5	0,24	0,015	–	–	–	–	–	–	–	–	++
BN18/41	ND	>4096	4	4	2	Gly81Cys	–	–	–	–	–	Ile75;Glu76	–	+++
BN18/71	ND	>4096	16	16	8	Gly81Cys	–	–	–	–	–	Ile75;Glu76	–	+++

Ap: ampicilline, Cm: chloramphenicol, Ff: florfenicol, Sm: streptomycine, Sp: spectinomycine, Su: sulfamides, Tc: tetracycline
Nal: acide nalidixique, Enr: enrofloxacine, Mar: marbofloxacine, Cip: ciprofloxacine. ND : non déterminé

Les souches utilisées dans les techniques de biologie moléculaire sont :

1) La souche de *E. coli* TG1 de génotype *{SupE hsdD* 5 *thi* D (*lac-pro*AB)/F^+[*tra* D36 *proAB*$^+$ *lacI*^{q} lacZΔM15]} pour les expériences de clonage,

2) La souche *S.* Typhimurium SL5283 pour les expériences de transduction,

3) La souche *S.* Typhimurium LT2 de référence dont le génome a entièrement été séquencée (numéro d'accès GenBank NC_003197),

4) La souche de référence *E. coli* ATCC25922 utilisée comme contrôle dans les mesures de sensibilité aux antibiotiques.

2.1.2. Plasmides et bactériophages

Les plasmides pKD46 et pKD4 ont été utilisés dans la méthode de l'inactivation d'un gène par délétion décrite par Datsenko et Wanner (51). L'origine de réplication de ces deux plasmides est thermosensible. Ils sont donc facilement éliminés en culture quand la température est supérieure à 30°C. Le plasmide pKD4 «template» porte une cassette de résistance à la kanamycine bordée de séquences FRT (FLP Recognition Target), permettant son élimination en présence de FLP recombinase. Le plasmide Red Helper pKD46 porte une cassette de résistance à l'ampicilline ainsi que la recombinase Red du phage λ, synthétisée sous contrôle du promoteur P_{araB} inductible par l'arabinose.

Le plasmide pBBR1MCS2 (123) a été utilisé dans les expériences de complémentation. C'est un plasmide à faible nombre de copies qui porte une gène de résistance à la kanamycine, ainsi qu'un multi-site de clonage dans le gène *lacZ*, interrompant celui-ci lorsqu'un fragment d'ADN y est cloné.

Le bactériophage P22HT105 porté par la souche *S.* Typhimurium SL5283 a été utilisé dans les expériences de transduction chez *Salmonella* (127, 128).

2.1.3. Conditions de culture

Toutes les souches étudiées ont été cultivées en routine sur les milieux Luria-Bertani (LB), Mueller-Hinton (MH), Brain-Heart-infusion (BHI). Le milieu Trypsique-soja (TSB) liquide ou supplémenté d'agar a été utilisé lors des expériences de transduction. Enfin, le

milieu SOC a été utilisé pour cultiver les souches fraîchement électroporées. Sauf indication contraire, toutes les souches ont été cultivées à 37°C.

Ces milieux ont été supplémentés de 50 µg/mL de kanamycine (Fluka, France) ou de 100 µg/mL d'ampicilline (Sigma, St Louis USA) pour cultiver les souches mutantes portant une cassette de résistance à l'un ou l'autre de ces antibiotiques sur le chromosome ou sur un plasmide. Le X-gal (ou 5bromo-4-chloro-3indolyl β-Dgalactopyranoside) a été utilisé à raison de 20 µg/mL lors de la sélection des clones transformants dans les expériences de clonage utilisant le plasmide pBBR1MCS2. Ce composé chromogène est hydrolysé en un produit bleu par la β-galactosidase, produit du gène *lacZ*. Les clones portant une plasmide contenant un insert interrompant la phase de lecture de *lacZ* resteront donc blanches et les autres deviendront bleues.

2.2. Méthodes de bactériologie

2.2.1. Sensibilité aux antibiotiques

2.2.1.1. Antibiogrammes

L'antibiogramme permet de déterminer la sensibilité des bactéries vis-à-vis d'un panel d'antibiotiques. La méthode utilisée est la diffusion en milieu gélosé. Des disques imprégnés d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu MH, préalablement ensemencé par inondation avec une dilution de la souche à tester. Celle-ci a été cultivée pendant 18 h à 37°C dans du bouillon MH, puis diluée au 1/200^{éme} (environ 10^6 ufc/mL) en mélangeant une goutte de culture à 10 ml d'eau distillée. Une fois les géloses ensemencées et séchées, les disques d'antibiotiques sont déposés et un gradient de concentration s'établit dans la gélose. Après 18 h d'incubation à 37°C, la croissance de la bactérie dessine des « halos» d'inhibition autour des disques d'antibiotiques. Les diamètres d'inhibition mesurés sont comparés à des valeurs critiques proposées par le CA-SFM (48), sauf pour l'enrofloxacine, la marbofloxacine et le florfénicol dont les valeurs seuils sont indiquées par les firmes. L'interprétation des résultats permet de classer la souche bactérienne dans les catégories sensible (S), résistante (R) ou intermédiaire (I). Les antibiotiques suivantes ont été testés: acide nalidixique, fluméquine, ciprofloxacine, sparfloxacine, péfloxacine amoxicilline association amoxicilline et acide clavulanique, ampicilline, céfalexine, céfépime, cefpirome, imipénéme, gentamicine,

néomycine, spectinomycine, streptomycine, kanamycine, colistine, polymyxine B, sulfamides, triméthoprime, association triméthoprime et sulfaméthoxazole, rifampicine, enrofloxacine et marbofloxacine.

2.2.1.2. Détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice

La détermination de la Concentration Minimale Inhibitrice **(CMI)** permet d'évaluer la plus faible concentration d'antibiotique capable d'inhiber in vitro toute croissance visible de la souche bactérienne à étudier. Elle a été effectuée sur des souches cultivées dans du bouillon MH supplémenté d'antibiotiques en fonction des souches testées. Les concentrations critiques c et C (µg/mL) ont été utilisées pour classer les souches comme sensibles (CMI $\leq$ c), intermédiaires (c < CMI $\leq$ C), ou résistantes (CMI > C). Ces valeurs sont proposées par différents comités nationaux comme le Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) en France, ou le National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) aux Etats-Unis, et sont établies sur des critères bactériologiques, pharmacocinétiques et cliniques (233) ou par des firmes produisant les antibiotiques. Ces concentrations sont respectivement de:

- 8 et 16 pour l'acide nalidixique (Fluka, France),
- 4 et 8 pour la fluméquine (Sigma, St Louis, USA),
- 1 et 2 pour la ciprofloxacine (Bayer, AG Leverkusen, Allemagne),
- 0.5 et 2 pour l'enrofloxacine (Vétoquinol, Lure. France),
- 8 et 16 pour le chloramphénicol (Fluka, St –Quentin Fallavier, France) et le florfénicol (Shering-Plough Animals Health, Kenilworth, N.J),
- 1 et 4 pour l'érythromycine (Fluka Steiheim, Allemagne),
- 4 et 8 pour la tétracycline (Fluka, St –Quentin Fallavier, France),
- et 4 et 16 pour l'ampicilline (Sigma, St Louis, USA).

2.3. Méthodes de biologie moléculaire

2.3.1. Extraction et purification des ADN génomiques et plasmidiques

Les ADN génomiques ont été extraits par le kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les ADN plasmidiques ont été extraits par les kit Wizard Plus SV Miniprep DNA Purification system (Promega, Madison, Wis USA), QIAEXII Agarose gel extraction, ou le kit plasmid Mini purification (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les différents produits de PCR ont été purifiés par les kit NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel, Hoerdt, France), Qiaquick spin PCR purification kit ou QIAEXII Agarose gel extraction (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les kit Micropure-EZ et Microcon (Millipore, Bedford Ma USA) ont été utilisés pour purifier et concentrer différents types d'ADN respectivement.

La qualité des ADN extraits a été appréciée sous ultraviolet après électrophorèse sur un gel contenant 0.8% ou 1.5% d'agrose et 0.5µg de bromure d'éthidium (BET) (Amresco, Solon, Ohio, USA). Le dépôt simultané d'un marqueur de poids moléculaire (smartLadder) (Promega, Madison, Wis, USA) a également permis l'estimation de la quantité extraite.

2.3.2. Inactivation d'un gène par délétion

La méthode de Datsenko et Wanner (51) a été adaptée aux salmonelles pour construire des mutants Δ*marA::kan*, Δ*marR::kan,* Δ*soxS::ka*; Δ*soxR::kan*, Δ*ramA::kan* et Δ*ramR::kan*. Tous les mutants ont été faits à partir de la souche sensible *S* Typhimurium DT104 S92/1495. La méthode consiste à remplacer, par recombinaison, une séquence chromosomique cible par un gène de sélection, un gène conférant une résistance à la kanamycine (*kan*), gène initialement porté par un plasmide matrice (Figure 19). La première étape consiste à amplifier ce gène par PCR grâce à des amorces portant des extensions homologues à la séquence chromosomique cible. L'étape suivante correspond à deux électroporations successives de la souche à muter : un plasmide thermosensible exprimant la recombinase λ Red est d'abord incorporé, puis le produit PCR. La recombinaison entre le produit PCR hybride et de la séquence cible est ainsi favorisée.

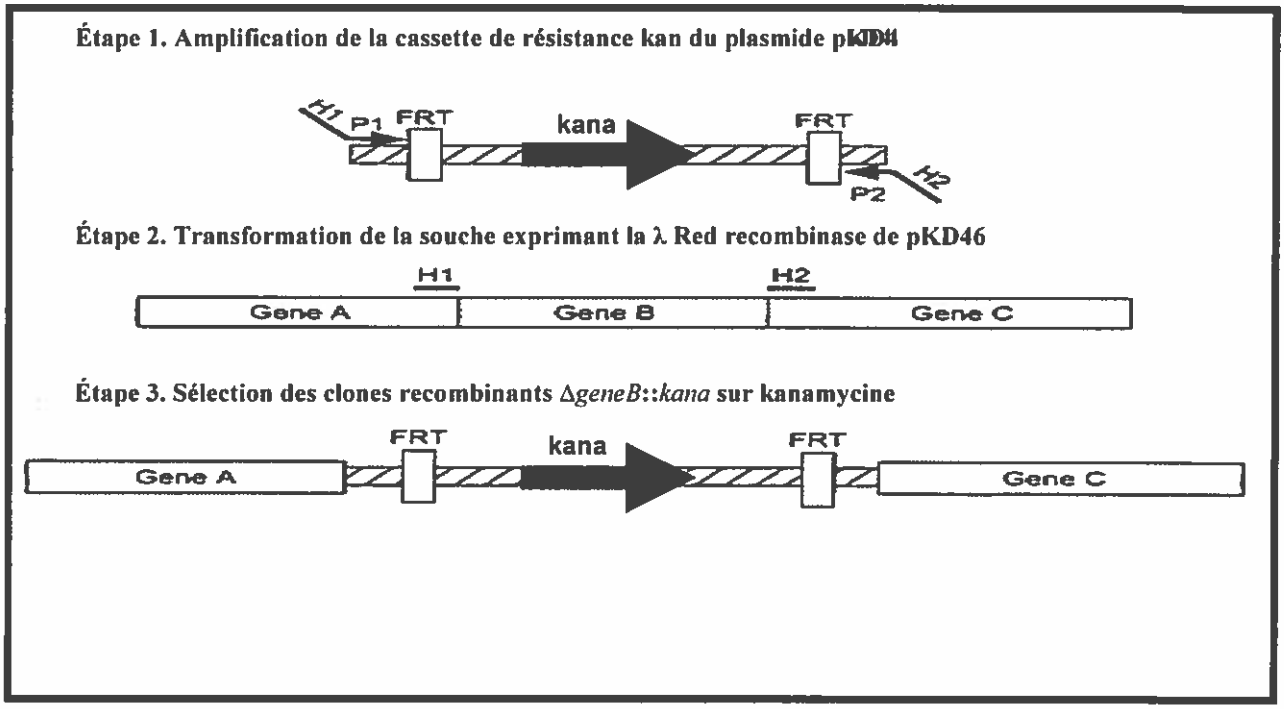


Figure 19. Inactivation d'un gène par délétion. Les amorces P1 et P2 s'hybrident à pKD4 et portent respectivement les extensions H1 et H2, homologues au gène à muter (marR, marA, soxR, SoxS, ramA et ramR). D'après (51).

Transformation de la souche à muter avec le plasmide Red Helper pDK46

La souche *S.* Typhimurium S92/1495 a été transformée par électroporation avec 120 ng de plasmide pKD46. Les cellules électroporées ont été incubées pendant 2 h à 30°C sous agitation avec 1 mL de milieu SOC, puis pendant 12-16 h à température ambiante, l'origine de réplication du plasmide pKD46 étant thermosensible. Les clones transformants ont été sélectionnés à 30°C sur géloses LB supplémentées d'ampicilline à 100µg/mL et la L-arabinose à 1mM.

Préparation du produit PCR

Un fragment d'ADN linéaire portant une cassette de résistance à la kanamycine, bordée de deux extensions de 50 nucléotides homologues au gène à muter, a été généré par PCR à partir de plasmide pKD4 en utilisant des amorces P1 et P2 spécifiques du plasmide pKD4, auxquelles ont respectivement été accolées des amorces H1 et H2 spécifiques du gène à muter (51) (Tableau 4).

La PCR a été réalisée à partir d'ADN plasmidique de pKD4, dans un volume de 100 µL contenant environ 200 ng d'ADN, 0.4 µM de chaque amorce, 200 µM de dNTP, 1 X de tampon Taq polymérase. Après 3 min de dénaturation initiale à 95°C, l'amplification a été réalisée sur 30 cycles, chacun comprenant 30 sec à 95°C, 30 sec à 52°C et 1 min 30 sec à 72°C avec une extension finale de 7 min à 72°C. Les produits PCR de 1477 pb ont été détectés par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8% chargé de BET, ensuite purifiés grâce au kit Qiaquick spin PCR purification kit, puis digérés par *DpnI* (Promega, Madison, USA) pour éliminer l'ADN plasmidique initial méthylé non amplifié. La digestion a été réalisée en incubant 3 µg d'ADN et 20 U d'enzyme dans 1X de tampon B pendant 2 h 30 min à 37°C. L'enzyme a été éliminée par passage sur colonne Micropure EZ (Millipore) puis l'ADN a été concentré par le Microcon (Millipore, Bedford Ma USA).

Transformation de la souche à muter avec les produits PCR

La souche *S.* Typhimurium S92/1495 portant pKD46 a été transformée par électroporation avec 700 ng du produit PCR préparé précédemment. Les cellules électroporées ont été incubées pendant 3 h à 37°C sous agitation avec 1 mL de milieu SOC, de manière a éliminer le plasmide, et favoriser la recombinaison, puis pendant 12-16 h à température ambiante. Les mutants ont été sélectionnés à 37°C sur gélose LB supplémentée de kanamycine à 50 µg/mL. Dans un deuxième temps, ils ont été testés pour leur résistance à l'ampicilline à 30°C afin de vérifier qu'ils aient bien perdu le plasmide red helper pDK46. Dans le cas contraire, les clones résistants aux deux antibiotiques ont été éliminés sur milieu non sélectif à 43°C.

Vérification des constructions par PCR

Le remplacement du gène cible par la cassette kan a été confirmé par PCR. Les amorces k2 et kt, spécifiques de la cassette kan et les amorces ramR2, marD, marZ soxG, soxD spécifiques des gènes à muter, ont été utilisées (Tableau 4). Les PCR ont été réalisées à partir de colonies bactériennes dans un volume de 25 µl contenant 0,4 µM de chaque amorce, 200 µM de dNTP ,1 X de tampon Taq et 0,5 U de Taq polymérase. Après 5 min de dénaturation initiale à 95°C, l'amplification a été réalisée sur 30 cycles, chacun comprenant 30 sec à 95°C, 30 sec à la température d'hybridation (62°C pour les amorces k2/kt, ramR2/kt et marD/marZ, 60°C pour les soxG/soxD) et 30 sec à 72°C, avec une extension finale de 7

min à 72°C. La taille des produits PCR a été vérifiée après électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% chargé de BET.

2.3.3. Transduction d'une mutation

Le mutation *ΔramA::kan* a été introduite chez les souches de *S.* Typhimurium répertoriées dans le tableau 2 par transduction. Ces souches sont en effet déjà résistantes à l'ampicilline et ne pouvaient donc pas être utilisées dans la méthode de Datsenko *et al.* décrite précédemment.

La transduction consiste en un transfert génétique au cours duquel un ou plusieurs gènes sont transmis d'une bactérie donatrice à une bactérie réceptrice par l'intermédiaire d'un bactériophage. Un lysat de bactériophage P22HT105 a ici été utilisé, celui-ci ayant été préalablement propagé sur la souche *S.* Typhimurium SL5283 en milieu TSB supplémenté de galactose et de glucose à 0,3%.

Préparation d'un lysat de phage

La souche donatrice (S92/1495 *ΔramA::kan*) a été cultivée dans du milieu TSB supplémenté de kanamycine à 50 µg/mL pendant 18h à 37°C sous agitation. Quelques gouttes de cette préculture ont été diluées dans 10 mL de TSB de manière à obtenir un léger trouble bactérien. Une gélose de milieu TSA contenant 50 µg/mL de kanamycine a ensuite été ensemencée par inondation par cette suspension bactérienne et après 20 min de séchage, une goutte de 100µL de lysat de phage (environ 10^8 phages) a été déposée au centre de la gélose. Une fois la goutte séchée, le tout a été incubé à 37°C pendant une nuit. Les plages de lyse ainsi formées ont été découpées puis incubées pendant 4h a 37°C sous agitation dans 20 mL de milieu TSB supplémenté de kanamycine à 50 µg/mL, de manière à récupérer les phages en solution. Les phages ont ensuite été extraits en ajoutant 200 µL de chloroforme. Le mélange a été mélangé vigoureusement, incubé pendant 1h à température ambiante puis centrifugé 10 min à 4000g. Le surnageant contenant les phages en solution a été filtré sur membrane millipore de 0,22µm de diamètre puis conservé à +4 C.

Tableau 4. Amorces utilisés pour la production de mutants

Région amplifiée	Amorce	Position Nucléotidique[a]	Séquence (5' to 3')	Température d'hybridation °C
Construction des mutants				
ramA-kan	ramAH1-P1	639041	ACACGATTGTCGAGTGGATTGATGATAATTTGA ATCAGCCGTTAC-GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	52
	ramAH2-P2	639285	ACGATAAGCGCCTGGCGGCAGGTTGAACGTGCG GGTAAAAATGCG-CATATGAATATCCTCCTTAG	52
ramR-kan	ramRH1-P1	638183	TCGAATCCCAGCGCAATATATTCGCCAGCGCGA GCGGGATCGCGC-GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	52
	ramRH2-P2	638650	AAGCATTACTGGAAGCGGCAACCCAGGCGAAA CGCAATCCGGTAT-CATATGAATATCCTCCTTAG	52
marA-kan	marAH1-P1	1597108	GGTTCAGCGGCAGCATATACCGTGATTCGC CATGCATATT-GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	52
	marAH1-P2	1597328	TTCCAAATGGCACCTGCAACGGATGTTTAA AAAAGAGACC-CATATGAATATCCTCCTTAG	52
marR-kan	marRH1-P1	1597517	GCAAATACTCAAGCGTTGCCACTTCGTCCG CCGTTAAGTT-GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	52
	marRH2-P2	1597796	TTATCCCCGCTGGATATCACCGCAACACAG TTTAAAGTGC-CATATGAATATCCTCCTTAG	52
soxS-kan	soxSH1-P1	4503981	GACGGTAATCGCTGGGAGTGCGATCGAACT CGCGGCGGAA-GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	52
	soxSH2-P2	4504210	TGAACATATCGACCAACCGCTAAACATTGA TGTGGTGGCA-CATATGAATATCCTCCTTAG	52
soxR-kan	soxRH1-P1	4504393	CTCCCCGTTTAAAAGCCTTACTGACGCCGGG GGAAGTTGC-GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	52
	soxRH2-P2	4504767	CCCGTGTTCGCCAAGCCTGTCGCCTGGATTT CGCAGCGGA-CATATGAATATCCTCCTTAG	52
Vérification de l'insertion de la cassette *kan*				
kan	k2	-	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	62
	kt	-	CGGCCACAGTCGATGAATCC	62
Vérification des constructions des mutants				
ramA-kan	ramR2	638092	AAGGCAGTTCCAGCGCAAAG	62
	kt	-	CGGCCACAGTCGATGAATCC	62
ramR-kan	ramR2	638092	AAGGCAGTTCCAGCGCAAAG	62
	kt	-	CGGCCACAGTCGATGAATCC	62
marA-kan	marG	1598116	ACGGTGGTTAGCGGATTGGC	58
	marD	1596787	AGCGGCGGACTTGTCATAGC	58
marR-kan	marG	1598116	ACGGTGGTTAGCGGATTGGC	58
	marD	1596787	AGCGGCGGACTTGTCATAGC	58
soxS-kan	soxG	4503843	ATGGTTGCTAAAACGCGGCG	60
	soxD	4505042	CGAACAGGGCGTCGTCGCTT	60
soxR-kan	soxG	4503843	ATGGTTGCTAAAACGCGGCG	60
	soxD	4505042	CGAACAGGGCGTCGTCGCTT	60

[a] **Position nucléotidique selon la souche de *S.* Typhimurium LT2 (numéro d'accès GenBank NC_003197).**

Détermination du titre en phage

Les phages ont été dénombrés sur les souches réceptrices (Tableau 2). Celles-ci ont été cultivées à 37°C en milieu TSB supplémenté de kanamycine à 50 µg/mL. Après 8h d'incubation, la culture a été utilisée pour ensemencer par inondation une gélose de milieu TSA supplémentée du même antibiotique. Le lysat de phage a parallèlement été dilué dans le milieu TSB jusqu'à la dilution 10^{-8}, puis 25 µL de chaque dilution ont été repartis sur la gélose ensemencée et séchée. Après une nuit d'incubation à 37°C, le titre a été déterminé en dénombrant le nombre de plages de lyse observées pour les dernières dilutions de lysat de phage, et en ramenant ce résultat à 1 mL de lysat. Les lysats obtenus à partir de la souche S92/1495Δ*ramA::kan* ont été titrés à 6,8 x 10^9 phages/mL.

Transductions

Une préculture des souches réceptrices (Tableau 2) a été utilisée pour inoculer au 1/200eme 10 mL de milieu TSB. Les cultures ont été incubées à 27°C sous agitation pendant 4 à 5 h, puis un échantillon de 0,5 mL a été centrifugé 3 min à 7800 g. Le culot a été ensuite repris dans 100 µL de TSB, mélangé à 1 mL de lysat phagique, puis incubé 30 min à température ambiante. L'ensemble a ensuite été centrifugé 3 min à 7800 g. Le culot a été lavé deux fois avec 1 mL de TSB, repris dans 200 µL du même milieu, puis étalé sur gélose TSA contenant 50 µg/ml de kanamycine. Les transductants ont été vérifiées par PCR de la même manière que la mutant S92/1495Δ*ramA::kan*.

2.4. Détection de mutations ou d'IS insérés en amont de *ramA*

Nous avons recherché la présence de mutations ou de séquences insérées dans la région se situant en amont du gène *ramA*, la région intergénique *ramRA*, une région supposée contenir les séquences régulatrices de *ramA* (Figure 20).



Figure 20. Représentation schématique de l'opéron *ramRA* et la région intergénique. Les petites flèches indiquent la position et la direction des amorces. Position nucléotidique selon la souche de *S.* Typhimurium LT2 (numéro d'accès GenBank NC_003197).

2.4.1. Séquençage de l'opéron *ramRA*

Une région couvrant le gène *ramR* entièr et une partie de *ramA* gène a été amplifiée par PCR à l'aide des amorces représentées dans le tableau 5 et choisies à partir de la séquence de *S.* Typhimurium LT2 (Figure 20). La PCR a été réalisée sur de l'ADN génomique des souches *S.*Typhimurium décrites dans le tableau 2, dans un volume de 50 µL contenant environ 200 ng d'ADN, 1 µM de chaque amorce, 200 µM de dNTP ,1 X de tampon Taq et 1 U de Taq polymérase. Après 5 min de dénaturation initiale à 95°C, l'amplification a été réalisée sur 30 cycles, chacun comprenant 1 min à 95°C, 30 sec à la température d'hybridation 62°C et 30 sec à 72°C, avec une extension finale de 7 min à 72°C. La taille des produits PCR a été vérifiée après électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% chargé de BET. La présence d'une séquence insérée en amont de *ramA* a été révèlée par une augmentions de la taille du produit PCR par rapport à celle attendue chez la souche parentale. Le séquençage nucléotidique a été réalisé par la société Genome Express, puis les séquences ont été analysées. La nature des mutations et des séquences insérées a été identifiée par recherche d'homologies en utilisant le programme BLAST (http://wwwncbi.nlm.nih,gov/BLAST).

Tableau 5. Amorces utilisées pour le séquençage la région *ramRA*, du clonage du *ramR* et des expériences de RT-PCR

Région amplifiée	Amorce	Position Nucléotidique[a]	Séquence (5` to 3`)	Température d'hybridation °C
Detection des mutations				
ramR-ramA	ramR1	639026	CGTGTCGATAACCTGAGCGG	62
	ramR2	638092	AAGGCAGTTCCAGCGCAAAG	62
Construction de complémentation plasmide pBB-ramR				
ramR	BamH1ramR1	639026	CATGGGATCC-	62
	EcoR1ramR2	638092	CGTGTCGATAACCTGAGCGG	62
			CTAGGAATTC-	
			AAGGCAGTTCCAGCGCAAAG	
Analyse d'expression par RT-PCR				
ramA	ramA3	639043	CACGATTGTCGAGTGGATTG	58
	ramA4	639275	AAAATGCGCGTAAAGGTTTG	58
gyrB	gyrB3	4040174	TACCTGCTGGAAAACCCATC	58
	gyrB4	4039810	CTTGTCCGGGTTGTACTCGT	58

[a] **Position nucléotidique selon la souche de *S.* Typhimurium LT2 (numéro d'accès GenBank NC_003197).**

2.5. Expériences de complémentation

2.5.1. Clonage du gène *ramR* sauvage

Un fragment de 953pb contenant le gène *ramR* sauvage et sa région promotrice (la séquence intergénique *ramRA*) a été amplifiée par PCR à l'aide des amorces ramR1 et ramR2 (Tableau 5) additionnées respectivement d'une site de restriction *Bam*H1ramR1 et *Eco*R1ramR2 aux extrémités 5′ (Figure 21). La PCR a été réalisée sur de l'ADN génomique de la souche S/921495, dans un volume de 50 µL contenant 0,5 µM de chaque amorce, 200 µM de dNTP ,1 X de tampon Taq et 1 U de Taq polymérase. Après 5 min de dénaturation initiale à 95°C, l'amplification a été réalisée sur 30 cycles, chacun comprenant 1 min à 95°C, 30 sec à la température d'hybridation 62°C et 30 sec à 72°C, avec une extension finale de 7 min à 72°C. Le produit PCR a été vérifiée après électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% chargé

de BET et puis purifié par le kit QIAEXII Agarose gel extraction. Le produit PCR et le vecteur pBBR1MCS-2 ont ensuite été digères par *Eco*R1 et *Bam*H1 (QBIO gene, France). Les fragments de restriction ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% puis purifié à l'aide du kit QIAEXII Agarose gel extraction. Les produits PCR et le vecteur linéarisé ont alors été ligués par la T4 DNA ligase, générant ainsi le plasmide pBBR-*ramRS1495* (Figure 21). Les produits de ligation ont ensuite été utilisés pour transformer par électroporation la souche *E.coli*TG1. Les cellules électroporées ont été incubées 2h à 37°C sous agitation avec 500 µl de milieu SOC avant d'être étalées sur géloses LB supplémentées de kanamycine a 50 µg/ml et de X-gal a 20 µg/ml. Les clones transformants ainsi sélectionnés ont été repiqués dans du milieu BHI contenant 50 µg/ml de kanamycine, puis vérifiés par PCR et digestion. La région *ramRA* sauvage ainsi clonée a ensuit été transférée chez les souches représentées dans le tableau 2 par électroporation du plasmid pBBR-*ramR*1495 selon la même méthode.

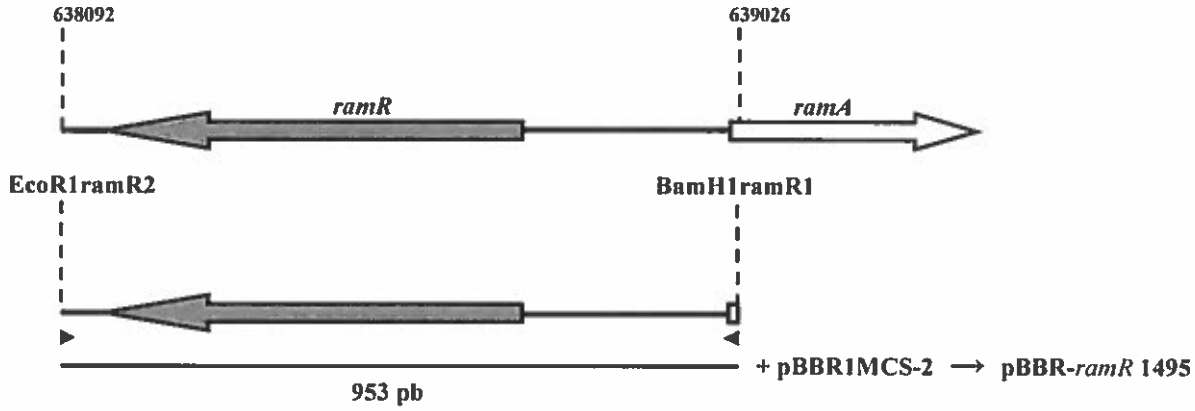


Figure 21. Représentation schématique du clonage de *ramR* dans un plasmide pBBR1MCS-2. Le fragment PCR de 953pb contenant le gène *ramR* est issu de la souche S/1495. Les positions nucléotidiques correspondant à celles de *S.* Typhimurium LT2 (numéro d'accès GenBank NC_003197).

2.6. Technique de RT-PCR

Le niveau d'expression du gène *ramA* a été estimé grâce à la quantification des ARNm présents dans la bactérie en phase exponentielle de croissance. Chaque souche a donc été mise en culture, puis la croissance a été stoppée en phase exponentielle. Les ARNm ont été extraits, rétrotranscrits en ADNc, et quantifiés par PCR. La quantification d'un gène d'expression

constitutive, le gène *gyrB*, a été effectuée de la même manière et nous a servi de contrôle négatif.

Croissance bactérienne

Une préculture de chaque souche a été utilisée pour inoculer au 1/100eme 20 mL de milieu LB supplémenté ou non d'un antibiotique selon les exigences de la souche. Les cultures ont été incubées à 37°C sous agitation puis stoppées en phase exponentielle de croissance (Densité optique DO_{600nm} = 0,5) en les plongeant dans la glace. Un échantillon de 2 x 0,5 mL de culture a ensuite été centrifugé pendant 15 min à 16000 g et à 4°C.

Extraction des ARN totaux

Le culot bactérien a immédiatement été suspendu dans 1 mL de «RNA bacterial protect» (Qiagen ou RNA later de Ambion) Trizol (Invitrogen, Cergy-Pontoise), un réactif qui permet de maintenir l'intégrité des ARN tout en lysant les cellules et en permettant la dissolution des complexes nucléoprotéiques. L'échantillon homogénéisé a été incubé pendant 5 min à 30°C, mélangé à 0,2 mL de chloroforme, puis centrifugé 15 min à 12000 g et à 4°C. L'ARN, contenu dans la phase aqueuse, a été précipité avec 0,5 ml d'isopropanol, incubé pendant 10 min à température ambiante, puis centrifugé 10 min à 12000 g et à 4°C. Le culot d'ARN a été lavé avec 1 mL d'éthanol 75 %, centrifugé 5 min à 7500g 4°C, séché à l'air ambiant 5 à 10 min, puis dissous dans 25 µL d'eau « RNAse-free » à 55°C. Les ARN extraits ont alors été dosé pour chaque échantillon par un spectrophotomètre à 260 nm dans des cuves Hellma de 10 mm (spectrophotomètre Gene Quant, Pharmacia Biotech) considérant que une DO de 1 correspond à 40 ng/µL d'ARN, le rapport DO_{260}/DO_{280} devant être compris entre 1,8 et 2,1. L'ADN génomique contaminant a été éliminé par le kit « Turbo DNA-free^{TM}» (Ambion).

Rétro transcription des ARN en ADN

Les ARN totaux ainsi extraits ont été rétrotranscrits en ADNc grâce à l'enzyme «SuperScript™ III reverse transcriptase» (Invitrogen, Cergy-Pontoise) et à l'aide d'oligonucleotides reverses (ramA4 et gyrB4, spécifiques des gènes *ramA* et *gyrB* tableau 5)

permettant un recopiage ciblé des ARNm et un rendement comparable pour tous les gènes cibles. Toutes les étapes ont été effectuées sous une hotte réservée pour manipulation ARN. La rétrotranscription a été réalisée sur un échantillon de 500 ng d'ARN total. Cette normalisation à 500 ng pour chaque échantillon permet de pallier les éventuelles variations de rendement d'extraction d'ARN selon les échantillons. Les ARN totaux (0,5µg) ont été incubées 5 min à 65°C avec 500 µM de dNTP et 2 pmole de chacune des amorces ramA4 et gyrB4 (thermomixer Eppendorf). L'ensemble a ensuite été refroidi dans la glace au moins 1 min puis incubé 2 min à 55 °C avec 0.02 M de dithiothreitol, 40 U de «RnaseOUt ribonuclease inhibitor» (Invitrogen) et 5 X de tampon « First strand » dans un volume final de 19 µl. L'enzyme « SuperScript™ III reverse transcriptase » a alors été ajouté sous 1µl (200 U), l'ensemble a été incubé 50 min à 55 °C, puis la réaction a été inactivée pendant 5 min à 95 °C. Le ADNc ainsi générés ont enfin été incubés 20 min à 37 °C avec 1µl de RNAseA (500 µg/ml, Qbiogen, France) puis stockés à -20 °C.

Estimation du niveau d'expression des gènes par PCR

Les différences de niveau d'expression de gène *ramA* a été estimé par PCR sur l'ADNc obtenu par rétrotranscription. L'amplification a été faite à l'aide des amorces ramA3, ramA4 et gyrB3 et gyrB4 (Tableau 3). Les ADNc totaux (500 ng) ont été amplifiés dans un volume final de 20 µl contenant 0,5µM de chaque amorce, 250 µM de dNTP, 1X de tampon Taq et 0,5 U de Taq polymérase. Après 3 min de dénaturation initiale à 95°C, l'amplification à été réalisée sur 35 cycles chacun comprenant 20 sec à 94 °C, 20 sec à la température d'hybridation 58 °C, et 20 sec à 72 °C. Les produits PCR ont été détectés sur gel d'agarose 1,5% chargé de BET. Le niveau d'expression de *ramA* a alors été estimé en comparant l'intensité des bandes obtenues après une série de dilutions au ½ des ADNc.

2.7. Estimation du niveau de l'expression de la protéine AcrA par « Western blot » (immuno-empreinte)

Les différences de niveau d'expression de la protéine AcrA a été estimées par Western blot chez les souches SA92/1495, S92/1495Δ*ramR*::*Kan*, S92/1495Δ*ramR* et S92/1495Δ*ramR* + pBR*ramR*1495. Les souches ont été cultivées une nuit à 37°C en bouillon LB, récoltées par

centrifugation 5 min à 5600 g et remises en suspension à une absorbance de 10.0 à 600 nm dans du tampon phosphate de sodium 50mM (pH7, 0). Ces suspensions ont été diluées au ½ dans du tampon de Laemmli (1X : Tris-HCl 62,5 mM ; SDS 2% ; glycérol, 10 % ; β-mercapto-éthanol, 10 % ; bleu de bromophénol, 0,1 %) et chauffées pendant 10 min à 100 °C. Les protéines totales contenues dans 20 µl de chacun des lysats ont alors été séparées par électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) à 12,5% selon la technique de Laemmli (129).

Les protéines totales ainsi séparées ont été transférées sue une membrane de nitrocellulose sous un ampérage constant de 0,8mA/cm^2. La membrane a été lavée 3 fois dans du tampon TSB (NaCl 0,15% ; Tris-HCl 10 mM, PH 7,5), puis saturée pendant 30 min à température ambiante dans le même tampon additionné de 1% de lait en poudre. Elle a alors été incubée pendant une nuit à température ambiante en présence d'un anticorps polyclonal anti-AcrA (158) dilué au 1/2000ème dans du tampon TSB additionné de 0,33 % de lait en poudre et de 0,05 % de Tween-20 (TBS-T). Après 3 lavages en TBS-T, la membrane a été incubée pendant 1 heure en TBS-T avec un conjugué protéine A-péroxydase (Sigma). Après 3 nouveaux lavages en TBS-T, la révélation a été effectuée par incubation à température ambiante dans du tampon TBS contenant 0,06 % du substrat chromogène 4-chloro-1-naphtol et 5 mM d'eau oxygénée.

RESULTATS

RÉSULTATS

1. Étude des opérons *mar* et *sox*

1.1. Rôle dans la resistance intrinsèque aux antibiotiques

Les gènes *marA*, *marR*, *soxS* et *soxR* ont été inactivés par délétion selon la méthode de Datsenko et Wanner (51) chez une souche de *S.* Typhimurium du lysotype DT104 (S92/1495) dans le but de déterminer leur rôle respectif dans la multirésistance aux antibiotiques. Les CMI de l'acide nalidixique, l'enrofloxacine, la fluméquine, la ciprofloxacine et d'autres antibiotiques substrats des pompes RND tel que le chloramphénicol, florfénicol, tétracycline, ampicilline, érythromycine ont été déterminés. Nous n'avons trouvé dans cette étude aucune différence dans les CMI des quinolones et d'autres antibiotiques entre la souche parentale S92/1495 et les mutants S92/1495Δ*marR*::*kan*, S92/1495Δ*marR*, S92/1495Δ*marA*::*kan*, S92/1495Δ*soxR*::*kan* et S92/1495Δ*soxS*::*kan* (Tableau 6). Ces mutations n'ont donc aucun effet dans le phénotype de sensibilité aux antibiotiques. Nos résultats sont en accord avec ceux observés par Olliver. et al. (178) et par Piddock. et al. (191) où les auteurs ont montré l'absence de mutations dans les régions *marORA* et *soxRS* chez des souches de *S.* Typhimurium présentant différents niveaux de résistance aux antibiotiques et surexprimant la protéine AcrA.

Tableau 6. Sensibilité aux antibiotiques des mutants *marA*, *marR*, *soxR*, *soxS*

Souche	CMI µg/ml								
	Nal	Enr	Flu	Cip	Tri	Tc	Cm	Ff	Ery
S92/1495 (parentale)	4	0,030	0,5	0,015	0,125	1	4	4	200
S92/1495Δ*marR*::*kan*	4	0,030	0,5	0,015	0,125	1	4	4	200
S92/1495Δ*marR*	4	0,030	0,5	0,015	0,125	1	4	4	200
S92/1495Δ*marA*::*kan*	4	0,030	0,5	0,015	0,125	1	4	4	200
S92/1495Δ*soxR*::*kan*	4	0,030	0,5	0,015	0,125	1	4	4	200
S92/1495Δ*soxS*::*kan*	4	0,030	0,5	0,015	0,125	1	4	4	200

Nal: acide nalidixique, Enr: enrofloxacine, Flu : fluméquine, Cip: ciprofloxacine, Tri : triméthoprim, Tc: tetracycline, Cm: chloramphenicol, Ff: florfenicol, Ery : erythromycine.

L'ensemble de ces résultats suggère donc que les gènes *marA*, *marR*, *soxS* et *soxR* ne jouent aucun rôle dans la résistance aux quinolones au dans la multirésistance. Ceci suggère aussi qu'il existe un autre régulateur impliqué dans la régulation positive de *acrAB*, et dans le phénotype de multirésistance chez *Salmonella*.

2. Étude de l'opéron *ramRA*

2.1. Identification du répresseur (RamR) du gène *ramA*

L'analyse de séquence de la région en amont de *ramA* chez *S.* Typhimurium LT2 (numéro d'accès GenBank NC_003197), nous a permis pour la première fois d'identifier un nouveau gène appelé dans cette étude *ramR*. Un cadre de lecture de 582 pb est situé immédiatement en amont du gène *ramA* codant une protéine, RamR de 193 acides aminés, un répresseur homologue à TetR possédant un domaine H-T-H. De manière similaire aux répresseurs de la famille TetR, RamR est supposé réprimer la transcription de *ramA* et ainsi également sa propre transcription. Nous avons également identifié le promoteur putatif de l'opéron *ram* qui est situé dans la région intergénique *ramRA* (Figure 22).

2.2. Rôle dans la resistance intrinsèque aux antibiotiques

Afin de déterminer le rôle respectif de l'opéron *ramRA* dans la multirésistance, nous avons inactivé par délétion les gènes *ramA* et *ramR* par le méthode de Datsenko et Wanner comme précédemment décrit (51). Les mutants S92/1495Δ*ramA*::*kan* et S92/1495Δ*ramR*::*kan* ont été construits à partir de la souche *S.* Typhimurium du lysotype DT104 (S92/1495). Les CMI pour différents antibiotiques et quinolones ont été déterminées et les CMI de la souche parentale ont été comparées à celles du mutant dérivé. (Tableau 7).

Pour préciser le rôle de *ramA* dans la haut niveaux de resistance aux fluoroquinolones et autres antibiotiques, la mutation Δ*ramA*::*kan* a été introduite chez les souches *S.* Typhimurium répertoriées dans le tableau 3. Ces souches présententant haut niveau de résistance aux antibiotiques notamment les fluoroquinolones. Nous avons obtenu une diminution des valeurs de CMI des fluoroquinolones et d'autres antibiotiques d'une facteur 4 ou plus chez les transformants (Δ*ramA*::*kan*) par rapport aux souches du terrain (Tableau 7)

suggérant que le gène *ramA* joue un rôle dans cette resistance. De plus, l'inactivation du gène *ramR* entraînait une augmention de la CMI des fluoroquinolones et d'autres antibiotiques d'un facteur 2 au 4 (Tableau 7).

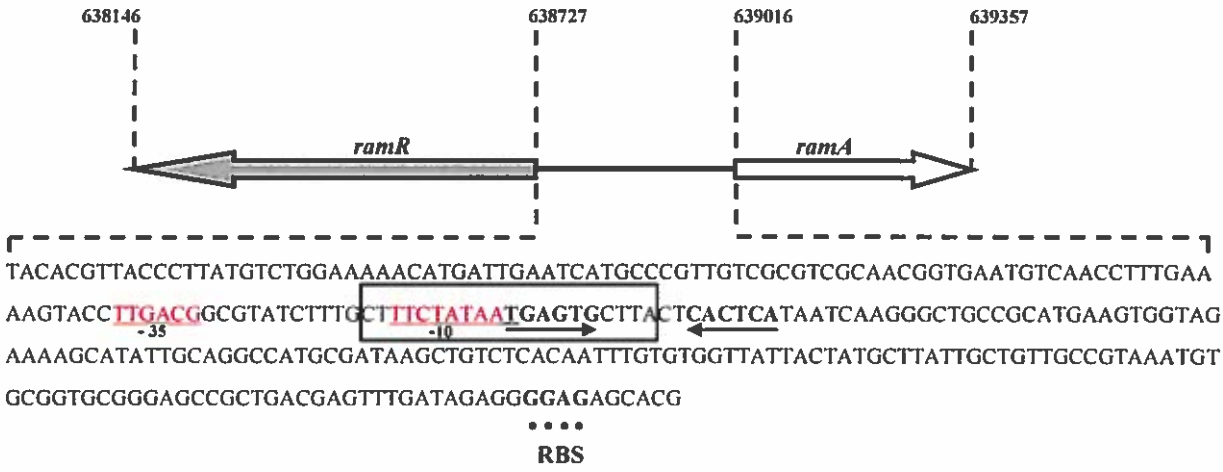


Figure 22. La région intergénique *ramRA* (promotrice) chez *S.* Typhimurium LT2. Les postions nucléotidiques sont indiquées d'après la séquence de la souche LT2. Les petites flèches indiquent la séquence répétée inversée (IR). Les boites putatif -35 et -10 sont représentées en rouge et le site de liaison au ribosome est représentée en pointillés (RBS) (117). La « *mar-box* » dans le sens backward est représentée en rectangle.

Ces résultats soulignent l'importance de l'opéron *ramRA* dans la multirésistance aux antibiotiques. Pour cela nous avons recherché la présence de mutations dans *ramR* et dans la région intergénique *ramRA* chez toutes les souches de terrain décrite dans le tableau 2.

Le gène *ramR* et la région intergénique *ramRA* ont été amplifiées par PCR puis les produits PCR ont été séquencés et les séquences nucléotidiques ont été analysées.

2.3. Identification de mutations dans *ramR* et la région intergénique (*ramRA*)

Chez la souche BN10055 une mutation ponctuelle dans la région intergénique (la séquence répétée inversée, IR) a été identifiée (Figure 23). Cette mutation peut empêcher la fixation du répresseur RamR, entraînant à une surexpression du *ramA*. Cette souche possédait aussi une mutation supplémentaire dans *gyrA* (22).

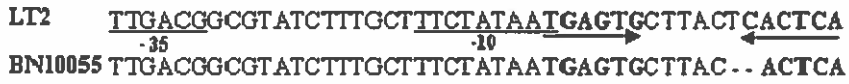


Figure 23. Mutation identifiée dans la région intergénique *ramRA*. La séquence répétée inversée, IR est représentée en gras et les boites -35 et -10 sont soulignées.

Chez les souches BN18/21, BN18/41 et BN18/71 une mutation dans le gene *ramR* a été identifiée conduisant au changement de l'acide aminé Thr18Pro (Figure 24). Ces souches dérivent toutes de la souche sensible BN18 (72) et ont été obtenues par sélection sur enrofloxacine (20). Le phénotype de résistance aux quinolones des ces souches a précédemment été attribué à mécanisme d'efflux, modules par la pompe AcrAB-TolC (74). Une mutation dans *gyrA* conduisant à la substitution de l'acide aminé Gly81Cys a été décrite chez ces trois souches mais cette mutation ne participe qu'en second lieu au phénotype résistance aux quinolones (74, 178). Par contre, une surproduction de la protéine périplasmique AcrA de la pompe AcrAB-TolC ainsi que des altérations dans les protéines de la membrane externe et dans le profil lipopolysaccharidique ont été décrits chez ces mutants (Tableau 3) (20, 74). Chez la souche BN18/71, nous avons identifié une mutation supplémentaire dans *ramR*, conduisant au changement de l'acide aminé Met84Ile (Figure 24). De plus, chez les souches BN18/41, BN18/71 une duplication des nucléotides 223 à 228 sur 6 pb a précédemment été décrite dans le gène *acrR*, conduisant à la duplication des acides aminés Ile75 et Glu76 (178).

Nous avons aussi identifié une mutation chez la souche BN9945, conduisant au changement de l'acide aminé Tyr59His (Figure 24). Cette souche résistante à l'acide nalidixique et de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones ne possède pas de mutation dans la région QRDRs « Quinolone Resistance Determining Region » (22) ou dans le gène *acrR* (178). Un mécanisme d'efflux par la pompe AcrAB a été mise en évidence chez cette souche (20). L'analyse d'expression de la protéine AcrA par Western blot révèle une surexpression de AcrA, malgré l'absence de mutation dans le gène *acrR* chez cette souche suggérant que la surexpression de AcrA est contrôlée par un régulateur autre que AcrR. Dans ce cas, la surexpression de AcrA est due à la mutation que nous avons identifiée dans le gène *ramR*. Ces résultats soulignent l'importance de la mutation dans le gène *ramR* dans la surexpression de la protéine AcrA et le phénotype de multirésistance.

Chez la souche 543SA98, une duplication de nucléotide C à la position 461 a été identifiée dans le gène *ramR* conduisant ainsi à un décalage du cadre de lecture et une apparition d'un codon stop prématuré (TGA) (Figure 24).

Nos résultats montrent que les mutations dans le gene *ramR* pourraient conduire à la production d'une protéine RamR non fonctionnelle ou moins actif, expliquant ainsi la surexpression de *ramA* et le phénotype de multirésistance des mutants *ramR*.

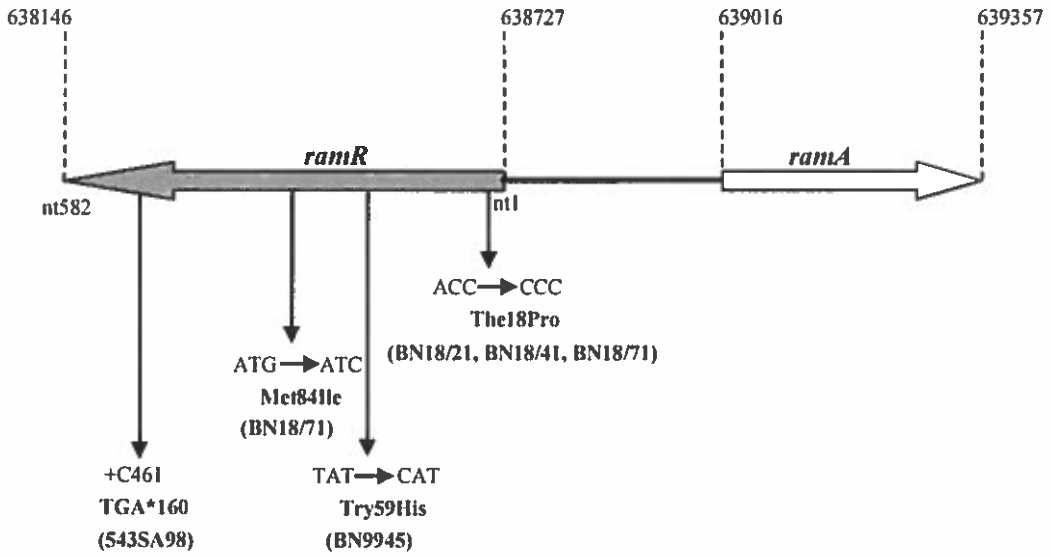


Figure 24. Mutations identifiées dans le gène *ramR* chez les souches BN18/21, BN18/41, BN18/71, BN9945 et 543SA98. Les positions nucléotidiques correspondant à celles de *S.* Typhimurium LT2 (numéro d'accès GenBank NC_003197).

Rôle de ramR dans la résistance aux antibiotiques

Nous nous sommes demandés si la présence de telles mutations dans *ramR* pouvait participer à la multirésistance aux antibiotiques. Pour cela des expériences de complémentation avec le gène sauvage issue de la souche S92/1495 ont été réalisées. La totalité du gène *ramR*, ainsi que la région intergénique *ramRA* incluant la région promotrice ont donc été clonés dans un plasmide à faible nombre de copies, le plasmide pBBR1MCS-2 (123). Les souches de terrain et les mutants complémentés ont en effet montré une diminution d'un facteur 4 ou plus dans leurs niveau de résistance à la fluméquine, l'enrofloxacine et la

ciprofloxacine (Tableau 7). L'allèle sauvage du gène *ramR* a donc bien permis de diminuer les niveaux de résistance à divers antibiotiques chez les souches complémentées (Tableau 7). En revanche, chez la souche BN10055 la mutation a été identifiée dans la région IR de fixation de RamR et donc la complémentation avec le gène sauvage n'a aucune effet sur la résistance aux antibiotiques. Chez les souches 902SA/92 et 102SA/00 le niveau de résistance à l'acide nalidixique et à la tétracycline n'a pas changée après la complémentation avec le gène sauvage *ramR*.

Rôle de ramR dans l'expression du gène ramA

Afin de déterminer la contribution de la mutation identifiée dans le gène *ramR* à la surexpression de *ramA*, le niveau de transcription du gène *ramA* a été estimé par des expériences de RT-PCR chez la souche parentale S92/1495, les mutants SA92/1495Δ*ramR*::*kan*, SA92/1495Δ*ramR* et le mutant complémenté SA92/1495Δ*ramR*pBR*ramR*1495. L'estimation du niveau de transcription a été faite sur gel d'agarose. La mesure de l'expression du gene *gyrB*, dont la transcription n'est pas affectée par les différents traitements infligés par cette technique, nous a servi de contrôle interne. En effet, la même intensité de bande correspondant à la transcription de *gyrB* a été retrouvée pour toutes les souches testées (Figure 25).

Une augmentation du niveau d'expression de *ramA* (d'un facture 4 à 5) a été observée chez les mutants S92/1495Δ*ramR*::*kan* et S92/1495Δ*ramR* par rapport à la souche parentale SA92/1495 et le mutant complémenté (S92/1495Δ*ramR* pBR*ramR*) (Figure 25).

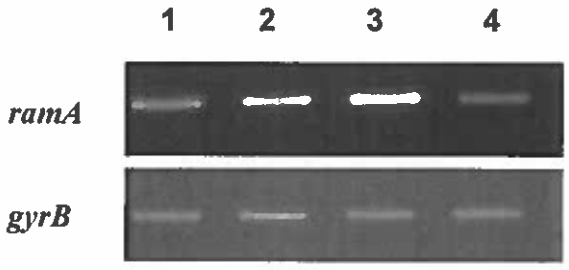


Figure 25. Transcription des gènes *ramA* et *gyrB* mesurée par RT-PCR. Sont représentées les souches SA92/1495(piste 1), SA92/1495Δ*ramR*::*Kan* (piste 2), SA92/1495Δ*ramR* (piste3) et SA92/1495Δ*ramR* pBR*ramR*1495 (piste 4).

De plus, l'analyse de la protéine périplasmique AcrA par Western blot révèle une augmentation de la production de la protéine AcrA (d'un facteur 4 à 6) chez touts les mutants *ramR*. Par exemple, le niveau de l'expression de la protéine AcrA chez les souches BN18/41 et BN18/71 étaient de 6 et 8 respectivement. En effet, cette augmentation du niveau d'expression de AcrA corrèle bien avec la surexpression du gène *ramA*, suggérant que RamA agit comme activateur de la pompe AcrAB-TolC et étant responsable à la phénotype de la multirésistance.

Nous avons obtenu une diminution de 4 à 5 fois du niveau de transcription de *ramA* chez les souches complémentés (niveau basal de transcription), suggérant que le transcription de *ramA* est bien contrôlée par *ramR*. Cette diminution du niveau de transcription de *ramA* corrèle bien avec le niveau d'expression de la protéine AcrA et encore avec la diminution du niveau de résistance observé chez les souches complémentes avec la copie sauvage du gène *ramR* vis à vis des antibiotiques testées.

2.4. Identification d'éléments *IS1* dans le gène *ramR*

La collection des souches décrite dans le tableau 2 a été criblée par PCR pour rechercher la présence d'une séquence insérée dans le gène *ramR* ou dans la région intergénique *ramRA*. La présence d'une telle séquence a été révèlée par une augmentation de la taille du produit PCR par rapport à celle attendue, à savoir 953bp selon la séquence de la souche *S.* Typhimurium LT2 (160). La région amplifiée ainsi que les résultats du criblage sont schématisés dans la figure 26.

La taille du produit PCR pour les souches 902SA92 et 102SA00 était plus élevée que celle attendue. Ainsi, des amplicons d'environ 1730 pb ont été retrouvés à la place des 953 attendue chez la souche *S.* Typhimurium LT2. Les produits PCR ont été séquencés pour identifier la nature de ces insertions. Une IS*1* insérée dans le gène *ramR* a aussi été identifiée chez les souches 902SA92 et 102SA00 (Figure 27). En effet, une analyse BLAST des séquences nucléotidiques obtenues a montré que l'IS *1* était 100% identique à l'IS*1* identifiée sur le chromosome de la souche *S.* Typhi CT18 (Genbank accession number NC_003198) (185).

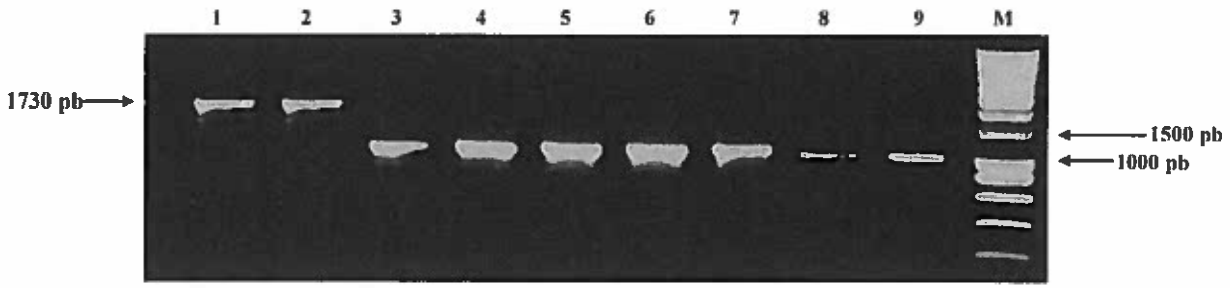


Figure 26. PCRs réalisées pour détecter la présence des modifications en amont de gène *ramR* et dans la région intergénique *ramRA*. Sont représentées les souches, *S.* Typhimurium DT204 902SA92 et 102SA00 (pistes1-2). Les pistes 3-7 représentées les souches *S.* Typhimurium DT104. Des produits PCR de taille plus élevée que celle attendue chez la souche parentale ont été retrouvés chez les souches 902SA92 et 102SA00.

Chez la souche 902SA92, une séquence IS*1* de 768 bp est insérée dans le gène *ramR* à la position 638717 par rapport à la séquence de la souche LT2, interrompant le gène *ramR*. L'IS*1* porte deux phases ouvertes de lecture, *insA* et *insB*; et contient aussi deux séquences répétées inversées "imparfaites" de 23pb (IRR and IRL) à chaque extrémité. Son insertion s'accompagne d'une duplication de 9 pb de la séquence cible CACTCTTCG (110, 175) (Figure 27). Les deux extrémités de l'IS*1* portent chacune une boîte -35 vers l'extérieur qui permet la transcription des gènes *insA* et *insB* (148). Chez la souche 102SA00, le même type de séquence IS*1* a été retrouvé insérée à la même position comme celle à la souche 902SA92 mais elle est de 770 bp et porte une mutation dans le gène *insA*. La présence d'IS de type IS*1* et IS*10* a précédemment été montrée chez ces souches de lysotype DT204 (177).

L'insertion d'une IS*1* dans le gène *ramR* codant pour le répresseur du gène *ramA* peut donc expliquer la surexpression de *ramA* et du phénotype de multirésistance chez les souches 102SA00 et 902SA92. De la même façon, il a été montré que l'insertion de l'élément IS*21* dans le gène *mexR* codant pour le répresseur de la pompe d'efflux MexAB-OprM de *P.aeruginosa* pouvait augmenter la résistance aux β-lactamines via l'augmentation de l'expression de cette pompe (27). L'intégration de séquences d'insertion dans la région immédiatement en amont de *acrEF* a été décrit chez *E. coli* et *S.* Typhimurium, conduisant à la surexpression de la pompe et du phénotype de multirésistance (107, 118).

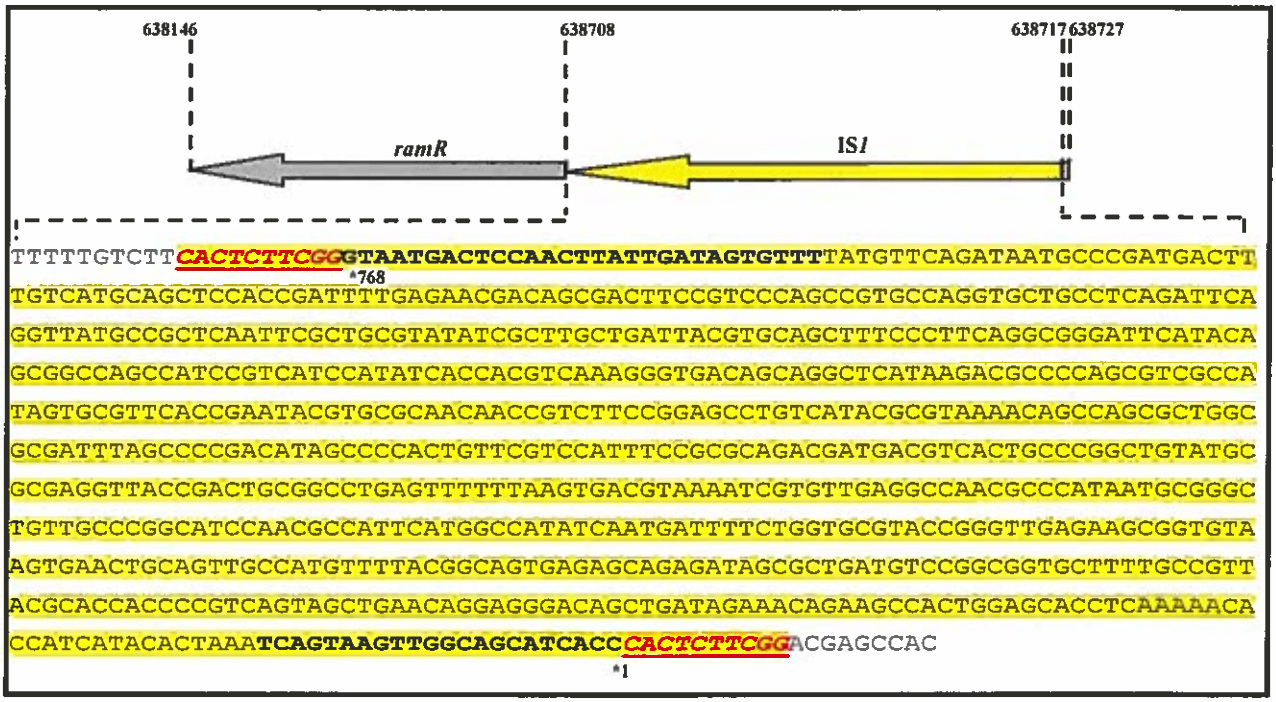


Figure 27, Le gène *ramR* chez les souches 902SA92 et 102SA00. Une IS*1* représentée sur fond jaune est insérée dans le gène *ramR*. Les postions nucléotidiques des IS*1* sont indiquées par une étoile. L'IS*1* porte 2 séquences répétées inversées "imparfaite" d'environ 23 pb représentée en gras. Son insertion s'accompagne d'une duplication de la séquence cible sur 9 pb, représentée en italique rouge.

Un alignement à l'aide du programme ClustalW montre que la protéine RamR présente 64% d'homologie avec TetR (Genbank accession number AP005147.1). Ces deux protéines possèdent un domaine H-T-H de liaison à l'ADN caractéristique de la famille de répresseurs transcriptionnels de type TetR (Figure 28).

TetR KSKVINSALELLNEV-GIEGLTTRKLAQKLGVE**QPTLYWH**VKN**K**RALL
RamR KQALLEAATQAIAQSGIAASTAVIARNAGVA--**EGTLFRY**FAT-KDELI

Figure 28. Alignement de acides aminées séquences de TetR et RamR. Les α hélices des H-T-H sont soulignés, la séquence conservée représentée en gras (203).

L'ensemble de ces résultats montre que (i) RamR agit comme répresseur du gène *ramA* (ii) l'opéron *ramRA* est fortement impliqué dans la régulation de l'expression de la pompe AcrAB chez *S.* Typhimurium et aussi dans la multirésistance. Nos résultats sont en accord avec ceux d'autres études effectuées chez *K. pneumoniae*, *E. aerogenes* et *S.* Paratyphi B montrant que le gène *ramA* est impliqué dans la résistance aux quinolones et dans la multirésistance aux antibiotiques (41, 70, 210, 259).

Tableau 7. Niveaux de résistance aux antibiotiques des mutants et des souches complémentées

Souche	CMI* (µg/ml) de quinolones				CMI (µg/ml) des autres antibiotiques			**WB
	Nal	Flu	Enr	Cip	Cm	Ff	Tc	AcrA/ratio
902SA92	>4096	2048	64	32	1024	16	256	4
902SA92pBR*ramR*	4096	512	16	8	256	4	256	1
902SA92Δ*ramA*::kan	4096	512	16	8	256	4	256	1
102SA00	>4096	2048	64	32	512	16	256	4
102SA00pBR*ramR*	4096	512	16	8	256	4	256	1
102SA00Δ*ramA*::kan	4096	512	16	8	256	4	256	1
BN10055	>4096	64	2	1	1024	128	256	4
BN10055pBR*ramR*	>4096	64	2	1	1024	128	256	4
BN10055Δ*ramA*::kan	512	16	0.5	0.25	128	32	64	1
543SA98	1024	32	2	0.5	512	512	128	4
543SA98pBR*ramR*	512	8	0.5	0.125	128	128	32	1
543SA98Δ*ramA*::kan	512	8	0.5	0.125	128	128	32	1
BN9945	1024	32	1	0.5	512	128	128	2
BN9945pBR*ramR*	512	8	0.25	0.125	128	64	32	1
BN9945Δ*ramA*::kan	512	8	0.25	0.125	128	64	32	1
BN9181	4	0.5	0.030	0.015	128	32	32	1
BN9181pBR*ramR*	4	0.5	0.030	0.015	128	32	32	1
BN9181Δ*ramA*::kan	4	0.5	0.015	0.0075	128	32	32	1
SA/921495	4	0.5	0.030	0.015	4	4	1	1
SA/921495Δ*ramR*::kan	16	2	0.125	0.060	16	16	4	4
SA/921495Δ*ramR*	16	2	0.125	0.060	16	16	4	4
SA/921495Δ*ramR*RpBR*ramR*	4	0.5	0.030	0.015	4	4	1	1
SA/921495Δ*ramA*::kan	4	0.5	0.030	0.015	4	4	1	1
BN18	4	0.5	0.030	0.015	4	4	1	1
BN18BpR*ramR*	4	0.5	0.030	0.015	4	4	1	1
BN18Δ*ramA*::kan	4	0.5	0.030	0.015	4	2	1	1
BN18/21	64	64	0.5	0.015	16	16	4	4
BN18/21pBR*ramR*	8	8	0.125	0.060	4	4	1	1
BN18/21Δ*ramA*::kan	8	8	0.125	0.060	4	4	1	1
BN18/41	>4096	256	4	2	32	64	8	6
BN18/41pBR*ramR*	4096	64	2	0.5	16	8	2	1
BN18/41Δ*ramA*::kan	4096	64	2	0.5	16	8	2	1
BN18/71	>4096	512	16	8	64	64	16	8
BN18/71pBR*ramR*	4096	256	4	2	16	8	2	1
BN18/71Δ*ramA*::kan	4096	256	4	2	16	8	2	1

*CMI de l'acide nalidixque (Nal), flumeequine (Flu), enrofloxacine (Enr), ciprofloxacine (Cip), chloramphénicol (Cm), florfénicol (Ff) et tétracycline (Tc).
**WB (Western-blot) à l'aide d'un anticorps polyclonal anti-AcrA.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

L'utilisation des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire favorise l'émergence de souches bactériennes résistantes à ces molécules. Les infections aux salmonelles non typhoïdes ne nécessitent un traitement antibiotique que chez les patients fragilisés (enfants, personnes âgées ou immunodéprimées) ou dans la cas d'infections sévères. Ces dernières années, nous avons constaté une augmentation de la résistance aux antibiotiques chez les salmonelles non typhoïdes ce qui pose un problème mondial de santé publique.

L'implication des systèmes d'efflux dans la résistance aux antibiotiques des bactéries est de plus en plus décrite. En effet ces systèmes sont, dans la majorité des cas, capables de transporter une large gamme de molécules différentes et sont le plus souvent impliqués dans la multirésistance aux antibiotiques. La résistance par efflux aux antibiotiques survient suite à l'apparition de mutations dans les régulateurs des systèmes d'efflux. Chez *E coli*, un phénotype de multirésistance à divers antibiotiques (MAR) est souvent lié à la surexpression de la pompe AcrAB-TolC. Cette surexpression de la pompe est due à des mutations dans les gènes codant pour des régulateurs globaux tels que *marRAB*, *soxRS* (5, 14, 115, 120, 122, 140, 146, 171, 173, 176, 253, 258), ainsi que dans le gène codant pour le régulateur local de la pompe AcrAB-TolC, *acrR* (107, 120, 251, 253).

Il a également été montré que l'opéron *marRAB* présent chez *S.* Typhimurium est homologue à celui de *E coli* (235). De plus, un rôle primordial de la pompe AcrAB-TolC a effectivement été décrit dans la multirésistance aux antibiotiques et aux quinolones chez *S.* Typhimurium (22, 74, 191). Des mutations fréquemment décrites dans l'opéron *mar* de *E.coli* n'ont, jusqu'à présent, pas été retrouvées chez *Salmonella* (178, 191). Toutefois, peu d'information existe sur le rôle des opérons *mar* et *sox* dans la multirésistance chez *Salmonella*. L'objectif de ce travail était de rechercher le rôle des opérons *mar* et *sox* dans la multirésistance aux antibiotiques ainsi que dans la résistance aux quinolones chez *S.* Typhimurium.

1. Rôle des opérons *mar* et *sox* dans la multirésistance aux antibiotiques chez *S.* Typhimurium

Ce travail nous a permis de mettre en évidence que l'inactivation de *marRA*, ou *soxRS* n'a aucun effet dans le phénotype de résistance de *S.* Typhimurium DT104, suggérant que ces régions ne participent pas dans l'acquisition d'un phénotype de résistance, ou encore dans la régulation de la pompe AcrAB-TolC, contrairement à ce qui a été montré chez *E. coli.* Cependant, l'échec des différentes tentatives pour identifier des mutations dans l'opéron *mar* chez *S.* Typhimurium résistante à la ciprofloxacine, due à une surexpression d'efflux actif, est concordant avec nos résultats (36, 88, 191). Récemment, une étude d'Olliver et al. a également montré l'absence de mutations dans les régions *marRA* et *soxRS* chez des mutants de *S.* Typhimurium obtenus *in vitro* et chez des souches de *S.* Typhimurium hautement résistantes aux quinolones (178). En revanche, une étude de Eaves et al. a montré une augmentation du niveau d'expression du gène *marA* chez trois isolats de *S.* Typhimurium alors que, le niveau d'expression du gène *soxS* restait inchangé (55). Jusqu'à présent, une seule étude a établi une corrélation entre la résistance aux quinolones d'un isolat clinique de *S.* Typhimurium et une mutation dans *soxR* conduisant à l'expression constitutive de *soxRS* alors que, le niveau d'expression de *marRA* restait inchangé (122).

L'ensemble de ces résultats nous permet d'affirmer que les opérons *mar* et *sox* ne participent pas à la multirésistance aux antibiotiques chez *S.* Typhimurium. Le phénotype de multirésistance observée chez cette bactérie est donc indépendant de *mar* ou *sox*.

2. Identification d'un nouveau gène *ramR* chez *S.* Typhimurium

Bien qu'il a précédemment été décrit que la surexpression de RamA est bien corrélée avec le niveau de résistance aux antibiotiques, les mécanismes conduisant à sa surexpression restent à élucider. Nous avons recherché la cause conduisant à la surexpression de RamA et donc entraînant une activation de l'expression la pompe AcrAB-TolC ainsi que une augmentation du niveau de résistance aux antibiotiques.

Le séquençage de la région en amont de *ramA* chez les souches de *S.* Typhimurium DT104 et DT204 présentant différents niveaux de résistance aux antibiotiques, nous a permis d'identifier pour la première fois un nouveau gène que nous l'avons dénommé *ramR*. Ce gène est situé immédiatement en amont de *ramA* sur le chromosome de *S.* Typhimurium LT2 et code une protéine régulatrice RamR de 193 acides aminés. RamR est une protéine homologue à TetR et posséde un domaine H-T-H. De manière similaire aux répresseurs de la famille TetR, RamR est supposé réprimer la transcription de *ramA* et ainsi également sa propre transcription.

Afin de déterminer le rôle de cette protéine dans la régulation du gène *ramA* responsable de la multirésistance aux antibiotiques, le gène *ramR* a été inactivé chez la souche S92/1495 de *S.* Typhimurium du lysotype DT104 sensible aux antibiotiques. Nous avons mis en évidence que l'inactivation du gène *ramR* conduit à une augmentation significative de la CMI des quinolones et d'autres antibiotiques. Lors des expériences RT-PCR, nous avons également pu mettre en évidence une augmentation de niveau d'expression du gène *ramA* chez le mutant *ramR* et un diminution de niveau d'expression du gène *ramA* chez la souche complémenté avec l'allèle sauvage du gène *ramR*. Ceci suggère que l'expression du gène *ramA* est bien contrôleé par le répresseur RamR.

Nous nous sommes donc demandés si la présence de mutations dans le gène *ramR* ou dans la région intergénique *ramRA* chez des souches de *S.* Typhimurium hautement résistantes aux antibiotiques pouvaient rendre compte de ce phénotype de résistances, et donc la surexpression du gène *ramA*. Nous avons identifié une mutation dans le gène *ramR* chez les souches BN18/21, BN18/41 et BN18/71, conférant le changement de l'acide aminé, T en P, à la position 18 et une mutation supplémentaire conduisant au changement de l'acide aminé M en I, à la position 84 chez la souche BN18/71. Ces souches dérivent toutes de la souche sensible BN18 (72). Il a précédemment été décrit que le phénotype de multirésistance aux antibiotiques des ces souches est modulé principalement par la pompe AcrAB-TolC, avant d'impliquer des mutations dans le gène *gyrA* (74). La mutation dans le gène *gyrA* n'explique pas à elle seule les niveaux de résistance aux quinolones. De plus, aucune mutation n'a été identifiée dans la région QRDR des gènes *gyrB*, *parC* et *parE* (20, 72, 74). Une mutation dans le gène *acrR* conduisant à la duplication des de l'acide aminé Ile75 et Glu76 a précédemment été décrit chez les souches BN18/41et BN18/71(178). Alors qu'aucune mutation n'a été observée dans le gene *acrR* chez la souche BN18/21. Par contre, l'analyse de l'expression de

la protéine AcrA a montré une augmentation de 4 à 8 fois d'expression de cette protéine. Une étude précédente chez *E. coli* a montrée que le gène *acrR* était un modulateur secondaire de l'expression de AcrAB (145). Une autre étude de Piddock et al. en 2000 a montré l'absence de mutations dans *acrR* chez des souches multirésistantes de *S.* Typhimurium et surexprimant la pompe AcrAB (191). Ceci indique probablement que la mutation que nous avons identifiée dans le gène *ramR* est seule responsable de la surexpression de la pompe AcrAB, malgré la modification dans le gène *acrR*. Ces mutants ont en effet montrés une diminution important de niveau d'expression de AcrA (d'un facteur 4 à 8) après avoir été complémentés avec le gène *ramR* sauvage. Cette diminution de lexpression de AcrA est corrélée avec le niveau de résistance aux antibiotiques. Ces résultats soulignent l'importance de la mutation dans *ramR* et donc le phénotype de multirésistance chez les souches BN18/21, BN18/41 et BN18/71.

La souche BN9945 présente un haut niveau de resistance à l'acide nalidixique et de sensibilité diminuée aux fluoroquinolones et ne porte pas de mutations dans les gènes cibles (22) suggérant l'implication du mécanisme d'efflux. Cette souche surexprimé en effet la protéine AcrA malgré l'absence de mutations dans le gène *AcrR* suggérant que la mutation dans *ramR* était responsable de la surexpression de AcrA et de la multirésistance chez cette souche.

La délétion de deux nucléotides dans la région de fixation du répresseur IR chez la souche 10055 entraîne probablement une diminution de l'affinité de RamR. De manière attendue, la transformation avec plasmide portant une copie du gène *ramR* n'a eu aucun effet sur la phénotype de résistance aux antibiotiques.

L'implication d'éléments IS dans la surexpression de pompe d'efflux et dans le phénotype de multirésistance aux antibiotiques qui en découle a déjà été décrite chez plusieurs bactéries. Ainsi, l'insertion d'une IS*186* dans *acrR* chez *E.coli* (107) et d'une IS*1* ou IS*2* en amont de *acrEF* chez *E.coli* (118). Chez les souches 902SA92 et 102SA00, l'insertion d'une IS*1* dans le gène *ramR* conduit à une augmentation de l'expression de *ramA*. L'insertion d'une IS*1* et IS*10* en amont de *acrEF* a précèdent été décrite chez ces souches (177). Ces souches présentent un haut niveau de résistance aux fluoroquinolones. Ces souches portent des mutations dans les gènes cibles *gyrA*, *gyrB* et *parC* (20). Il a été mis en évidence que ces mutations ne sont pas seules responsables du haut niveau de résistance, le mécanisme d'efflux actif avec le système AcrAB-TolC a aussi été impliquée dans cette résistance (20).

3. Implication de l'opéron *ramRA* dans la multirésistance aux antibiotiques

Dans ce travail, des clones présentant de hauts niveaux de résistance aux quinolones et à d'autres familles d'antibiotiques ont été étudiés. Ces souches surexpriment la protéine AcrA malgré l'absence de mutations dans les opérons *mar* et *sox,* et dans le gène *acrR* dans la majorité des cas (Tableau 3) (22, 178). L'inactivation du gènes *acrB* ou *tolC* et l'utilisation de l'inhibiteur d'efflux Phe-Arg-β-naphthylamide (PAβN) chez ces souches diminuait les niveaux de résistance aux fluoroquinolones (22, 71). Ceci suggère que l'efflux actif était fortement impliqué dans cette résistance. Une autre étude a montré que le transporteur AcrB jouait également un rôle dans les hauts niveaux de résistance aux fluoroquinolones chez des souches de *S.* Typhimurium DT204 portant de mutations multiples dans *gyrA*, *gyrB* et *parC* ainsi que dans les gènes associés aux systèmes d'efflux et à la perméabilité membranaire (20). Ceci explique que le haut niveau de résistance aux fluoroquinolones chez *Salmonella* est le résultat de la coexistence des deux mécanismes qui sont les modifications des cibles GyrA, GyrB, ParC, ParE et l'efflux actif. Néanmoins, certaines souches étudiées ne portent pas de mutations dans les gènes *gyrA*, *gyrB* et *parC* codant pour les enzymes cibles des fluoroquinolones. Dans cette optique, notre hypothèse était qu'il existait un régulateur potentiel autre que *mar* et *sox* de la pompe AcrAB et impliqué dans la multirésistance aux antibiotiques chez *S.* Typhimurium DT104 et DT204.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence que l'inactivation du gène *ramA* conduit à une diminution d'un facteur 4 ou plus des CMI des fluoroquinolones, de l'acide nalidixique, et d'autres antibiotiques substrats des pompes RND tels que le florfénicol, la chloramphénicol, le tétracycline et l'ampicilline chez les souches de *S.* Typhimurium DT104 et DT204 hautement résistantes aux antibiotiques (Tableau 7). En effet, ce phénotype de multirésistance était Partiellement lié à la surexpression de la pompe AcrAB-TolC (22, 74). Nos résultats suggèrent que le gène *ramA* est fortement impliqué dans l'acquisition d'un phénotype de multirésistance aux antibiotiques via l'activation de l'expression de la pompe AcrAB-TolC chez les souches étudiées.

L'implication du gène *ramA* dans la multirésistance aux antibiotiques via l'activation de l'expression de la pompe AcrAB-TolC a déjà été décrite chez *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, *S.* Paratyphi B (*rma*) et plus récemment, chez *S.* Typhimurium(41, 70, 248, 259). La surexpression de la protéine RamA, un activateur transcriptionnel homologue à MarA,

induit une augmentation de l'expression de la pompe AcrAB-TolC ainsi qu'une diminution de l'expression de la porine OmpF conduisant à un phénotype de multirésistance à divers antibiotiques (41). Une étude chez *S.* Typhimurium a montré que la protéine RamA présente 52% d'homologie avec MarA et les deux contiennent un domaine H-T-H de liaison à l'ADN (248). Ces deux protéines se fixent sur des séquences répétées inversées dégénérées de leur propre promoteur. Cette séquence, appelée *mar/rob/sox-box* est située à proximité du promoteur (155), suggérant que ces protéines peuvent réguler les mêmes gènes (41). Dans cette étude, nous avons identifié une « *mar-box* » putative en amont du gène *ramA* qui est orienté dans le sens «backward » c'est-à-dire la protéine RamA est fixée en sens opposé. Une « *mar-box* » d'orientation «backward» a également été décrite en amont du gène *ramA* de *E. aerogenes* (41). Des études ont décrit la présence de « *mar-box* » en amont des gènes régulés par *mar*, *sox* et *rob* (80, 136). Il a été démontré chez *S.* Paratyphi B et *E. aerogenes* que (Rma) RamA et MarA pourraient réguler la transcription de *ramA* conférant probablement un faible niveau de résistance à divers antibiotiques. De plus, ces mécanismes de résistance pourraient être mar-dépendent où RamA se fixe à *mar/sox* ou mar-indépendent en absence de locus *mar* (41, 259).

En conclusion, la surexpression du système d'efflux AcrAB semble être due essentiellement à des mutations dans le gène régulateur *ramR* qui induisent, par dé-répression, la surexpression de *ramA*, laquelle va activer l'expression de *acrAB*.

CONCLUSION

CONCLUSION

Les systèmes d'efflux multidrogue permettent à la bactérie de rejeter toute une série de composés toxiques, dont les antibiotiques dans le milieu extérieur. Toute les bactéries, sensibles comme résistantes aux antibiotiques, possèdent des pompes à efflux. L'expression des pompes d'efflux confère un faible niveau de resistance aux antibiotiques. L'acquisition d'une résistance aux antibiotiques par un mutant d'efflux, est due à une surexpression de la pompe, ou due d'une mutation dans le gène codant le transporteur permettant un meilleur transport des antibiotiques. L'implication des opérons *mar* et *sox* dans l'activation de l'expression de la pompe AcrAB-TolC et donc à une phénotype de multirésistance n'a pas pu être mise en évidence chez *S.* Typhimurium. De nombreux rapports ont lié la surexpression de *ramA* à l'activation de l'expression de la pompe AcrAB et une acquisition d'une multirésistance. Nous avons également mise en évidence que *ramA* joue un rôle important dans l'activation de l'expression de *acrAB*. Nous avons identifié le répresseur du gène *ramA*, RamR, appartenant à la famille TetR. Il est donc impliqué indirectement dans la régulation de la pompe AcrAB. Il serait intéressant d'étudier en plus détail le rôle de l'opéron *ramRA* dans la régulation de la pompe AcrAB et d'autres pompes d'efflux. Il est important aussi de rechercher le mécanisme capable d'induire l'opéron *ramRA*.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Acar, J. F., and F. W. Goldstein.** 1997. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. Clin Infect Dis **24 Suppl 1**:S67-73.
2. **Ahmer, B. M.** 2004. Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. Mol Microbiol **52**:933-45.
3. **Alekshun, M. N., and S. B. Levy.** 1999. Alteration of the repressor activity of MarR, the negative regulator of the *Escherichia coli marRAB* locus, by multiple chemicals in vitro. J Bacteriol **181**:4669-72.
4. **Alekshun, M. N., and S. B. Levy.** 1999. The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. Trends Microbiol **7**:410-3.
5. **Alekshun, M. N., and S. B. Levy.** 1997. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon. Antimicrob Agents Chemother **41**:2067-75.
6. **Alekshun, M. N., S. B. Levy, T. R. Mealy, B. A. Seaton, and J. F. Head.** 2001. The crystal structure of MarR, a regulator of multiple antibiotic resistance, at 2.3 A resolution. Nat Struct Biol **8**:710-4.
7. **Andersen, C., C. Hughes, and V. Koronakis.** 2000. Chunnel vision. Export and efflux through bacterial channel-tunnels. EMBO Rep **1**:313-8.
8. **Andersen, C., C. Hughes, and V. Koronakis.** 2002. Electrophysiological behavior of the TolC channel-tunnel in planar lipid bilayers. J Membr Biol **185**:83-92.
9. **Andersen, C., E. Koronakis, E. Bokma, J. Eswaran, D. Humphreys, C. Hughes, and V. Koronakis.** 2002. Transition to the open state of the TolC periplasmic tunnel entrance. Proc Natl Acad Sci U S A **99**:11103-8.
10. **Andersen, C., E. Koronakis, C. Hughes, and V. Koronakis.** 2002. An aspartate ring at the TolC tunnel entrance determines ion selectivity and presents a target for blocking by large cations. Mol Microbiol **44**:1131-9.
11. **Andersson, M. I., and A. P. MacGowan.** 2003. Development of the quinolones. J Antimicrob Chemother **51 Suppl 1**:1-11.
12. **Arcangioli, M. A., S. Leroy-Setrin, J. L. Martel, and E. Chaslus-Dancla.** 1999. A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella Typhimurium* DT104. FEMS Microbiol Lett **174**:327-32.
13. **Ariza, R. R., Z. Li, N. Ringstad, and B. Demple.** 1995. Activation of multiple antibiotic resistance and binding of stress-inducible promoters by *Escherichia coli* Rob protein. J Bacteriol **177**:1655-61.
14. **Asako, H., H. Nakajima, K. Kobayashi, M. Kobayashi, and R. Aono.** 1997. Organic solvent tolerance and antibiotic resistance increased by overexpression of *marA* in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol **63**:1428-33.
15. **Asperilla, M. O., R. A. Smego, Jr., and L. K. Scott.** 1990. Quinolone antibiotics in the treatment of *Salmonella* infections. Rev Infect Dis **12**:873-89.
16. **Avila-Sakar, A. J., S. Misaghi, E. M. Wilson-Kubalek, K. H. Downing, H. Zgurskaya, H. Nikaido, and E. Nogales.** 2001. Lipid-layer crystallization and preliminary three-dimensional structural analysis of AcrA, the periplasmic component of a bacterial multidrug efflux pump. J Struct Biol **136**:81-8.
17. **Bager, F., and R. Helmuth.** 2001. Epidemiology of resistance to quinolones in *Salmonella*. Vet Res **32**:285-90.
18. **Ball, P.** 2003. Adverse drug reactions: implications for the development of fluoroquinolones. J Antimicrob Chemother **51 Suppl 1**:21-7.

19. **Barbosa, T. M., and S. B. Levy.** 2000. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. J Bacteriol **182:**3467-74.
20. **Baucheron, S., H. Imberechts, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert.** 2002. The AcrB multidrug transporter plays a major role in high-level fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage type DT204. Microb Drug Resist **8:**281-9.
21. **Baucheron, S., C. Mouline, K. Praud, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert.** 2005. TolC but not AcrB is essential for multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium colonization of chicks. J Antimicrob Chemother **55:**707-12.
22. **Baucheron, S., S. Tyler, D. Boyd, M. R. Mulvey, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert.** 2004. AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. Antimicrob Agents Chemother **48:**3729-35.
23. **Belyaeva, T. A., J. T. Wade, C. L. Webster, V. J. Howard, M. S. Thomas, E. I. Hyde, and S. J. Busby.** 2000. Transcription activation at the *Escherichia coli* melAB promoter: the role of MelR and the cyclic AMP receptor protein. Mol Microbiol **36:**211-22.
24. **Besser, T. E., M. Goldoft, L. C. Pritchett, R. Khakhria, D. D. Hancock, D. H. Rice, J. M. Gay, W. Johnson, and C. C. Gay.** 2000. Multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 infections of humans and domestic animals in the Pacific Northwest of the United States. Epidemiol Infect **124:**193-200.
25. **Borges-Walmsley, M. I., D. Du, K. S. McKeegan, G. J. Sharples, and A. R. Walmsley.** 2005. VceR regulates the vceCAB drug efflux pump operon of Vibrio cholerae by alternating between mutually exclusive conformations that bind either drugs or promoter DNA. J Mol Biol **349:**387-400.
26. **Borges-Walmsley, M. I., K. S. McKeegan, and A. R. Walmsley.** 2003. Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs. Biochem J **376:**313-38.
27. **Boutoille, D., S. Corvec, N. Caroff, C. Giraudeau, E. Espaze, J. Caillon, P. Plesiat, and A. Reynaud.** 2004. Detection of an IS*21* insertion sequence in the *mexR* gene of *Pseudomonas aeruginosa* increasing beta-lactam resistance. FEMS Microbiol Lett **230:**143-6.
28. **Bouvet, P., and P. Grimont.** Données de surveillance 1999 du Centre National de Référence des *Salmonella* et des *Shigella*, France. Bulletin épidémiologique hebdomadaire, 2001; N°12.
29. **Bouvet, P., and P. Grimont.** Données de surveillance du Centre National de Référence des *Salmonella* et des *Shigella*, France, 2000. Zoonoses alimentaires, Institut National de Veille Sanitaire.
30. **Boyd, D., G. A. Peters, A. Cloeckaert, K. S. Boumedine, E. Chaslus-Dancla, H. Imberechts, and M. R. Mulvey.** 2001. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. J Bacteriol **183:**5725-32.
31. **Braibant, M., J. Chevalier, E. Chaslus-Dancla, J. M. Pages, and A. Cloeckaert.** 2005. Structural and functional study of the phenicol-specific efflux pump FloR belonging to the major facilitator superfamily. Antimicrob Agents Chemother **49:**2965-71.
32. **Brennan, R. G., and B. W. Matthews.** 1989. The helix-turn-helix DNA binding motif. J Biol Chem **264:**1903-6.

33. **Brenner, F. W., R. G. Villar, F. J. Angulo, R. Tauxe, and B. Swaminathan.** 2000. *Salmonella* nomenclature. J Clin Microbiol **38:**2465-7.
34. **Bush, K.** 1997. Antimicrobial agents. Curr Opin Chem Biol **1:**169-75.
35. **Carattoli, A.** 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. Vet Res **32:**243-59.
36. **Casin, I., J. Breuil, J. P. Darchis, C. Guelpa, and E. Collatz.** 2003. Fluoroquinolone resistance linked to GyrA, GyrB, and ParC mutations in *Salmonella enterica* typhimurium isolates in humans. Emerg Infect Dis **9:**1455-7.
37. **Centre hospitalier de la Pitié-Salpêtrière, Université Paris 6.** Entérobactéries et autres bacilles à gram négatif non exigeants, Ressources d'enseignements, site internet : "http://www.chups.jussieu.fr/polys/bacterio/bacterio/POLY.Chp.7.1.2.html".
38. **Chan, Y. Y., and K. L. Chua.** 2005. The Burkholderia pseudomallei BpeAB-OprB efflux pump: expression and impact on quorum sensing and virulence. J Bacteriol **187:**4707-19.
39. **Chandler, M., and J. Mahillon.** 2002. Insertion sequences revisited, p 305-366. *In* N. L. Craig, R. Graigie, M. Gellert, and A. M. Lambowitz (ed.), Mobile DNA II. American Society for Microbiology, Washington D.C.
40. **Chiu, C. H., L. H. Su, and C. Chu.** 2004. *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. Clin Microbiol Rev **17:**311-22.
41. **Chollet, R., J. Chevalier, C. Bollet, J. M. Pages, and A. Davin-Regli.** 2004. RamA is an alternate activator of the multidrug resistance cascade in *Enterobacter aerogenes*. Antimicrob Agents Chemother **48:**2518-23.
42. **Chou, J. H., J. T. Greenberg, and B. Demple.** 1993. Posttranscriptional repression of *Escherichia coli* OmpF protein in response to redox stress: positive control of the *micF* antisense RNA by the *soxRS* locus. J Bacteriol **175:**1026-31.
43. **Ciampi, M. S., M. B. Schmid, and J. R. Roth.** 1982. Transposon Tn*10* provides a promoter for transcription of adjacent sequences. Proc Natl Acad Sci U S A **79:**5016-20.
44. **Cloeckaert, A., and E. Chaslus-Dancla.** 2001. Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella*. Vet Res **32:**291-300.
45. **Cloeckaert, A., and S. Schwarz.** 2001. Molecular characterization, spread and evolution of multidrug resistance in *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. Vet Res **32:**301-10.
46. **Cohen, S. P., S. B. Levy, J. Foulds, and J. L. Rosner.** 1993. Salicylate induction of antibiotic resistance in *Escherichia coli*: activation of the *mar* operon and a *mar*-independent pathway. J Bacteriol **175:**7856-62.
47. **Cohen, S. P., W. Yan, and S. B. Levy.** 1993. A multidrug resistance regulatory chromosomal locus is widespread among enteric bacteria. J Infect Dis **168:**484-8.
48. **Comite de l'Antibiogramme de la Sociéte Francaise de Microbiologie.** 2003. Int. J. Antimicrob Agents **21:**364-91.
49. **Connell, S. R., D. M. Tracz, K. H. Nierhaus, and D. E. Taylor.** 2003. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. Antimicrob Agents Chemother **47:**3675-81.
50. **Dangi, B., A. M. Gronenborn, J. L. Rosner, and R. G. Martin.** 2004. Versatility of the carboxy-terminal domain of the alpha subunit of RNA polymerase in transcriptional activation: use of the DNA contact site as a protein contact site for MarA. Mol Microbiol **54:**45-59.

51. **Datsenko, K. A., and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A **97:**6640-5.
52. **Davis, M. A., D. D. Hancock, T. E. Besser, D. H. Rice, J. M. Gay, C. Gay, L. Gearhart, and R. DiGiacomo.** 1999. Changes in antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* Serovar typhimurium isolates from humans and cattle in the Northwestern United States, 1982-1997. Emerg Infect Dis **5:**802-6.
53. **Delihas, N., and S. Forst.** 2001. *MicF*: an antisense RNA gene involved in response of *Escherichia coli* to global stress factors. J Mol Biol **313:**1-12.
54. **Dover, L. G., P. E. Corsino, I. R. Daniels, S. L. Cocklin, V. Tatituri, G. S. Besra, and K. Futterer.** 2004. Crystal structure of the TetR/CamR family repressor *Mycobacterium tuberculosis* EthR implicated in ethionamide resistance. J Mol Biol **340:**1095-105.
55. **Eaves, D. J., V. Ricci, and L. J. Piddock.** 2004. Expression of *acrB*, *acrF*, *acrD*, *marA*, and *soxS* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: role in multiple antibiotic resistance. Antimicrob Agents Chemother **48:**1145-50.
56. **Egan, S. M., and R. F. Schleif.** 1993. A regulatory cascade in the induction of *rhaBAD*. J Mol Biol **234:**87-98.
57. **Elkins, C. A., and H. Nikaido.** 2003. Chimeric analysis of AcrA function reveals the importance of its C-terminal domain in its interaction with the AcrB multidrug efflux pump. J Bacteriol **185:**5349-56.
58. **Elkins, C. A., and H. Nikaido.** 2002. Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. J Bacteriol **184:**6490-8.
59. **Emmerson, A. M., and A. M. Jones.** 2003. The quinolones: decades of development and use. J Antimicrob Chemother **51 Suppl 1:**13-20.
60. **Evans, M. R., J. P. Tromans, E. L. Dexter, C. D. Ribeiro, and D. Gardner.** 1996. Consecutive *Salmonella* outbreaks traced to the same bakery. Epidemiol Infect **116:**161-7.
61. **Fawcett, W. P., and R. E. Wolf, Jr.** 1995. Genetic definition of the *Escherichia coli zwf* "*soxbox*," the DNA binding site for SoxS-mediated induction of glucose 6-phosphate dehydrogenase in response to superoxide. J Bacteriol **177:**1742-50.
62. **Fawcett, W. P., and R. E. Wolf, Jr.** 1994. Purification of a MalE-SoxS fusion protein and identification of the control sites of *Escherichia coli* superoxide-inducible genes. Mol Microbiol **14:**669-79.
63. **Fisher, I. S.** 2004. International trends in *Salmonella* serotypes 1998-2003--a surveillance report from the Enter-net international surveillance network. Euro Surveill **9:**45-7.
64. **Fournier, B., R. Aras, and D. C. Hooper.** 2000. Expression of the multidrug resistance transporter NorA from *Staphylococcus aureus* is modified by a two-component regulatory system. J Bacteriol **182:**664-71.
65. **Fralick, J. A.** 1996. Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. J Bacteriol **178:**5803-5.
66. **Frenois, F., J. Engohang-Ndong, C. Locht, A. R. Baulard, and V. Villeret.** 2004. Structure of EthR in a ligand bound conformation reveals therapeutic perspectives against tuberculosis. Mol Cell **16:**301-7.
67. **Fujihira, E., N. Tamura, and A. Yamaguchi.** 2002. Membrane topology of a multidrug efflux transporter, AcrB, in *Escherichia coli*. J Biochem (Tokyo) **131:**145-51.

68. **Galas, D. J., and M. chandler.** 1989. Bacterial insertion sequences, p. 109-162. *In* D. E. Berg and M. M. Howe (ed.), Mobile DNA. American Society for Microbiology, Washington DC.
69. **Gallegos, M. T., R. Schleif, A. Bairoch, K. Hofmann, and J. L. Ramos.** 1997. Arac/XylS family of transcriptional regulators. Microbiol Mol Biol Rev **61:**393-410.
70. **George, A. M., R. M. Hall, and H. W. Stokes.** 1995. Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae*: a novel gene, *ramA*, confers a multidrug resistance phenotype in *Escherichia coli*. Microbiology **141 (Pt 8):**1909-20.
71. **Giraud, E.** 2000. Résistance aux fluoroquinolones chez *Salmonella* : mécanismes et conséquences physiologiques. Thèse. Université Farnçois Rabelais, Tours.
72. **Giraud, E., A. Brisabois, J. L. Martel, and E. Chaslus-Dancla.** 1999. Comparative studies of mutations in animal isolates and experimental in vitro- and in vivo-selected mutants of *Salmonella* spp. suggest a counterselection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field. Antimicrob Agents Chemother **43:**2131-7.
73. **Giraud, E., A. Cloeckaert, S. Baucheron, C. Mouline, and E. Chaslus-Dancla.** 2003. Fitness cost of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J Med Microbiol **52:**697-703.
74. **Giraud, E., A. Cloeckaert, D. Kerboeuf, and E. Chaslus-Dancla.** 2000. Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Antimicrob Agents Chemother **44:**1223-8.
75. **Girmont, F., and H, Meugnier.** 2000. Lysotypie, bactériocinotypie, ribotypie, p. 247-265, Précise de bactériologie clinique, ESKA ed, Paris.
76. **Glynn, M. K., C. Bopp, W. Dewitt, P. Dabney, M. Mokhtar, and F. J. Angulo.** 1998. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States. N Engl J Med **338:**1333-8.
77. **Greenblatt, J., and R. Schleif.** 1971. Arabinose C protein: regulation of the arabinose operon in vitro. Nat New Biol **233:**166-70.
78. **Greenwood, D.** 1995. Inhibitors of bacterial cell wall synthesis. *In* D. Greenwood (ed.). Antimicrobial chemotherapy. Third, New York.
79. **Griffith, K. L., I. M. Shah, and R. E. Wolf, Jr.** 2004. Proteolytic degradation of *Escherichia coli* transcription activators SoxS and MarA as the mechanism for reversing the induction of the superoxide (SoxRS) and multiple antibiotic resistance (*Mar*) regulons. Mol Microbiol **51:**1801-16.
80. **Grkovic, S., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 2002. Regulation of bacterial drug export systems. Microbiol Mol Biol Rev **66:**671-701, table of contents.
81. **Grkovic, S., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 2001. Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria. Semin Cell Dev Biol **12:**225-37.
82. **Gunn, J. S.** 2000. Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. Microbes Infect **2:**907-13.
83. **Haeghebaert, S., F. Le Querrec, A.Gallay, P. Bouvet, M. Gomez, and M. Vaillant.** Les Toxi-infection Alimentaires Collectives en France en 1999 et 2000. Zoonoses alimentaires, Institut National de Veille sanitaire.
84. **Haeghebaert, S., F. Le Querrec, P. Bouvet, A. Gallay, E. Espié. M. Gomez, and V. Vaillant.** Les Toxi-infections alimentaires Collectives en France 2001. Bulletin épidémiologique hebdomadaire, 2002; N°50:249-254.
85. **Hagman, K. E., and W. M. Shafer.** 1995. Transcriptional control of the *mtr* efflux system of *Neisseria gonorrhoeae*. J Bacteriol **177:**4162-5.
86. **Hancock, R. E.** 1997. The bacterial outer membrane as a drug barrier. Trends Microbiol **5:**37-42.
87. **Hancock, R. E.** 1997. Peptide antibiotics. Lancet. 349:418-422.

88. **Hansen, H., and P. Heisig.** 2003. Topoisomerase IV mutations in quinolone-resistant salmonellae selected in vitro. Microb Drug Resist **9:**25-32.
89. **Harrison, S. C., and A. K. Aggarwal.** 1990. DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. Annu Rev Biochem **59:**933-69.
90. **Hinrichs, W., C. Kisker, M. Duvel, A. Muller, K. Tovar, W. Hillen, and W. Saenger.** 1994. Structure of the Tet repressor-tetracycline complex and regulation of antibiotic resistance. Science **264:**418-20.
91. **Hoch, J. A.** 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. Curr Opin Microbiol **3:**165-70.
92. **Holcroft, C. C., and S. M. Egan.** 2000. Interdependence of activation at *rhaSR* by cyclic AMP receptor protein, the RNA polymerase alpha subunit C-terminal domain, and *rhaR*. J Bacteriol **182:**6774-82.
93. **Holland, I. B., and M. A. Blight.** 1999. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. J Mol Biol **293:**381-99.
94. **Hong, M., M. Fuangthong, J. D. Helmann, and R. G. Brennan.** 2005. Structure of an OhrR-*ohrA* operator complex reveals the DNA binding mechanism of the MarR family. Mol Cell **20:**131-41.
95. **Hooper, D. C.** 2000. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. Clin Infect Dis **31 Suppl 2:**S24-8.
96. **Hooper, D. C., and J. S. Wolfson.** 1991. Fluoroquinolone antimicrobial agents. N Engl J Med **324:**384-94.
97. **Hsueh, P. R., L. J. Teng, S. P. Tseng, C. F. Chang, J. H. Wan, J. J. Yan, C. M. Lee, Y. C. Chuang, W. K. Huang, D. Yang, J. M. Shyr, K. W. Yu, L. S. Wang, J. J. Lu, W. C. Ko, J. J. Wu, F. Y. Chang, Y. C. Yang, Y. J. Lau, Y. C. Liu, C. Y. Liu, S. W. Ho, and K. T. Luh.** 2004. Ciprofloxacin-resistant *Salmonella enterica* Typhimurium and Choleraesuis from pigs to humans, Taiwan. Emerg Infect Dis **10:**60-8.
98. **Huda, N., E. W. Lee, J. Chen, Y. Morita, T. Kuroda, T. Mizushima, and T. Tsuchiya.** 2003. Molecular cloning and characterization of an ABC multidrug efflux pump, VcaM, in Non-O1 *Vibrio cholerae*. Antimicrob Agents Chemother **47:**2413-7.
99. **Hueck, C. J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. Microbiol Mol Biol Rev **62:**379-433.
100. **Huffman, J. L., and R. G. Brennan.** 2002. Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. Curr Opin Struct Biol **12:**98-106.
101. **Huillet, E., P. Velge, T. Vallaeys, and P. Pardon.** 2006. LadR, a new PadR-related transcriptional regulator from *Listeria monocytogenes*, negatively regulates the expression of the multidrug efflux pump MdrL. FEMS Microbiol Lett **254:**87-94.
102. **Imberechts, H., I. D'Hooghe, H. Bouchet, C. Godard, and P. Pohl.** 2000. Apparent loss of enrofloxacin resistance in bovine *Salmonella* Typhimurium strains isolated in Belgium, 1991 to 1998. Vet Rec **147:**76-7.
103. **Ip, H., K. Stratton, H. Zgurskaya, and J. Liu.** 2003. pH-induced conformational changes of AcrA, the membrane fusion protein of *Escherichia coli* multidrug efflux system. J Biol Chem **278:**50474-82.
104. **Jair, K. W., W. P. Fawcett, N. Fujita, A. Ishihama, and R. E. Wolf, Jr.** 1996. Ambidextrous transcriptional activation by SoxS: requirement for the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit in a subset of *Escherichia coli* superoxide-inducible genes. Mol Microbiol **19:**307-17.
105. **Jair, K. W., R. G. Martin, J. L. Rosner, N. Fujita, A. Ishihama, and R. E. Wolf, Jr.** 1995. Purification and regulatory properties of MarA protein, a transcriptional

activator of *Escherichia coli* multiple antibiotic and superoxide resistance promoters. J Bacteriol **177:**7100-4.

106. **Jair, K. W., X. Yu, K. Skarstad, B. Thony, N. Fujita, A. Ishihama, and R. E. Wolf, Jr.** 1996. Transcriptional activation of promoters of the superoxide and multiple antibiotic resistance regulons by *Rob*, a binding protein of the *Escherichia coli* origin of chromosomal replication. J Bacteriol **178:**2507-13.
107. **Jellen-Ritter, A. S., and W. V. Kern.** 2001. Enhanced expression of the multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in *Escherichia coli* mutants Selected with a fluoroquinolone. Antimicrob Agents Chemother **45:**1467-72.
108. **Johnson, C. M., and R. F. Schleif.** 2000. Cooperative action of the catabolite activator protein and AraC in vitro at the araFGH promoter. J Bacteriol **182:**1995-2000.
109. **Johnson, J. M., and G. M. Church.** 1999. Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. J Mol Biol **287:**695-715.
110. **Johnsrud, L.** 1979. DNA sequence of the transposable element IS*1*. Mol Gen Genet **169:**213-8.
111. **Jones, Y. E., S. Chappell, I. M. McLaren, R. H. Davies, and C. Wray.** 2002. Antimicrobial resistance in *Salmonella* isolated from animals and their environment in England and Wales from 1988 to 1999. Vet Rec **150:**649-54.
112. **Kamionka, A., J. Bogdanska-Urbaniak, O. Scholz, and W. Hillen.** 2004. Two mutations in the tetracycline repressor change the inducer anhydrotetracycline to a corepressor. Nucleic Acids Res **32:**842-7.
113. **Karpowich, N., O. Martsinkevich, L. Millen, Y. R. Yuan, P. L. Dai, K. MacVey, P. J. Thomas, and J. F. Hunt.** 2001. Crystal structures of the MJ1267 ATP binding cassette reveal an induced-fit effect at the ATPase active site of an ABC transporter. Structure **9:**571-86.
114. **Kawabe, T., E. Fujihira, and A. Yamaguchi.** 2000. Molecular construction of a multidrug exporter system, AcrAB: molecular interaction between AcrA and AcrB, and cleavage of the N-terminal signal sequence of AcrA. J Biochem (Tokyo) **128:**195-200.
115. **Kern, W. V., M. Oethinger, A. S. Jellen-Ritter, and S. B. Levy.** 2000. Non-target gene mutations in the development of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother **44:**814-20.
116. **Kleckner, N.** 1979. DNA sequence analysis of Tn*10* insertions: origin and role of 9 bp flanking repetitions during Tn*10* translocation. Cell **16:**711-20.
117. **Klein, J. R., B. Henrich, and R. Plapp.** 1991. Molecular analysis and nucleotide sequence of the *envCD* operon of *Escherichia coli*. Mol Gen Genet **230:**230-40.
118. **Kobayashi, K., N. Tsukagoshi, and R. Aono.** 2001. Suppression of hypersensitivity of *Escherichia coli acrB* mutant to organic solvents by integrational activation of the *acrEF* operon with the IS*1* or IS*2* element. J Bacteriol **183:**2646-53.
119. **Kobayashi, N., K. Nishino, and A. Yamaguchi.** 2001. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. J Bacteriol **183:**5639-44.
120. **Komp Lindgren, P., A. Karlsson, and D. Hughes.** 2003. Mutation rate and evolution of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from patients with urinary tract infections. Antimicrob Agents Chemother **47:**3222-32.
121. **Koronakis, V., A. Sharff, E. Koronakis, B. Luisi, and C. Hughes.** 2000. Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. Nature **405:**914-9.

122. **Koutsolioutsou, A., E. A. Martins, D. G. White, S. B. Levy, and B. Demple.** 2001. A *soxRS*-constitutive mutation contributing to antibiotic resistance in a clinical isolate of *Salmonella enterica* (Serovar Typhimurium). Antimicrob Agents Chemother **45:**38-43.

123. **Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, 2nd, and K. M. Peterson.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. Gene **166:**175-6.

124. **Kunonga, N. I., R. J. Sobieski, and S. S. Crupper.** 2000. Prevalence of the multiple antibiotic resistance operon (*marRAB*) in the genus *Salmonella*. FEMS Microbiol Lett **187:**155-60.

125. **Kwon, H. J., M. H. Bennik, B. Demple, and T. Ellenberger.** 2000. Crystal structure of the *Escherichia coli Rob* transcription factor in complex with DNA. Nat Struct Biol **7:**424-30.

126. **Laboratoire Santé Sécurité des matières infectieuses. 2001. Fiche technique.** site internet : " http://www.hc-sc.gc.ca/pphb-dgspsp/msds-ftss/msds135f.html ".

127. **Lacroix, F. J., C. Avoyne, C. Pinault, M. Y. Popoff, and P. Pardon.** 1995. *Salmonella typhimurium TnphoA* mutants with increased sensitivity to biological and chemical detergents. Res Microbiol **146:**659-70.

128. **Lacroix, F. J., A. Cloeckaert, O. Grepinet, C. Pinault, M. Y. Popoff, H. Waxin, and P. Pardon.** 1996. *Salmonella typhimurium acrB*-like gene: identification and role in resistance to biliary salts and detergents and in murine infection. FEMS Microbiol Lett **135:**161-7.

129. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227:**680-5.

130. **Lailler, R., F. Moury, and A. Brissabois.** Surveillance de la sensibilité aux antibiotiques des *Salmonella* d'origine non humane, France 2000. Zoonoses alimentaires, Institut National de Veille Sanitaire.

131. **Lane, D., J. Cavaille, and M. Chandler.** 1994. Induction of the SOS response by IS*1* transposase. J Mol Biol **242:**339-50.

132. **Le Minor, L., and M. Y. Popoff.** 1987. Designation of *Salmonella entrica* sp. nov. as the type and only species of the genus *Salmonella*. Int. J. Syst. Bact. **37:**465-468.

133. **Lee, E. W., M. N. Huda, T. Kuroda, T. Mizushima, and T. Tsuchiya.** 2003. EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob Agents Chemother **47:**3733-8.

134. **Levine, C., H. Hiasa, and K. J. Marians.** 1998. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. Biochim Biophys Acta **1400:**29-43.

135. **Li, H., and J. T. Park.** 1999. The periplasmic murein peptide-binding protein MppA is a negative regulator of multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. J Bacteriol **181:**4842-7.

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

137. **Lim, D., K. Poole, and N. C. Strynadka.** 2002. Crystal structure of the MexR repressor of the *mexRAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem **277:**29253-9.

138. **Lin, J., M. Akiba, O. Sahin, and Q. Zhang.** 2005. CmeR functions as a transcriptional repressor for the multidrug efflux pump CmeABC in Campylobacter jejuni. Antimicrob Agents Chemother **49:**1067-75.

139. **Lin, J., O. Sahin, L. O. Michel, and Q. Zhang.** 2003. Critical role of multidrug efflux pump CmeABC in bile resistance and in vivo colonization of *Campylobacter jejuni*. Infect Immun **71:**4250-9.
140. **Linde, H. J., F. Notka, M. Metz, B. Kochanowski, P. Heisig, and N. Lehn.** 2000. In vivo increase in resistance to ciprofloxacin in *Escherichia coli* associated with deletion of the C-terminal part of MarR. Antimicrob Agents Chemother **44:**1865-8.
141. **Ling, J. M., E. W. Chan, A. W. Lam, and A. F. Cheng.** 2003. Mutations in topoisomerase genes of fluoroquinolone-resistant salmonellae in Hong Kong. Antimicrob Agents Chemother **47:**3567-73.
142. **Liu, M., and S. Douthwaite.** 2002. Resistance to the macrolide antibiotic tylosin is conferred by single methylations at 23S rRNA nucleotides G748 and A2058 acting in synergy. Proc Natl Acad Sci U S A **99:**14658-63.
143. **Lomovskaya, O., K. Lewis, and A. Matin.** 1995. EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB. J Bacteriol **177:**2328-34.
144. **Luttinger, A.** 1995. The twisted 'life' of DNA in the cell: bacterial topoisomerases. Mol Microbiol **15:**601-6.
145. **Ma, D., M. Alberti, C. Lynch, H. Nikaido, and J. E. Hearst.** 1996. The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. Mol Microbiol **19:**101-12.
146. **Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, and J. E. Hearst.** 1995. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. Mol Microbiol **16:**45-55.
147. **Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, and J. E. Hearst.** 1993. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. J Bacteriol **175:**6299-313.
148. **Machida, Y., C. Machida, and E. Ohtsubo.** 1984. Insertion element IS*1* encodes two structural genes required for its transposition. J Mol Biol **177:**229-45.
149. **Marchand, I., L. Damier-Piolle, P. Courvalin, and T. Lambert.** 2004. Expression of the RND-type efflux pump AdeABC in *Acinetobacter baumannii* is regulated by the AdeRS two-component system. Antimicrob Agents Chemother **48:**3298-304.
150. **Marcus, R., T. Rabatsky-Ehr, J. C. Mohle-Boetani, M. Farley, C. Medus, B. Shiferaw, M. Carter, S. Zansky, M. Kennedy, T. Van Gilder, and J. L. Hadler.** 2004. Dramatic decrease in the incidence of *Salmonella* serotype Enteritidis infections in 5 FoodNet sites: 1996-1999. Clinical Infectious Diseases **38 Suppl 3:**S135-141.
151. **Martel, J. L., E. Chaslus-Dancla, M. Coudert, and J. P. Lafont.** 1996. Évolution de la sensibilité aux antibiotiques des salmonelles d'origine bovine en France. Méd. Mal. Infect. **26:**415-419.
152. **Martin, R. G., W. K. Gillette, N. I. Martin, and J. L. Rosner.** 2002. Complex formation between activator and RNA polymerase as the basis for transcriptional activation by MarA and SoxS in *Escherichia coli*. Mol Microbiol **43:**355-70.
153. **Martin, R. G., W. K. Gillette, S. Rhee, and J. L. Rosner.** 1999. Structural requirements for *marbox* function in transcriptional activation of *mar/sox/rob* regulon promoters in *Escherichia coli*: sequence, orientation and spatial relationship to the core promoter. Mol Microbiol **34:**431-41.
154. **Martin, R. G., and J. L. Rosner.** 1995. Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to *mar* operator sequences. Proc Natl Acad Sci U S A **92:**5456-60.
155. **Martin, R. G., and J. L. Rosner.** 2002. Genomics of the *marA/soxS/rob* regulon of *Escherichia coli*: identification of directly activated promoters by application of molecular genetics and informatics to microarray data. Mol Microbiol **44:**1611-24.

156. **Martinez-Garcia, E., J. M. Navarro-Llorens, and A. Tormo.** 2003. Identification of an unknown promoter, *OUTIIp*, within the IS*10R* element. J Bacteriol **185:**2046-50.
157. **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:**1320-8.
158. **Mazzariol, A., Y. Tokue, T. M. Kanegawa, G. Cornaglia, and H. Nikaido.** 2000. High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA. Antimicrob Agents Chemother **44:**3441-3.
159. **McAleese, F., P. Petersen, A. Ruzin, P. M. Dunman, E. Murphy, S. J. Projan, and P. A. Bradford.** 2005. A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived *Staphylococcus aureus* mutants to tigecycline. Antimicrob Agents Chemother **49:**1865-71.
160. **McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston, and R. K. Wilson.** 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. Nature **413:**852-6.
161. **Moken, M. C., L. M. McMurry, and S. B. Levy.** 1997. Selection of multiple-antibiotic-resistant (*mar*) mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pine oil: roles of the mar and *acrAB* loci. Antimicrob Agents Chemother **41:**2770-2.
162. **Murakami, S., R. Nakashima, E. Yamashita, and A. Yamaguchi.** 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. Nature **419:**587-93.
163. **Murakami, S., N. Tamura, A. Saito, T. Hirata, and A. Yamaguchi.** 2004. Extramembrane central pore of multidrug exporter AcrB in *Escherichia coli* plays an important role in drug transport. J Biol Chem **279:**3743-8.
164. **Nakajima, H., M. Kobayashi, T. Negishi, and R. Aono.** 1995. *soxRS* gene increased the level of organic solvent tolerance in *Escherichia coli*. Biosci Biotechnol Biochem **59:**1323-5.
165. **Natsume, R., Y. Ohnishi, T. Senda, and S. Horinouchi.** 2004. Crystal structure of a gamma-butyrolactone autoregulator receptor protein in *Streptomyces coelicolor* A3(2). J Mol Biol **336:**409-19.
166. **Nikaido, H.** 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol Mol Biol Rev **67:**593-656.
167. **Nikaido, H.** 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. J Bacteriol **178:**5853-9.
168. **Nikaido, H.** 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. Science **264:**382-8.
169. **Nikaido, H., M. Basina, V. Nguyen, and E. Y. Rosenberg.** 1998. Multidrug efflux pump AcrAB of *Salmonella typhimurium* excretes only those beta-lactam antibiotics containing lipophilic side chains. J Bacteriol **180:**4686-92.
170. **Nishino, K., T. Latifi, and E. A. Groisman.** 2006. Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Mol Microbiol **59:**126-41.
171. **Notka, F., H. J. Linde, A. Dankesreiter, H. H. Niller, and N. Lehn.** 2002. A C-terminal 18 amino acid deletion in MarR in a clinical isolate of *Escherichia coli* reduces MarR binding properties and increases the MIC of ciprofloxacin. J Antimicrob Chemother **49:**41-7.

172. **Nyman, K., K. Nakamura, H. Ohtsubo, and E. Ohtsubo.** 1981. Distribution of the insertion sequence IS*1* in gram-negative bacteria. Nature **289:**609-12.
173. **Oethinger, M., I. Podglajen, W. V. Kern, and S. B. Levy.** 1998. Overexpression of the *marA* or *soxS* regulatory gene in clinical topoisomerase mutants of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother **42:**2089-94.
174. **Ohtsubo, H., K. Nyman, W. Doroszkiewicz, and E. Ohtsubo.** 1981. Multiple copies of iso-insertion sequences of IS*1* in *Shigella dysenteriae* chromosome. Nature **292:**640-3.
175. **Ohtsubo, H., and E. Ohtsubo.** 1978. Nucleotide sequence of an insertion element, IS*1*. Proc Natl Acad Sci U S A **75:**615-9.
176. **Okusu, H., D. Ma, and H. Nikaido.** 1996. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. J Bacteriol **178:**306-8.
177. **Olliver, A., M. Valle, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert.** 2005. Overexpression of the multidrug efflux operon *acrEF* by insertional activation with IS*1* or IS*10* elements in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT204 *acrB* mutants selected with fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother **49:**289-301.
178. **Olliver, A., M. Valle, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert.** 2004. Role of an *acrR* mutation in multidrug resistance of in vitro-selected fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. FEMS Microbiol Lett **238:**267-72.
179. **Orth, P., F. Cordes, D. Schnappinger, W. Hillen, W. Saenger, and W. Hinrichs.** 1998. Conformational changes of the Tet repressor induced by tetracycline trapping. J Mol Biol **279:**439-47.
180. **Orth, P., W. Saenger, and W. Hinrichs.** 1999. Tetracycline-chelated Mg2+ ion initiates helix unwinding in Tet repressor induction. Biochemistry **38:**191-8.
181. **Orth, P., D. Schnappinger, W. Hillen, W. Saenger, and W. Hinrichs.** 2000. Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. Nat Struct Biol **7:**215-9.
182. **Orth, P., D. Schnappinger, P. E. Sum, G. A. Ellestad, W. Hillen, W. Saenger, and W. Hinrichs.** 1999. Crystal structure of the tet repressor in complex with a novel tetracycline, 9-(N,N-dimethylglycylamido)- 6-demethyl-6-deoxy-tetracycline. J Mol Biol **285:**455-61.
183. **Pabo, C. O., and R. T. Sauer.** 1992. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. Annu Rev Biochem **61:**1053-95.
184. **Pages, J. M.** 2004. [Bacterial porin and antibiotic susceptibility]. Med Sci (Paris) **20:**346-51.
185. **Parkhill, J., G. Dougan, K. D. James, N. R. Thomson, D. Pickard, J. Wain, C. Churcher, K. L. Mungall, S. D. Bentley, M. T. Holden, M. Sebaihia, S. Baker, D. Basham, K. Brooks, T. Chillingworth, P. Connerton, A. Cronin, P. Davis, R. M. Davies, L. Dowd, N. White, J. Farrar, T. Feltwell, N. Hamlin, A. Haque, T. T. Hien, S. Holroyd, K. Jagels, A. Krogh, T. S. Larsen, S. Leather, S. Moule, P. O'Gaora, C. Parry, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead, and B. G. Barrell.** 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. Nature **413:**848-52.
186. **Parry, C. M.** 2003. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica*. Curr Opin Infect Dis **16:**467-72.
187. **Paulsen, I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray.** 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. Microbiol Rev **60:**575-608.
188. **Paulsen, I. T., J. H. Park, P. S. Choi, and M. H. Saier, Jr.** 1997. A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins,

carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Lett **156:**1-8.

189. **Piddock, L. J.** 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clin Microbiol Rev **19:**382-402.
190. **Piddock, L. J.** 2002. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. FEMS Microbiol Rev **26:**3-16.
191. **Piddock, L. J., D. G. White, K. Gensberg, L. Pumbwe, and D. J. Griggs.** 2000. Evidence for an efflux pump mediating multiple antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Antimicrob Agents Chemother **44:**3118-21.
192. **Poelarends, G. J., P. Mazurkiewicz, M. Putman, R. H. Cool, H. W. Veen, and W. N. Konings.** 2000. An ABC-type multidrug transporter of *Lactococcus lactis* possesses an exceptionally broad substrate specificity. Drug Resist Updat **3:**330-334.
193. **Pomposiello, P. J., and B. Demple.** 2000. Identification of SoxS-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J Bacteriol **182:**23-9.
194. **Poole, K.** 2002. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in gram-negative bacteria. Curr Pharm Biotechnol **3:**77-98.
195. **Poole, K., K. Tetro, Q. Zhao, S. Neshat, D. E. Heinrichs, and N. Bianco.** 1996. Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. Antimicrob Agents Chemother **40:**2021-8.
196. **Popoff, M. Y., J. Bockemuhl, and L. L. Gheesling.** 2004. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. Res Microbiol **155:**568-70.
197. **Poppe, C., N. Smart, R. Khakhria, W. Johnson, J. Spika, and J. Prescott.** 1998. *Salmonella* Typhimurium DT104: a virulent and drug-resistant pathogen. Can Vet J **39:**559-65.
198. **Pos, K. M., A. Schiefner, M. A. Seeger, and K. Diederichs.** 2004. Crystallographic analysis of AcrB. FEBS Lett **564:**333-9.
199. **Prouty, A. M., I. E. Brodsky, S. Falkow, and J. S. Gunn.** 2004. Bile-salt-mediated induction of antimicrobial and bile resistance in *Salmonella typhimurium* Microbiology **150:**775-783.
200. **Putman, M., H. W. van Veen, and W. N. Konings.** 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. Microbiol Mol Biol Rev **64:**672-93.
201. **Rabsch, W., H. Tschape, and A. J. Baumler.** 2001. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. Microbes and Infection **3:**237-247.
202. **Rahmati, S., S. Yang, A. L. Davidson, and E. L. Zechiedrich.** 2002. Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. Mol Microbiol **43:**677-85.
203. **Ramos, J. L., M. Martinez-Bueno, A. J. Molina-Henares, W. Teran, K. Watanabe, X. Zhang, M. T. Gallegos, R. Brennan, and R. Tobes.** 2005. The TetR family of transcriptional repressors. Microbiol Mol Biol Rev **69:**326-56.
204. **Randall, L. P., and M. J. Woodward.** 2002. The multiple antibiotic resistance (*mar*) locus and its significance. Res Vet Sci **72:**87-93.
205. **Randall, L. P., and M. J. Woodward.** 2001. Multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. Appl Environ Microbiol **67:**1190-7.
206. **Reichheld, S. E., and A. R. Davidson.** 2006. Two-way interdomain signal transduction in tetracycline repressor. J Mol Biol **361:**382-9.
207. **Rhee, S., R. G. Martin, J. L. Rosner, and D. R. Davies.** 1998. A novel DNA-binding motif in MarA: the first structure for an AraC family transcriptional activator. Proc Natl Acad Sci U S A **95:**10413-8.

208. **Rosenberg, E. Y., D. Bertenthal, M. L. Nilles, K. P. Bertrand, and H. Nikaido.** 2003. Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. Mol Microbiol **48:**1609-19.

209. **Rosner, J. L., B. Dangi, A. M. Gronenborn, and R. G. Martin.** 2002. Posttranscriptional activation of the transcriptional activator Rob by dipyridyl in *Escherichia coli*. J Bacteriol **184:**1407-16.

210. **Ruzin, A., M. A. Visalli, D. Keeney, and P. A. Bradford.** 2005. Influence of transcriptional activator RamA on expression of multidrug efflux pump AcrAB and tigecycline susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother **49:**1017-22.

211. **Saier, M. H., Jr., I. T. Paulsen, M. K. Sliwinski, S. S. Pao, R. A. Skurray, and H. Nikaido.** 1998. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. Faseb J **12:**265-74.

212. **Saito, K., S. Eda, H. Maseda, and T. Nakae.** 2001. Molecular mechanism of MexR-mediated regulation of MexAB-OprM efflux pump expression in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett **195:**23-8.

213. **Salyers, A. A., and D.D. Whitt.** 2001. *Salmonella* Infections, p 229-243. Bacterial pathogensis: a molecular approach, second edition. ASM press, Washington D.C.

214. **Sanchez, P., A. Alonso, and J. L. Martinez.** 2002. Cloning and characterization of SmeT, a repressor of the *Stenotrophomonas maltophilia* multidrug efflux pump SmeDEF. Antimicrob Agents Chemother **46:**3386-93.

215. **Santiviago, C. A., C. S. Toro, A. A. Hidalgo, P. Youderian, and G. C. Mora.** 2003. Global regulation of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium major porin, OmpD. J Bacteriol **185:**5901-5.

216. **Sawada, I., H. Maseda, T. Nakae, H. Uchiyama, and N. Nomura.** 2004. A quorum-sensing autoinducer enhances the *mexAB-oprM* efflux-pump expression without the MexR-mediated regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol Immunol **48:**435-9.

217. **Scheld, W. M.** 2003. Maintaining fluoroquinolone class efficacy: review of influencing factors. Emerg Infect Dis **9:**1-9.

218. **Schleif, R.** 1992. DNA looping. Annu Rev Biochem **61:**199-223.

219. **Schleif, R.** 1987. Gene regulation: why should DNA loop? Nature **327:**369-70.

220. **Schleif, R.** 1969. Induction of the L-arabinose operon. J Mol Biol **46:**197-9.

221. **Schleif, R. F., and M. A. Favreau.** 1982. Hyperproduction of araC protein from *Escherichia coli*. Biochemistry **21:**778-82.

222. **Schneiders, T., T. M. Barbosa, L. M. McMurry, and S. B. Levy.** 2004. The Escherichia coli transcriptional regulator MarA directly represses transcription of *purA* and *hdeA*. J Biol Chem **279:**9037-42.

223. **Schneiders, T., and S. B. Levy.** 2006. MarA-mediated transcriptional repression of the *rob* promoter. J Biol Chem **281:**10049-55.

224. **Schumacher, M. A., and R. G. Brennan.** 2003. Deciphering the molecular basis of multidrug recognition: crystal structures of the *Staphylococcus aureus* multidrug binding transcription regulator QacR. Res Microbiol **154:**69-77.

225. **Schumacher, M. A., and R. G. Brennan.** 2002. Structural mechanisms of multidrug recognition and regulation by bacterial multidrug transcription factors. Mol Microbiol **45:**885-93.

226. **Schumacher, M. A., M. C. Miller, S. Grkovic, M. H. Brown, R. A. Skurray, and R. G. Brennan.** 2002. Structural basis for cooperative DNA binding by two dimers of the multidrug-binding protein QacR. Embo J **21:**1210-8.

227. **Schumacher, M. A., M. C. Miller, S. Grkovic, M. H. Brown, R. A. Skurray, and R. G. Brennan.** 2001. Structural mechanisms of QacR induction and multidrug recognition. Science **294:**2158-63.
228. **Schwarz, S., and E. Chaslus-Dancla.** 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. Vet Res **32:**201-25.
229. **Sekine, Y., N. Eisaki, K. Kobayashi, and E. Ohtsubo.** 1997. Isolation and characterization of IS*1* circles. Gene **191:**183-90.
230. **Simons, R. W., B. C. Hoopes, W. R. McClure, and N. Kleckner.** 1983. Three promoters near the termini of IS*10*: pIN, pOUT, and pIII. Cell **34:**673-82.
231. **SJ, O. B., and H. de Valk.** 2003. *Salmonella* - "old" organism, continued challenges ! Euro Surveill **8:**29-31.
232. **Skinner, R., E. Cundliffe, and F. J. Schmidt.** 1983. Site of action of a ribosomal RNA methylase responsible for resistance to erythromycin and other antibiotics. J Biol Chem **258:**12702-6.
233. **Soussy, C. J.** 2000. Antibiotiques, généralités, p. 557-582, Précis de bactériologie clinique, ESKA ed, Paris.
234. **Stone, B. J., and V. L. Miller.** 1995. *Salmonella enteritidis* has a homologue of tolC that is required for virulence in BALB/c mice. Mol Microbiol **17:**701-12.
235. **Sulavik, M. C., M. Dazer, and P. F. Miller.** 1997. The *Salmonella typhimurium mar* locus: molecular and genetic analyses and assessment of its role in virulence. J Bacteriol **179:**1857-66.
236. **Suzuki, M., N. Yagi, and M. Gerstein.** 1995. DNA recognition and superstructure formation by helix-turn-helix proteins. Protein Eng **8:**329-38.
237. **Tauxe, R. V.** 1999. *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium DT104: successfull subtypes in the modern world, p. 37-52. *In* A. press (ed), Emerging Infections, 3 ed, Washington.
238. **Thanabalu, T., E. Koronakis, C. Hughes, and V. Koronakis.** 1998. Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E.coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. Embo J **17:**6487-96.
239. **Threlfall, E. J.** 2002. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. FEMS Microbiol Rev **26:**141-8.
240. **Threlfall, E. J.** 2000. Epidemic *Salmonella typhimurium* DT104--a truly international multiresistant clone. J Antimicrob Chemother **46:**7-10.
241. **Threlfall, E. J., I. S. Fisher, C. Berghold, P. Gerner-Smidt, H. Tschape, M. Cormican, I. Luzzi, F. Schnieder, W. Wannet, J. Machado, and G. Edwards.** 2003. Antimicrobial drug resistance in isolates of *Salmonella enterica* from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. Euro Surveill **8:**41-5.
242. **Threlfall, E. J., L. R. Ward, and B. Rowe.** 1997. Increasing incidence of resistance to trimethoprim and ciprofloxacin in epidemic *Salmonella typhimurium* DT104 in England and Wales. Euro Surveill **2:**81-84.
243. **Tibbetts, R. J., T. L. Lin, and C. C. Wu.** 2003. Phenotypic evidence for inducible multiple antimicrobial resistance in *Salmonella choleraesuis*. FEMS Microbiol Lett **218:**333-8.
244. **Tirado, C., and K. Schmidt.** 2001. WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications: preliminary results and trends across greater Europe. World Health Organization. J Infect **43:**80-4.
245. **Tseng, T. T., K. S. Gratwick, J. Kollman, D. Park, D. H. Nies, A. Goffeau, and M. H. Saier, Jr.** 1999. The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and

diverse family that includes human disease and development proteins. J Mol Microbiol Biotechnol **1:**107-25.

246. **Uzzau, S., D. J. Brown, T. Wallis, S. Rubino, G. Leori, S. Bernard, J. Casadesus, D. J. Platt, and J. E. Olsen.** 2000. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. Epidemiology and Infection **125:**229-255.
247. **van der Straaten, T., R. Janssen, D. J. Mevius, and J. T. van Dissel.** 2004. *Salmonella* gene *rma* (*ramA*) and Multiple-Drug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Antimicrob. Agents Chemother. **48:**2292-2294.
248. **van der Straaten, T., L. Zulianello, A. van Diepen, D. L. Granger, R. Janssen, and J. T. van Dissel.** 2004. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium RamA, intracellular oxidative stress response, and bacterial virulence. Infect Immun **72:**996-1003.
249. **Vugia, D. J., M. Samuel, M. M. Farley, R. Marcus, B. Shiferaw, S. Shallow, K. Smith, and F. J. Angulo.** 2004. Invasive *Salmonella* infections in the United States, FoodNet, 1996-1999: incidence, serotype distribution, and outcome. Clinical Infectious Diseases **38 Suppl 3:**S149-156.
250. **Walsh, C.** 2003. Antibiotics: actions, origin, resistance. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
251. **Wang, H., J. L. Dzink-Fox, M. Chen, and S. B. Levy.** 2001. Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical *Escherichia coli* strains from China: role of *acrR* mutations. Antimicrob Agents Chemother **45:**1515-21.
252. **Watson, J. D., N. H. Hopkins, J. W. Robert, J. A. Steitz, and A. M. Weiner.** 1989. Déplacement des transposons, p. 113, Biologie moléculaire du gène 4èmeed., InterEdition ed, Paris.
253. **Webber, M. A., and L. J. Piddock.** 2001. Absence of mutations in *marRAB* or *soxRS* in *acrB*-overexpressing fluoroquinolone-resistant clinical and veterinary isolates of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother **45:**1550-2.
254. **Wei, Y., J. M. Lee, D. R. Smulski, and R. A. LaRossa.** 2001. Global impact of *sdiA* amplification revealed by comprehensive gene expression profiling of *Escherichia coli*. J Bacteriol **183:**2265-72.
255. **White, D. G., J. D. Goldman, B. Demple, and S. B. Levy.** 1997. Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. J Bacteriol **179:**6122-6.
256. **Woolley, R. C., G. Vediyappan, M. Anderson, M. Lackey, B. Ramasubramanian, B. Jiangping, T. Borisova, J. A. Colmer, A. N. Hamood, C. S. McVay, and J. A. Fralick.** 2005. Characterization of the *Vibrio cholerae vceCAB* multiple-drug resistance efflux operon in *Escherichia coli*. J Bacteriol **187:**5500-3.
257. **Yamanaka, H., T. Nomura, N. Morisada, S. Shinoda, and K. Okamoto.** 2002. Site-directed mutagenesis studies of the amino acid residue at position 412 of *Escherichia coli* TolC which is required for the activity. Microb Pathog **33:**81-9.
258. **Yaron, S., D. G. White, and K. R. Matthews.** 2003. Characterization of an *Escherichia coli* O157:H7 *marR* mutant. Int J Food Microbiol **85:**281-91.
259. **Yassien, M. A., H. E. Ewis, C. D. Lu, and A. T. Abdelal.** 2002. Molecular cloning and characterization of the *Salmonella enterica* Serovar Paratyphi B *rma* gene, which confers multiple drug resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother **46:**360-6.
260. **Yu, E. W., J. R. Aires, and H. Nikaido.** 2003. AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. J Bacteriol **185:**5657-64.

261. **Yu, E. W., G. McDermott, H. I. Zgurskaya, H. Nikaido, and D. E. Koshland, Jr.** 2003. Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump. Science **300:**976-80.
262. **Zgurskaya, H. I., and H. Nikaido.** 1999. AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm. J Mol Biol **285:**409-20.
263. **Zgurskaya, H. I., and H. Nikaido.** 1999. Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A **96:**7190-5.
264. **Zgurskaya, H. I., and H. Nikaido.** 2000. Cross-linked complex between oligomeric periplasmic lipoprotein AcrA and the inner-membrane-associated multidrug efflux pump AcrB from *Escherichia coli*. J Bacteriol **182:**4264-7.
265. **Zhang, L., P. Dhillon, H. Yan, S. Farmer, and R. E. Hancock.** 2000. Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother **44:**3317-21.

Étude du rôle des opérons *mar*, *sox*, *ram* dans la multirésistance aux antibiotiques chez *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium

Les salmonelles non-typhoïdes sont responsables de la majorité des toxi-infections alimentaires collectives en Europe. Elles sont le plus souvent dues à la consommation de produits alimentaires d'origine animale. L'antibiothérapie est réservée aux patients fragilisés (enfants, personnes âgées ou immunodéprimés). Les fluoroquinolones sont les molécules de choix dans les cas d'infection causés par des souches résistantes à plusieurs familles d'antibiotiques. C'est particulièrement le cas des souches du sérovar Typhimurium de lysotypes DT104 et DT204 multirésistantes. L'émergence de souches résistantes aux fluoroquinolones pose un problème thérapeutique majeur en médecine humaine et vétérinaire. Les principaux mécanismes mis en œuvre pour résister aux antibiotiques sont l'expulsion de l'antibiotique hors de la cellule par efflux actif et la modification des enzymes cibles des fluoroquinolones (la gyrase et la topoisomérase IV). Le système d'efflux AcrAB-TolC est un mécanisme essentiel dans la multirésistance aux antibiotiques chez *E. coli*. Les gènes *acrAB* font effectivement partie d'un ensemble de gènes régulés par les opérons *mar*, *sox* et *rob*. La surexpression de ce système entraîne une augmentation importante du niveau de résistance à plusieurs familles d'antibiotiques. Ceci se produit suite à l'apparition de mutations dans les régulateurs globaux *mar* et *sox*, ainsi que dans le régulateur local *acrR* de ce système. Par homologie avec ce qui se passe chez *E. coli*, les opérons *mar* et *sox* pourraient contrôler l'expression de la pompe AcrAB-TolC chez *S.* Typhimurium DT104.

Nous avons pu mettre en évidence que l'inactivation de *marRA*, ou *soxRS* n'a aucun effet dans le phénotype de résistance de *S.* Typhimurium DT104, suggérant que ces régions ne participent pas dans l'acquisition d'un phénotype de résistance, ou encore dans la régulation du système AcrAB-TolC. Dans cette optique, notre hypothèse était qu'il existait un régulateur potentiel autre que *mar* et *sox* de la pompe AcrAB et impliqué dans la multirésistance aux antibiotiques chez *S.* Typhimurium DT104 et DT204.

Chez *S.* Typhimurium, la surexpression du gène *ramA* a été relié à la multirésistance aux antibiotiques via l'activation de la pompe AcrAB. Dans cette étude, ce gène a été inactivé pour mieux comprendre son rôle dans la multirésistance, et nous avons mis en évidence que l'inactivation de *ramA* entraîne une diminution d'un facteur 4 du niveau de résistance à divers antibiotiques. Dans ce travail de thèse nous avons identifiés pour la première fois un nouveau gène que nous avons dénommé *ramR*. Ce gène est situé immédiatement en amont de *ramA* sur le chromosome de *S.* Typhimurium LT2. Il code une protéine régulatrice RamR de 193 acides aminés, une protéine homologue faisant partie de la famille TetR. L'inactivation de *ramR* entraîne une augmentation d'un facteur 4 ou plus du niveau de résistance à divers antibiotiques chez une souche sensible de *S.* Typhimurium DT104. Des expériences de RT-PCR ont montré que l'inactivation de *ramR* conduit à une augmentation d'un facteur 4 du niveau d'expression de *ramA* suggérant que RamR agit comme répresseur du gène *ramA*.

Des mutations ou des éléments IS*1* ont été identifiés dans le gène *ramR* chez des souches de *S.* Typhimurium DT104 et DT204 hautement résistantes aux fluoroquinolones. Ces mutants surexpriment la pompe AcrAB. Des expériences de complémentation avec le gène *ramR* sauvage ont montré que ces mutations sont responsables de la résistance aux antibiotiques via la surexpression de *acrAB*

L'analyse par Western blot révèle une augmentation de la production de la protéine AcrA (d'un facteur 4 à 6) chez touts les mutants *ramR*. En effet, cette augmentation du niveau d'expression de AcrA corrèle bien avec la surexpression du gène *ramA*, suggérant que RamA agit comme activateur de la pompe AcrAB-TolC et étant partiellement responsable du phénotype de la multirésistance. En conclusion, la surexpression du système d'efflux AcrAB semble être due essentiellement à des mutations dans le gène régulateur *ramR* qui induisent, par dé-répression, la surexpression de *ramA*, laquelle va activer l'expression de *acrAB*.