



HAL
open science

La lutte contre la résistance aux anti-infectieux : exemple des polymyxines

Raphaël Duval

► **To cite this version:**

Raphaël Duval. La lutte contre la résistance aux anti-infectieux : exemple des polymyxines. Sciences pharmaceutiques. 2018. hal-03297526

HAL Id: hal-03297526

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03297526v1>

Submitted on 27 Feb 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE

2018

FACULTE DE PHARMACIE

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 26 février 2018

sur un sujet dédié à :

La lutte contre la résistance aux anti-infectieux : Exemple des polymyxines

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Raphaël Emmanuel DUVAL

né le 08/03/1972 à Limoges (87)

Membres du Jury

Président :

Mme Francine PAULUS Doyen, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine

Juges :

Mme Béatrice DEMORE MCU-PH, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine

Mme Chantal FINANCE Doyen Honoraire, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine

Mme Marion GRARE MCU-PH, Faculté de Médecine, Université de Toulouse

UNIVERSITE DE LORRAINE
2018

FACULTE DE PHARMACIE

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 26 février 2018

sur un sujet dédié à :

**La lutte contre la résistance aux anti-infectieux :
Exemple des polymyxines**

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par Raphaël Emmanuel DUVAL

né le 08/03/1972 à Limoges (87)

Membres du Jury

Président :

Mme Francine PAULUS Doyen, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine

Juges :

Mme Béatrice DEMORE MCU-PH, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine
Mme Chantal FINANCE Doyen Honoraire, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine
Mme Marion GRARE MCU-PH, Faculté de Médecine, Université de Toulouse

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2017-2018

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Virginie PICHON

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Conseil de la Pédagogie

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Président, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Président, Raphaël DUVAL

Responsable de la filière Officine

Caroline PERRIN-SARRADO

Julien GRAVOULET

Responsables de la filière Industrie

Isabelle LARTAUD

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable de la filière Hôpital

Béatrice DEMORE

Marie SOCHA

Responsable Pharma Plus ENSIC

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable Pharma Plus ENSAIA

Raphaël DUVAL

Responsable Pharma Plus ENSGSI

Igor CLAROT

Responsable de la Communication

Marie-Paule SAUDER

**Responsable de la Cellule de Formation Continue
et individuelle**

Béatrice FAIVRE

**Responsable de la Commission d'agrément
des maîtres de stage**

François DUPUIS

Responsable ERASMUS

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Jean-Claude BLOCK

Max HENRY

Alain MARSURA

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Michel JACQUE
Pierre LABRUDE
Vincent LOPPINET
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

Jean-Claude CHEVIN
Jocelyne COLLOMB
Bernard DANGIEN
Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN
Marie-Hélène LIVERTOUX
Bernard MIGNOT
Jean-Louis MONAL
Blandine MOREAU
Dominique NOTTER
Christine PERDICAKIS
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Gabriel TROCKLE
Maria WELLMAN-ROUSSEAU
Colette ZINUTTI

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

ENSEIGNANTS

*Section
CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique et Epidémiologie</i>

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique, Audioprothèse</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Biologie cellulaire, Hématologie</i>
Luc FERRARI	86	<i>Toxicologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Frédéric JORAND	87	<i>Eau, Santé, Environnement</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Alexandre HARLE	82	<i>Biologie cellulaire oncologique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Loïc REPPPEL	82	<i>Biothérapie</i>

Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>
 MAITRES DE CONFÉRENCES		
Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Xavier BELLANGER	87	<i>Parasitologie, Mycologie médicale</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Natacha DREUMONT	87	<i>Biochimie générale, Biochimie clinique</i>
Florence DUMARCAY	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	86	<i>Pharmacologie</i>
Reine EL OMAR*	86	<i>Physiologie</i>
Adil FAIZ	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Anthony GANDIN	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Caroline GAUCHER	86	<i>Chimie physique, Pharmacologie</i>
Stéphane GIBAUD	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Thierry HUMBERT	86	<i>Chimie organique</i>
Olivier JOUBERT	86	<i>Toxicologie, Sécurité sanitaire</i>
Alexandrine LAMBERT	85	<i>Informatique, Biostatistiques</i>
Julie LEONHARD	86/01	<i>Droit en Santé</i>
Christophe MERLIN	87	<i>Microbiologie environnementale</i>
Maxime MOURER	86	<i>Chimie organique</i>
Coumba NDIAYE	86	<i>Epidémiologie et Santé publique</i>
Marianne PARENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Francine PAULUS	85	<i>Informatique</i>
Caroline PERRIN-SARRADO	86	<i>Pharmacologie</i>
Virginie PICHON	85	<i>Biophysique</i>
Sophie PINEL	85	<i>Informatique en Santé (e-santé)</i>
Anne SAPIN-MINET	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Marie-Paule SAUDER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Guillaume SAUTREY	85	<i>Chimie analytique</i>
Rosella SPINA	86	<i>Pharmacognosie</i>
Sabrina TOUCHET	86	<i>Pharmacochimie</i>
Mihayl VARBANOV	87	<i>Immuno-Virologie</i>
Marie-Noëlle VAULTIER	87	<i>Mycologie, Botanique</i>
Emilie VELOT	86	<i>Physiologie-Physiopathologie humaines</i>
Mohamed ZAIYOU	87	<i>Biochimie et Biologie moléculaire</i>
 PROFESSEUR ASSOCIE		
Julien GRAVOULET	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Anne MAHEUT-BOSSER	86	<i>Sémiologie</i>
 PROFESSEUR AGREGE		
Christophe COCHAUD	11	<i>Anglais</i>

** En attente de nomination*

**Disciplines du Conseil National des Universités :*

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

D'e ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX
OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

A Mme Francine PAULUS,
Doyen de la Faculté de Pharmacie,
Maître de Conférence des Universités à la Faculté de Pharmacie de Nancy,
Présidente de ce jury de thèse
Pour avoir accepté de présider ce jury
Pour m'avoir poussé à aller jusqu'au bout...

A Mme Béatrice DEMORE,
Maître de Conférence des Universités-Praticien Hospitalier à la Faculté de Pharmacie de Nancy
et au Centre Hospitalier Régional Universitaire de Nancy,
Chef de Service de la Pharmacie à Usage Intérieur du Centre Hospitalier Régional Universitaire
de Nancy,
Chef du Pôle Pharmacie du Centre Hospitalier Régional Universitaire de Nancy,
Directrice de thèse
Pour avoir accepté de diriger cette thèse
Pour votre encadrement, vos conseils, votre disponibilité et votre implication

A Mme Chantal FINANCE,
Doyen Honoraire de la Faculté de Pharmacie de Nancy,
Professeur des Universités-Praticien Hospitalier à la Faculté de Pharmacie de Nancy et au
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Nancy,
Pour avoir été à l'origine de « cette aventure »
Merci d'avoir accepté de juger ce travail, votre présence m'honore

A Mme Marion GRARE,
Maître de Conférence des Universités-Praticien Hospitalier à la Faculté de Médecine de
Toulouse et au Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse,
Pour avoir été mon « coach personnel » en 3^{ème} et 4^{ème} année, et Dieu sait si j'en ai eu besoin !
Merci d'avoir accepté de juger ce travail, la boucle est maintenant bouclée...

Cathy et les filles

A ma Femme, Catherine, qui tous les jours me supporte un peu plus...

A mes Filles : Marianne, Aliénor et Lou-Anne... ma seule fierté

Mes parents

Qui doivent se demander si cela s'arrêtera un jour...

Ma « petite mamie »

La dernière qu'il me reste... La « grand-mamie » qui compte tant...

Mes « frères »

A Yves et Igor, vous étiez déjà dans les remerciements du Doctorat d'Université à Limoges...

C'est loin tout ça... Et dire que nous allons fêter nos 20 ans !!! Comme quoi on vieillit... Enfin certains plus que d'autres...

Le « « labo » »

A Madame le Professeur Finance, à Francine, Béatrice, Mihayl, Hélène (partie, mais qui vient nous revoir de temps en temps),

A Stéphane (parti lui aussi), Stéphanie et Arnaud, dont l'implication (passée et actuelle) en recherche fait que le labo tourne,

A Catherine qui est maintenant notre mémoire sur bien des points,

Aux AHU et ATER qui se sont succédés dans le Service,

Aux étudiants : doctorants (passés et actuels), aux stagiaires de M2, de M1, de Stage Recherche, de Stage d'Initiation à la Recherche, de Licence Professionnelle, de BTS, d'IUT... la liste est longue et non exhaustive depuis 2004, et les nommer tous seraient un challenge ; j'aurai même trop peur d'en oublier certains en chemin...

Je voudrais remercier toutes les personnes de près ou de loin qui m'ont lancé dans cette aventure : reprendre les études de Pharmacie, commencées il y a longtemps maintenant ; sans oublier celles et ceux qui à un moment m'ont donné une « piqure de rappel » (un émérite Professeur de la Faculté de Médecine... par exemple...) et au final m'ont poussé à terminer le travail...

Mais je voudrais aussi remercier celles et ceux qui ne m'ont pas franchement ni aidé, ni soutenu... je n'en dirai pas plus, et je ne nommerai personne... juste dire aux « candidats » qui voudraient suivre le même chemin que j'ai emprunté qu'il est long et difficile ; et d'ajouter qu'il est ô combien important et même réconfortant d'avoir de temps en temps des personnes qui vous soutiennent, voire juste qui vous manifestent un peu d'empathie...

« Was mich nicht umbringt, macht mich stärker » (Friedrich Nietzsche, 1844-1900) ... et pour le moment, force est de constater que je ne suis pas mort...

Il est difficile pour moi, à la fin de cet exercice qui consiste à remercier les gens qui ont compté, de ne pas évoquer le souvenir de Mme Kedzierewicz, tant elle a été présente mais aussi « pressante » sur le fait que je devais soutenir ma Thèse d'Etat de Docteur en Pharmacie... Malheureusement, Mme Kedzierewicz nous a quitté il y a maintenant plus d'un an... et même écrire ces quelques lignes est douloureux tant les souvenirs partagés sont nombreux avec ma « co-locataire »... « Francine, ça y est je l'ai écrite !! » ... *in memoriam*...

*« L'expérience est une lanterne que l'on porte sur le dos et
qui n'éclaire jamais que le chemin parcouru »*

Confucius (551-479 av JC)

Table des Matières

Liste des Figures.....	iii
Liste des Tableaux.....	v
Liste des Abréviations.....	vi
Glossaire.....	vii
Introduction Générale.....	1
Résistance à la colistine : données bibliographiques.....	13
Structure.....	16
Mécanisme d'action.....	18
Mécanisme(s) de résistance à la colistine.....	22
La résistance aux polymyxines chez les <i>Enterobacteriaceae</i>	26
La résistance intrinsèque.....	26
<i>Proteus mirabilis</i>	26
<i>Serratia marcescens</i>	27
<i>Hafnia</i>	28
La résistance acquise chromosomique.....	28
Le LPS : une cible de choix !.....	28
Rôle des systèmes à deux composants PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ dans les modifications du LPS.....	28
<i>Salmonella enterica</i>	28
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	33
<i>Escherichia coli</i>	36
La sous-acylation du Lipide A et son effet sur la résistance aux polymyxines.....	40
<i>Salmonella enterica</i>	40
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40
<i>Escherichia coli</i>	41
Autres modifications au niveau du LPS.....	41
Rôle de la capsule.....	42
Rôle des pompes d'efflux.....	43
Résistance acquise plasmidique.....	44

Epidémiologie de la résistance à la colistine	52
Amérique du Nord.....	53
Amérique du Sud.....	53
Europe	54
Proche Orient	55
Afrique	55
Asie.....	55
Résistance à la colistine : approche expérimentale.....	56
Résistance à la colistine... Quelle(s) stratégie(s) thérapeutique(s) ? Quel(s) antibiotique(s) utiliser ?.....	58
Résistance à la colistine chez <i>Klebsiella pneumoniae</i> ... Et la capsule dans tout ça !?	66
Résistance à la colistine chez <i>Klebsiella pneumoniae</i> ... Sommes-nous capables de détecter rapidement l'émergence de mutants résistants au sein d'une population bactérienne ?.....	75
Conclusion Générale.....	84
Bibliographie.....	88

Liste des Figures

Figure 1 : Les principales causes de mortalité à l'horizon 2050.....	3
Figure 2 : Les 10 « fronts » de la lutte contre la résistance aux antimicrobiens.	4
Figure 3 : Antibiotiques à action systémique, approuvés par la FDA depuis 1983.	6
Figure 4 : Chronologie comparée de la première utilisation des antibiotiques en clinique et de la première description de bactéries résistantes.	8
Figure 5 : Structure des polymyxines.....	16
Figure 6 : Structure générale du LPS.	18
Figure 7 : Structure de la paroi des BGN.	19
Figure 8 : Interactions électrostatiques entre la colistine et le Lipide A du LPS.	20
Figure 9 : Représentation schématique du mécanisme d'action générale de la colistine.	21
Figure 10 : Principales modifications du Lipide A.	23
Figure 11 : Voies d'activation des TCSs PhoP/PhoQ et PmrA/PmrB.	24
Figure 12 : Schéma des différentes voies induisant les modifications du LPS dans la résistance aux polymyxines.	25
Figure 13 : Les TCSs PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ : activation/régulation et impact sur le LPS.	29
Figure 14 : Cartographie des différentes mutations identifiées sur PmrA/PmrB chez <i>Salmonella</i>	29
Figure 15 : Mutations sur PmrA et PmrB et impact sur les valeurs de CMI pour la colistine.	30
Figure 16 : Modifications du LPS induites par les TCS PhoP/PhoQ et PmrA/PmrB retrouvées <i>in vivo</i> chez <i>S. enterica</i> ser. Typhimurium.....	31
Figure 17 : Cartographie des différentes mutations identifiées sur PmrA/PmrB chez <i>Klebsiella</i>	34
Figure 18 : Représentation schématique du locus <i>mgrB</i> chez <i>Klebsiella</i>	35
Figure 19 : Modifications du Lipide A chez <i>Escherichia coli</i>	37
Figure 20 : Les voies de modification du LPS chez <i>Escherichia coli</i>	37
Figure 21 : Voie de biosynthèse du groupement L-Ara4N.	38
Figure 22 : Structure du plasmide pHNSHP45 porteur du gène <i>mcr-I</i>	44
Figure 23 : Localisation des isolats bactériens porteurs du plasmide <i>mcr-I</i> en Chine.	45
Figure 24 : Structure du site catalytique de MCR-1.....	46
Figure 25 : Dissémination du plasmide <i>mcr-I</i> dans le monde.	47

Figure 26 : Etude rétrospective de la présence de <i>mcr-1</i> chez l'animal.....	48
Figure 27 : Comparaison des séquences génétiques portant le gène <i>mcr-1</i>	49
Figure 28 : Séquence de la cassette <i>mcr-1</i>	50
Figure 29 : Epidémies à <i>K. pneumoniae</i> résistante à la colistine et productrice de carbapénémases.	53
Figure 30 : Ultrastructure bactérienne.....	66
Figure 31 : Etude de l'architecture de la capsule de <i>K. pneumoniae</i> à l'échelle nanométrique.	68
Figure 32 : Relation entre la concentration en antibiotique et la sélection de bactéries résistantes au sein d'une population. (Canton et al., 2013).	75
Figure 33 : Profils électrophorétiques de souches de <i>K. pneumoniae</i> sensible ou résistante à la colistine.	78

Liste des Tableaux

Tableau I : Liste des pathogènes prioritaires pour la Recherche et le Développement de nouveaux antibiotiques.....	1
Tableau II : Liste des antibiotiques à action systémique, approuvés par la FDA depuis 1998.	10
Tableau III : Evaluation de l'activité bactéricide et de l'activité bactériostatique des combinaisons antibiotiques à base de colistine.	60

Liste des Abréviations

aa	acides-aminés
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> (ou Microscopie à Force Atomique)
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé
ARN	Acide RiboNucléique
ARNr	Acide RiboNucléique ribosomal
ATCC	<i>American Tissue and Cell Collection</i>
BGN	Bactérie(s) à Gram Négatif
BGP	Bactérie(s) à Gram Positif
C3G	Céphalosporine de 3 ^{ème} Génération
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CNRS	Centre National de la Recherche Scientifique
CPS	<i>Capsular PolySaccharides</i>
CST	Colistin(e)
EPC	Entérobactéries Productrices de Carbapénémases
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HAS	Haute Autorité de Santé
IS	<i>Insertion Sequence</i>
Kdo	acide 3-désoxy- α -D-manno-octo-2-ulosonique
KPC	<i>Klebsiella producing carbapenemases</i>
LAAS	Laboratoire des Architectures et Systèmes
L-Ara4N	4-amino-4-désoxy-L-arabinose
LPS	Lipopolysaccharide
mcr-X	<i>plasmid-Mediated Colistin Resistance</i> (number X)
MDR	<i>Multi-Drug Resistant</i>
NDM	<i>New Dehli Metallo β-lactamase</i> (β -lactamase de classe B)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ONU	Organisation des Nations Unies
OXA	Oxacillinase (β -lactamase de classe D)
PAM	Peptides AntiMicrobiens
PAMc	Peptides AntiMicrobiens cationiques

pb	paire de base
PEtN	Phosphoéthanolamine
PMBN	<i>PolyMyxin B Nonapeptide</i>
R&D	Recherche & Développement
SARM	Staphylococcus Aureus Résistant à la Méricilline
SRSMC	Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes
TCSs	<i>Two Component Systems</i> (Systèmes à deux composants)
TMP	Triméthoprim
TMP/SMX	Triméthoprim/Sulfaméthoxazole (ou Cotrimoxazole)
UDP	Uridine DiPhosphate
UK	<i>United Kingdom</i>
UL	Université de Lorraine
UMR	Unité Mixte de Recherche
USI	Unité de Soins Intensifs
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VIM	<i>Verona new Integron-borne Metallo-β-lactamase</i> (β-lactamase de classe B)

Glossaire

G20 : le G20 regroupe 20 membres : Afrique du Sud, Allemagne, Arabie Saoudite, Argentine, Australie, Brésil, Canada, Chine, Corée du Sud, États-Unis, France, Inde, Indonésie, Italie, Japon, Mexique, Royaume-Uni, Russie, Turquie, Union européenne. Ses Etats membres représentent 85% du PIB mondial, deux tiers de la population mondiale, 75% du commerce mondial, 80% de l'investissement global, 92% des dépenses mondiales en R&D.

<https://www.diplomatie.gouv.fr/fr/politique-etrangere-de-la-france/diplomatie-economique-et-commerce-exterieur/peser-sur-le-cadre-de-regulation-europeen-et-international-dans-le-sens-de-nos/faire-de-la-regulation-internationale-un-atout-pour-l-economie-francaise/article/qu-est-ce-que-le-g20>

INTRODUCTION GENERALE

Le lundi 27 février 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) publiait sur son site officiel (OMS, 2017a) une liste de **12 bactéries** dont le niveau de résistance aux antibiotiques est tel, qu'elles représentent une réelle menace pour la santé humaine ; et qu'il est maintenant **urgent d'agir**.

L'OMS a réparti ces 12 bactéries en 3 groupes en fonction de leur criticité (Tableau I) :

Tableau I : Liste des pathogènes prioritaires pour la Recherche et le Développement de nouveaux antibiotiques.

(OMS, 2017b)

« Urgence critique »

- ✓ *Acinetobacter baumannii*, résistant aux carbapénèmes
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa*, résistant aux carbapénèmes
- ✓ Entérobactéries, résistant aux carbapénèmes + céphalosporine de 3^{ème} génération (C3G)

« Urgence élevée »

- ✓ *Enterococcus faecium*, résistant à la vancomycine
- ✓ *Staphylococcus aureus*, résistant à la méticilline, résistant ou intermédiaire à la vancomycine
- ✓ *Helicobacter pylori*, résistant à la clarithromycine
- ✓ *Campylobacter spp.*, résistant aux fluoroquinolones
- ✓ *Salmonella spp.*, résistant aux fluoroquinolones
- ✓ *Neisseria gonorrhoeae*, résistant aux C3G + aux fluoroquinolones

« Urgence moyenne »

- ✓ *Streptococcus pneumoniae*, sensibilité diminuée à la pénicilline
- ✓ *Haemophilus influenzae*, résistant à l'ampicilline
- ✓ *Shigella spp.*, résistant aux fluoroquinolones

Au-delà de l'ambiguïté que nous pouvons avoir à la lecture de « Entérobactéries, résistantes aux carbapénèmes + C3G », il est frappant de constater que cette liste souligne tout particulièrement la menace que représentent les bactéries à Gram négatif (BGN), et pointe du

doigt plus précisément les Entérobactéries. En effet, sur les 12 bactéries, 9 sont des BGN : *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, Entérobactéries, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Shigella spp.* ; et parmi ces 9, 4 appartiennent à la Famille des *Enterobacteriaceae*. Et ce rapport de force est « clairement » sous-estimé puisque par « Entérobactéries, résistantes aux carbapénèmes + C3G » il convient de comprendre/inclure *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.* et autres *Proteus spp.*... « résistants aux carbapénèmes + C3G »... *De facto*, ce « rapport de force » est donc clairement en faveur des BGN, mais aussi et surtout en faveur des *Enterobacteriaceae*. *In fine*, cette liste souligne la réelle menace que représentent les BGN qui ont développé des compétences remarquables leur permettant de « trouver de nouveaux moyens de résister aux traitements et (de) transmettre le matériel génétique permettant à d'autres bactéries de devenir elles aussi résistantes. » (OMS, 2017a). Pour finir, parmi ses propositions pour lutter contre ce qu'il convient d'appeler l'antibiorésistance, l'OMS insiste sur la nécessité d'**intensifier la recherche et le développement sur les nouveaux antibiotiques**, même si elle précise dans le même temps que : « *la recherche-développement (de nouveaux antibiotiques) ... ne résoudra pas à elle seule le problème* » de la résistance, ou multirésistance, aux antibiotiques chez les bactéries.

Ce communiqué de l'OMS n'est pas le premier. Il y en a eu d'autres, du même genre et provenant d'autres sources.

En 2016, le rapport « Tackling Drug-Resistant Infections Globally : Final Report and Recommendations » était remis à David Cameron, alors Premier Ministre du Royaume Uni (O'Neill, 2016). Ce rapport était le fruit d'un immense travail réalisé par la Commission Indépendante « Review on Antimicrobial Resistance », un groupe d'experts créé et soutenu par l'initiative conjointe du « Wellcome Trust » (une fondation de charité en Médecine) et du « UK Department of Health (soit l'équivalent du « Ministère de la Santé » pour nous Français). Ce groupe de travail avait pour mission (i) d'analyser d'un point de vue global, l'augmentation de la résistance aux anti-infectieux et (ii) de proposer des actions concrètes pour lutter contre une résistance « galopante » au niveau mondial (AMR, 2016). La particularité de ce groupe de travail est qu'il réunissait plusieurs dizaines d'experts de tous pays et de tous horizons, mais pas uniquement des microbiologistes, des épidémiologistes ou des infectiologues... non. Nous trouvons aussi des économistes, spécialistes ou non de la Santé, comme Jim O'Neill, Président de cette Commission. La présence de personnes « naïves » en Infectiologie ou dans le domaine

de la Santé, était une volonté clairement affichée au départ, pour essayer d'apporter des nouvelles propositions pour « tacler » l'antibiorésistance.

Une des données fortes qui ressort de ce rapport est qu'à l'horizon 2050, le nombre de morts attribuables à la résistance aux anti-infectieux approcherait le nombre « astronomique » de 10 millions de personnes par an !! Soit plus que les accidents de la route, que le diabète et même le cancer !! (Figure 1) ... Ou, pour essayer d'avoir une idée plus précise, rayerait de la carte des pays comme la Suède, la République Tchèque ou le Portugal en une seule année... (EUROSTAT, 2016).

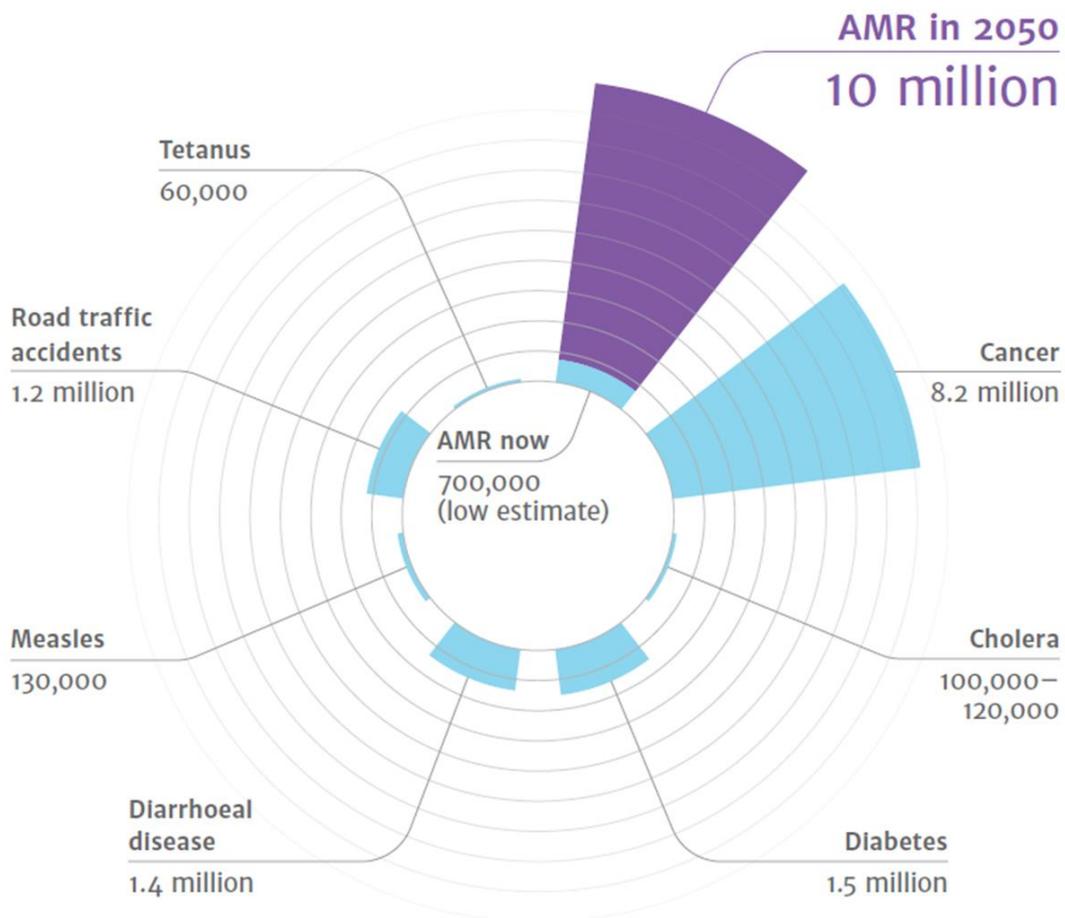


Figure 1 : Les principales causes de mortalité à l'horizon 2050.
(O'Neill, 2016).

Mais le rapport O'Neill ne s'est pas limité à dresser un bilan que certains jugeraient (à tort) alarmant ou alarmiste. Il a été aussi force de proposition et a identifié 10 actions majeures (ou « Ten Fronts ») pour lutter contre la résistance aux antimicrobiens (Figure 2).



Figure 2 : Les 10 « fronts » de la lutte contre la résistance aux antimicrobiens.
(O'Neill, 2016)

Ces 10 actions sont les suivantes :

1. Une campagne d'information massive et mondiale de sensibilisation du public ;
2. Améliorer l'hygiène et prévenir la propagation des infections ;
3. Réduire l'utilisation (inutile) des antimicrobiens dans l'agriculture et leur diffusion dans l'environnement ;
4. Améliorer la surveillance mondiale (i) de la résistance aux anti-infectieux et (ii) de la consommation des antimicrobiens chez l'Homme et chez l'Animal ;
5. Promouvoir des tests diagnostiques nouveaux et rapides pour arrêter le plus rapidement possible l'utilisation des antibiotiques ;
6. Promouvoir le développement et l'utilisation des vaccins et d'alternatives (thérapeutiques) ;
7. Améliorer le nombre, la rémunération et la reconnaissance des personnes travaillant dans les maladies infectieuses ;
8. Établir un fonds d'innovation mondial pour la recherche pré-clinique et non commerciale ;
9. Mieux inciter à promouvoir l'investissement pour de nouveaux médicaments et à améliorer ceux existants ;
10. Construire une coalition mondiale pour une action réelle - *via* le G20 et l'ONU.

Il est bien évident que je ne commenterai pas les points d'action proposés par le rapport O'Neill et surtout pas le 7^{ème} point de cette liste... Mais il est quand même frappant de constater, si on y regarde d'un peu plus près, que la lutte contre l'antibiorésistance ne se limite pas à un seul domaine en Santé (tous sont concernés : Homme, Animal et Environnement) ; à un seul domaine d'activité en Recherche (tous sont concernés : nouvelles molécules, nouvelles alternatives, nouvelles méthodes diagnostiques) ... Non, au contraire... Au contraire !! Ce qu'il faut « dégager », « extraire » du rapport O'Neill, c'est que la lutte contre l'antibiorésistance est l'affaire de tous et de chacun ! Quelle que soit notre activité professionnelle, notre niveau social, ou que sais-je... Et pour reprendre (et détourner) un slogan que nous entendons beaucoup dans les médias en ce moment : nous sommes « tous concernés, tous responsables » pour ne pas être un jour « tous touchés » par l'antibiorésistance...

Comment en sommes-nous arrivés là ?

L'antibiorésistance est un phénomène complexe et relativement ancien qui est la conséquence de plusieurs facteurs.

Le premier facteur est la chute vertigineuse qu'a connu la recherche et le développement de nouvelles molécules antibactériennes. En effet, nous pouvons constater que depuis le début des années 1980, le nombre de nouveaux antibiotiques mis sur le marché n'a cessé de diminuer, et ce de façon assez régulière et drastique (Figure 3) ; pour atteindre le nombre critique de seulement 2 spécialités approuvés par la FDA pour la période 2008-2012, soit 5 ans !! Depuis, nous observons un net rebond, mais au final trompeur... Nous verrons un peu plus loin pourquoi...

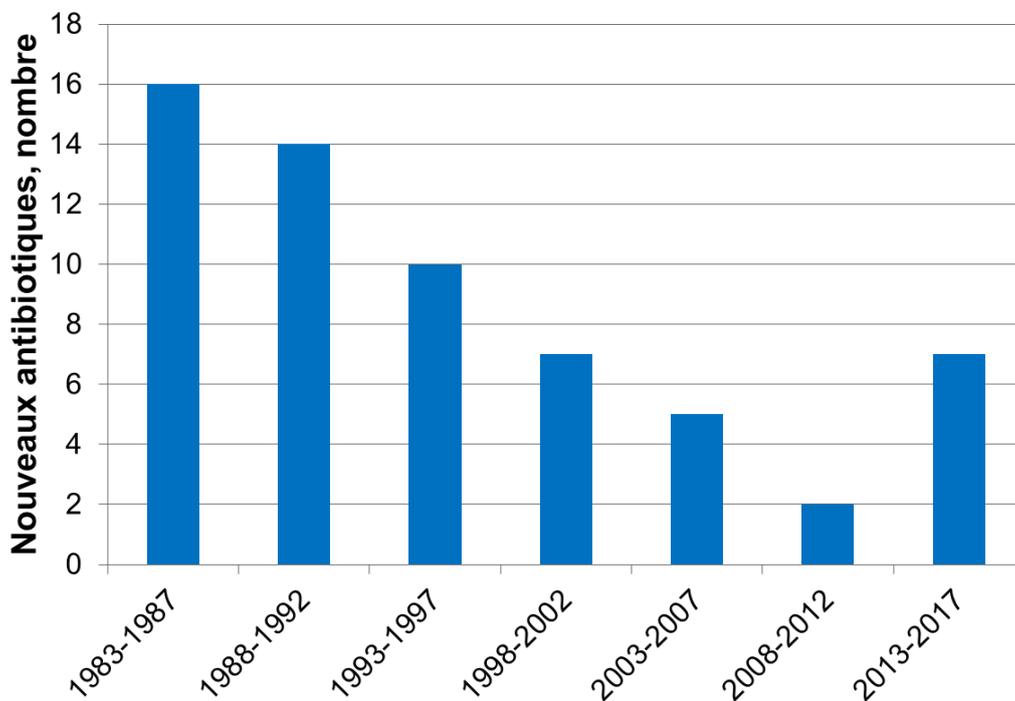


Figure 3 : Antibiotiques à action systémique, approuvés par la FDA depuis 1983.

D'après (Boucher et al., 2013 ; FDA, 2017a ; FDA, 2017b)

Mais revenons à cette diminution des nouveaux antibiotiques sur le marché, comment pouvons-nous l'expliquer ?

Au début des années 1980, la recherche et développement sur les antibiotiques connaît son apogée ; pratiquement tous les laboratoires pharmaceutiques, quels qu'ils soient, ont une activité dans le domaine de la recherche sur les antibiotiques. Tant est si bien que nous sommes face à un paradoxe : il y a beaucoup de nouveaux antibiotiques, mais en fait il y en a trop. Tellement trop qu'il est difficile pour un laboratoire pharmaceutique de lancer sur le marché de nouvelles molécules et surtout qu'elles soient rentables ! De fait, de nombreux laboratoires

arrêtent, purement et simplement cette activité de R&D. Le leitmotiv est simple : il y a assez de molécules pour traiter les différents types d'infection auxquels les cliniciens sont confrontés. Il apparaît vital pour les industries pharmaceutiques d'orienter leur département R&D vers de nouveaux marchés/débouchés.

Malheureusement, ce phénomène va être amplifié par trois évènements :

- Le premier, à partir des années 1970-1980, on commence à voir des rachats, des fusions, des absorptions... se généraliser au sein des entreprises chimiques/pharmaceutiques, avec la création de sociétés toujours « plus grosses » pour faire face à la concurrence. En France, nous pouvons citer les exemples de Rhône Poulenc, Synthélabo ou Sanofi. Mais cela va avoir aussi pour conséquence d'accélérer la fermeture de secteurs de R&D et l'abandon de molécules en cours de développement... Ces secteurs de R&D auront même quasiment tendance à disparaître des sociétés pharmaceutiques qui vont externaliser cette activité de R&D vers des start-ups. En effet, le département de R&D est (souvent) jugé trop risqué et surtout pas assez rentable, rapidement. Il nécessite beaucoup de moyens (y compris humains) et en général on estime à 10 années (*a minima*) le délai entre la découverte et la mise sur le marché d'un nouvel antibiotique... En espérant qu'il n'y ait pas de mauvaises surprises en cours de route. Ce mouvement de désengagement des industries pharmaceutiques dans le domaine de la recherche des antibiotiques ne cessera de s'accélérer à partir des années 1990... (Grare, 2009 ; Trémolières et al., 2005).
- Le deuxième va directement « booster » le désengagement des industries pharmaceutiques. Il est lié à l'avènement d'un changement radical dans la politique, la gestion de l'antibiothérapie au niveau des établissements de santé : la rationalisation de la prescription des antibiotiques dans l'optique d'aboutir à un juste usage des antibiotiques.
- Enfin le troisième est lié, toujours à la même époque, à la découverte du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) qui devient très rapidement une urgence mondiale. De fait, de très nombreuses compagnies pharmaceutiques vont (ré)orienter leur département de R&D vers la recherche de molécules antirétrovirales et délaisser la recherche de nouveaux antibiotiques. Il n'y a qu'à recenser le nombre de molécules différentes pour le traitement de patients séropositifs pour le VIH. Attention, qu'il n'y ait pas de mauvaises interprétations, je veux seulement dire que je ne suis pas convaincu que, parmi toutes les molécules qui sont disponibles pour le traitement du VIH, toutes soient utiles ou nécessaires. Et je pense plus particulièrement à certains inhibiteurs

nucléosi(ti)diques de la reverse transcriptase, même si cette famille de molécules antirétrovirales a encore toute sa place dans la prise en charge des patients séropositifs pour le VIH...

Le deuxième facteur est l'apparition et la dissémination des bactéries résistantes, voire multirésistantes aux antibiotiques.

Je passerai assez rapidement sur la « prophétie » de Sir Alexander Fleming, à qui on prête (à tort) la découverte de la pénicilline, mais qui a eu quand même le mérite, très tôt, de nous mettre en garde sur la capacité que possédaient les bactéries à devenir résistantes aux antibiotiques. Et force est de constater que l'Histoire lui a donné raison. Si nous observons la Figure 4, nous pouvons assez facilement nous rendre compte de la facilité, et surtout de la rapidité avec laquelle les bactéries sont capables de devenir résistantes à un antibiotique après son introduction en clinique... Globalement et en moyenne, il faut moins de 10 ans (et je reste très optimiste) à une bactérie pour devenir résistante à un antibiotique.

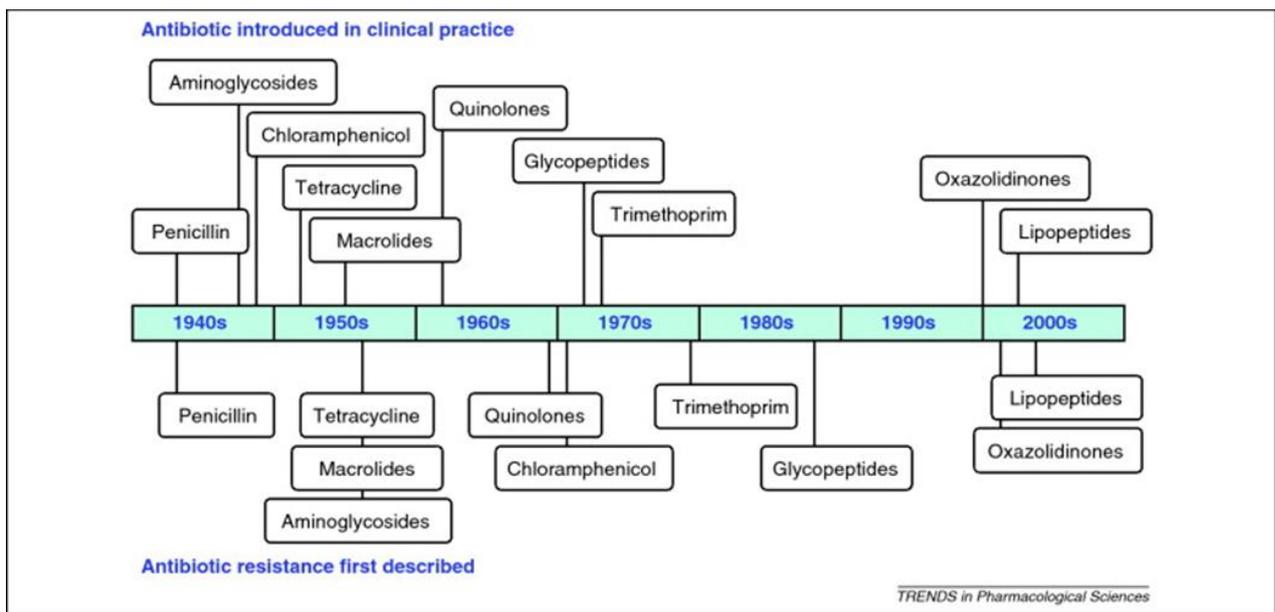


Figure 4 : Chronologie comparée de la première utilisation des antibiotiques en clinique et de la première description de bactéries résistantes.

En haut la période à laquelle les familles d'antibiotiques ont été mises sur le marché.
En bas la période à laquelle les premières résistances aux antibiotiques ont été observées chez les bactéries (Högberg et al., 2010).

Pendant longtemps cette situation est restée assez confidentielle, presque anecdotique. Ce n'est qu'à la fin des années 1980 qu'une prise de conscience est apparue. Elle était la conséquence de l'apparition de la résistance aux glycopeptides (principalement à la Vancomycine) chez les Entérocoques (Johnson et al., 1990). En effet, ce mécanisme de résistance est (majoritairement) porté par un plasmide, et le risque tenait à son possible transfert aux Staphylocoques : il n'y aurait alors plus eu d'alternative thérapeutique pour la prise en charge des infections à *Staphylococcus aureus* Résistants à la Méricilline (les fameux SARM) qui déjà à l'époque étaient source d'inquiétudes, principalement sur le continent Nord-Américain.

Il s'agit du premier cas d'antibiorésistance pour lequel il y a eu réellement une inquiétude et donc une prise de conscience : si les Staphylocoques devenaient résistants à la Vancomycine (et par extension aux Glycopeptides) c'était le début de la fin.

Cet événement est important à plus d'un titre car il est à la base d'un des tous premiers déséquilibres, d'une des toutes premières erreurs dans la lutte contre l'antibiorésistance : la focalisation de la recherche (i.e. industrielle, mais pas que) pour la découverte de nouvelles molécules anti-infectieuses avec un spectre très étroit ; ici en l'occurrence des molécules anti-staphylococciques (voire par extension des molécules anti-bactéries à Gram positif).

En effet si nous regardons le Tableau II, nous pouvons constater que depuis 1998, il y a toujours un nombre important de nouveaux antibiotiques à large spectre ; mais dans le même temps, les molécules possédant un spectre étroit sont uniquement des molécules dirigées contre les bactéries à Gram positif (BGP), pour ne pas dire uniquement anti-staphylococciques, créant ainsi un net déséquilibre.

Tableau II : Liste des antibiotiques à action systémique, approuvés par la FDA depuis 1998.
(d'après : Boucher et al., 2013 ; FDA, 2017a ; FDA, 2017b ; Theuretzbacher, 2015)

Antibacterial	Year approved	Novel Mechanism ?	Spectra
Rifapentine	1998	No	-
Quinupristin/dalfopristin	1999	No	BGP
Moxifloxacin	1999	No	BGP-BGN
Gatifloxacin*	1999	No	BGP-BGN
Linezolid	2000	Yes	BGP
Cefditoren pivoxil	2001	No	BGP-BGN
Ertapenem	2001	No	BGN-BGP
Gemifloxacin*	2003	No	BGP-BGN
Daptomycin	2003	Yes	BGP
Telithromycin*	2004	No	BGP
Tigecycline	2005	Yes	BGP-BGN
Doripenem*	2007	No	BGN-BGP
Telavancin	2009	Yes	BGP
Ceftarolin fosamil	2010	No	BGP-BGN
Ceftolozane-tazobactam	2014	No	BGN-BGP
Tedizolid	2014	No	BGP
Oritavancin	2014	No	BGP
Dalbavancin	2014	No	BGP
Ceftazidime-avibactam	2015	No	BGN
Meropenem-vaborbactam	2017	No	BGP-BGN
Delafloxacin	2017	No	BGP-BGN

* : retiré du marché nord-américain

Nous pouvons donc faire le constat qu'il y a très peu de molécules avec un spectre étroit dirigé contre les BGN. Même si les choses semblent évoluer favorablement ces dernières années. Mais comme je l'ai dit plus haut ces éléments sont trompeurs. En effet, si on y regarde de plus près, nous pouvons constater qu'il y a très peu de nouveaux antibiotiques innovants, i.e. avec un nouveau mécanisme d'action. La R&D reste cantonnée à des familles déjà existantes... Et il y a fort à parier que si nous n'amenons pas d'innovation, si nous ne découvrons pas de nouvelles molécules antibiotiques avec un nouveau mécanisme d'action, la lutte contre l'antibiorésistance risque d'être longue et (très) difficile...

Nous sommes donc face à un constat dramatique : les BGN sont annoncées comme une menace, elles sont de plus en plus résistantes, les infections à BGN multirésistantes sont de plus en plus nombreuses et nous avons de moins en moins d'options thérapeutiques pour lutter contre ces bactéries/infections.

Cette situation d'urgence absolue a amené, obligé les cliniciens à se tourner vers d'anciennes molécules, comme la colistine, pour traiter des infections à BGN multirésistantes ; permettant, au moins pour un temps, de continuer à prendre en charge des patients (Stein & Raoult, 2002 ; Falagas & Michalopoulos, 2006 ; Biswas et al., 2012). La colistine (comme d'autres antibiotiques) a alors été qualifiée d'antibiotique de la dernière chance ou de dernier recours (Jacquier et al., 2012 ; Velkov et al., 2010)... Malheureusement, et très rapidement, les premières BGN résistantes à la colistine sont apparues un peu partout dans le Monde, y compris en Europe. Les premiers cas sont principalement et en premier lieu apparus en Europe Centrale et dans le Sud de l'Europe : Hongrie, Grèce, Italie, Espagne... (Toth et al., 2010 ; Kontopoulou et al., 2010 ; Neonakis et al., 2010 ; Mezzatesta et al., 2011 ; Mammina et al., 2012 ; Capone et al., 2013). Cette évolution faisait alors craindre le pire, une situation qui était encore inimaginable 20 ou 30 ans en arrière : l'impasse thérapeutique... Et c'est à partir de ce moment-là qu'est apparue dans la littérature la notion d'une « ère post-antibiotique » (Falagas & Bliziotis, 2007) avec un risque réel de renvoyer l'Homme à l'Age de Pierre, en tout cas en ce qui concerne les maladies infectieuses et principalement les infections d'origine bactérienne... L'OMS estimait alors qu'il était urgent d'agir... (OMS, 2014).

C'est au travers de cet exemple, i.e. la colistine, que j'ai choisi d'aborder le phénomène de l'antibiorésistance, mais aussi (et surtout) les moyens qui peuvent être employés afin de mieux comprendre, caractériser un mécanisme de résistance, pour mieux lutter contre.

Cette thèse s'articulera donc en 2 grandes parties. La première partie présentera les données les plus récentes sur l'état des lieux des connaissances sur la résistance à la colistine, tant d'un point de vue épidémiologique, que mécanistique (i.e. l'étude des mécanismes de résistance). La seconde partie portera quant à elle sur différents travaux qui ont été réalisés au laboratoire, seuls ou en collaboration avec d'autres d'équipes de recherche, sur la résistance la colistine à travers la présentation de 3 publications internationales et qui illustreront justement les moyens qui peuvent être utilisés pour étudier un mécanisme de résistance à un antibiotique mais aussi lutter

contre ce mécanisme de résistance. Enfin, je terminerai ce manuscrit par une courte conclusion pour essayer de garder espoir dans la lutte qui nous oppose à l'antibiorésistance...

RESISTANCE A LA COLISTINE :
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

Comme nous l'avons vu en Introduction Générale, (i) la très forte augmentation de la multi-résistance aux antibiotiques chez les bactéries, et en particulier chez les BGN ; (ii) l'émergence et la dissémination de souches résistantes voire multirésistantes, comme les Entérobactéries résistantes aux carbapénèmes ; et (iii) l'absence de nouvelles molécules avec un spectre anti-BGN, ont contraint les cliniciens à se tourner vers d'anciennes molécules comme la colistine.

Ce très net regain d'intérêt pour la colistine, qui a été alors qualifié de traitement de dernier recours ou de la dernière chance (Biswas et al., 2012 ; Falagas et al., 2010 ; Stein & Raoult 2002 ; Velkov et al., 2010) a eu plusieurs (mauvaises) conséquences... Premièrement, l'augmentation de l'utilisation de la colistine pour le traitement d'infections causées par des BGN-MDR (nous parlerons ici principalement des Entérobactéries) s'est accompagnée d'une très nette augmentation du nombre de souches résistantes à la colistine chez les espèces normalement sensibles (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*...). Cette situation est d'ailleurs devenue particulièrement préoccupante dans certains pays du Sud de l'Europe, comme la Grèce (Kontopidou et al., 2011 ; Neonakis et al., 2010) ou l'Italie (Parisi et al., 2015) du fait de l'explosion des Entérobactéries Productrices de Carbapénémase (EPC) et par conséquent, l'utilisation massive de la colistine comme seule possibilité de réponse des cliniciens pour faire face à ces situations. Deuxièmement, dans le même temps, une augmentation des infections causées par des bactéries naturellement résistantes à cet antibiotique, telles que *Serratia*, *Morganella*, *Proteus* et *Providencia*, a aussi été constatée (Hayakawa et al., 2012 ; Merkier et al., 2013 ; Samonis et al., 2014) faisant apparaître des situations infectieuses jusque là inédites, ou très rares...

La cible de la colistine est lipopolysaccharide (LPS) des BGN ; le principal mécanisme de résistance à la colistine est donc naturellement lié à des modifications du LPS. Ces modifications du LPS peuvent être nombreuses ; elles étaient jusqu'alors le résultat de variations d'expression de gènes chromosomiques impliqués dans les voies de biosynthèse du LPS. Je dis « étaient jusqu'alors », car très récemment, une équipe internationale a identifié pour la première fois un mécanisme de résistance acquise à la colistine d'origine plasmidique !! (Liu et al., 2016). Ce plasmide, porteur du gène *mcr-1*, a été retrouvé chez plusieurs souches d'*E. coli* ou *K. pneumoniae* principalement d'origine animale, mais aussi humaine. Pour être tout à fait complet, et pour illustrer la vitesse phénoménale à laquelle les bactéries peuvent s'adapter et insister encore plus sur l'urgence de la situation ; en 2016, un deuxième gène plasmidique, *mcr-2*, a été identifié (Xavier et al., 2016) ; en 2017, un troisième gène

plasmidique, *mcr-3* (Yin et al., 2017) et selon toute vraisemblance cela ne fait que commencer... (Kluytmans, 2017).

Cette première partie a pour objectif de présenter rapidement le mécanisme d'action de la colistine, de faire le point sur les différents mécanismes de résistance à la colistine (aux polymyxines) qui ont été identifiés à ce jour. Enfin nous clorons cette partie par un rapide point sur l'épidémiologie de la résistance à la colistine.

Structure

La colistine est un antibiotique polypeptidique de la famille des polymyxines. La famille des polymyxines comprend actuellement 2 composés utilisés en thérapeutique : la polymyxine B et la polymyxine E (ou colistine). Ces polymyxines ont été isolées à partir de *Bacillus polymyxa* var *colistinus* en 1947 (Hancock, 1997 ; Biswas et al., 2012).

Les polymyxines sont des « grosses » molécules avec une masse moléculaire d'environ 1200 Da. Les polymyxines ont une structure assez caractéristique en forme de « lasso », avec une boucle constituée de 7 acides-aminés (aa) et une chaîne latérale constituée de 3 aa, sur laquelle est lié de façon covalente un acide gras (Figure 5).

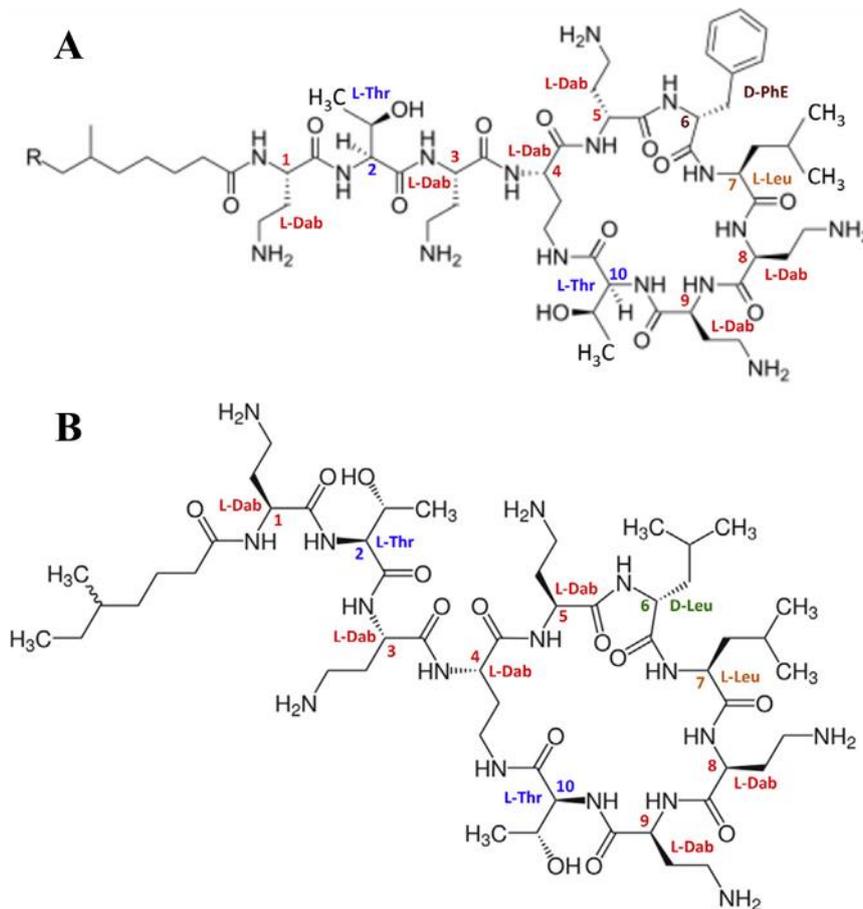


Figure 5 : Structure des polymyxines.

(A) polymyxine B et (B) polymyxine E (ou colistine) ;
 Polymyxine B (si R=H \Rightarrow polymyxine B1, R=CH₃ \Rightarrow polymyxine B2)
 (Dortet et al., 2016).

Les polymyxines sont par conséquent des molécules amphiphiles, avec une partie hydrophile qui correspond aux groupements amines libres ; et une partie lipophile qui est principalement due à la présence de l'acide gras au bout de la chaîne tripeptidique, mais aussi aux aa en position 6 et 7 (Figure 5) (Velkov et al., 2010).

La seule différence qui existe entre la colistine et la polymyxine B se situe au niveau de l'aa en position n°6 : chez la colistine il s'agit d'une D-leucine, tandis que chez la polymyxine B il s'agit d'une D-phénylalanine (Figure 5) (Velkov et al., 2010).

Mécanisme d'action

La cible de la colistine est le lipopolysaccharide (LPS), un composant majeur de la membrane externe des BGN. Il est composé de trois entités synthétisées séparément : le Lipide A, le « core » (inner et outer) et l'antigène O (Figure 6).

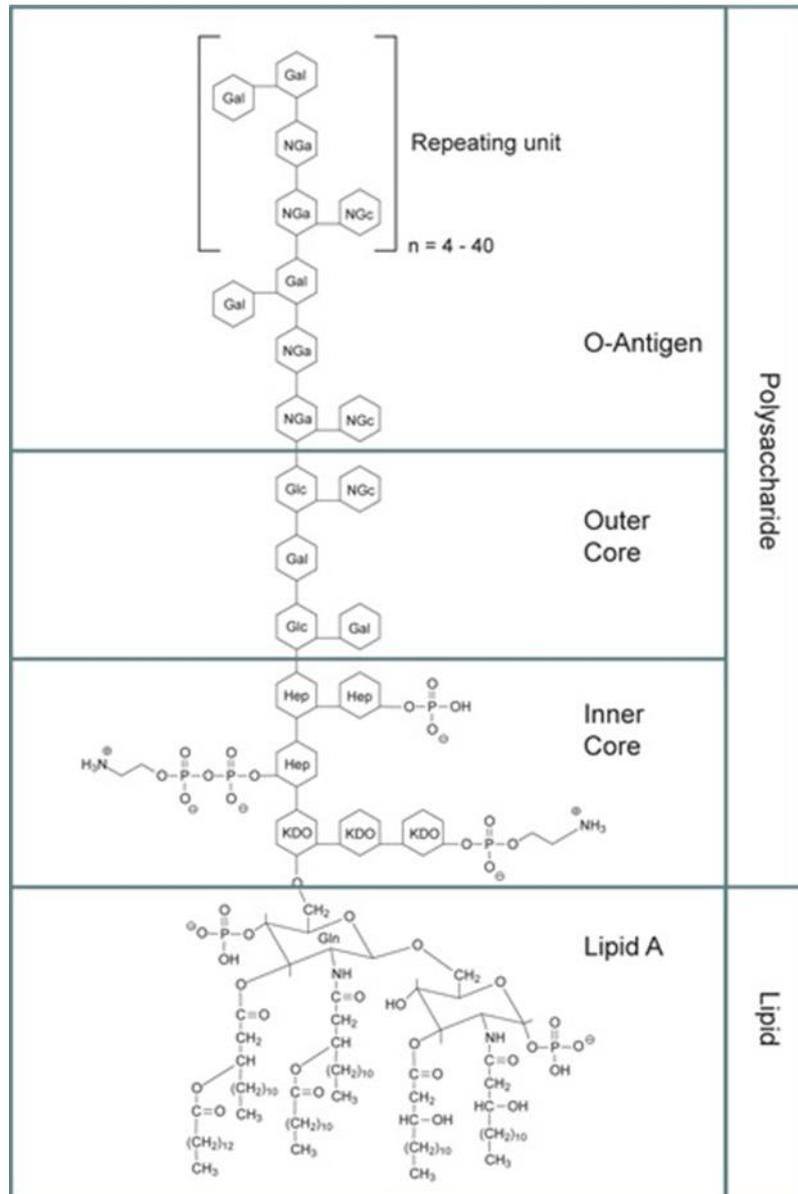


Figure 6 : Structure générale du LPS.

KDO : acide 3-désoxy- α -D-manno-octo-2-ulosonique ; Hep : Heptulose (ou heptose) ; Nga : Galactosamine ; NGc : Glucosamine (SIGMA, 2008).

Le Lipide A, enchâssé dans la membrane externe, représente la partie proximale du LPS, « le core », sa partie médiane, et l'antigène O, sa partie distale « libre » dans le milieu extérieur.

Chez les Entérobactéries, le Lipide A et le « core » sont fortement conservés tandis que l'antigène O est la région hypervariable. Le Lipide A est un phospholipide, composé d'une glucosamine et de chaînes d'acide gras, qui sert de point d'ancrage au LPS dans la membrane externe des BGN (Figure 7).

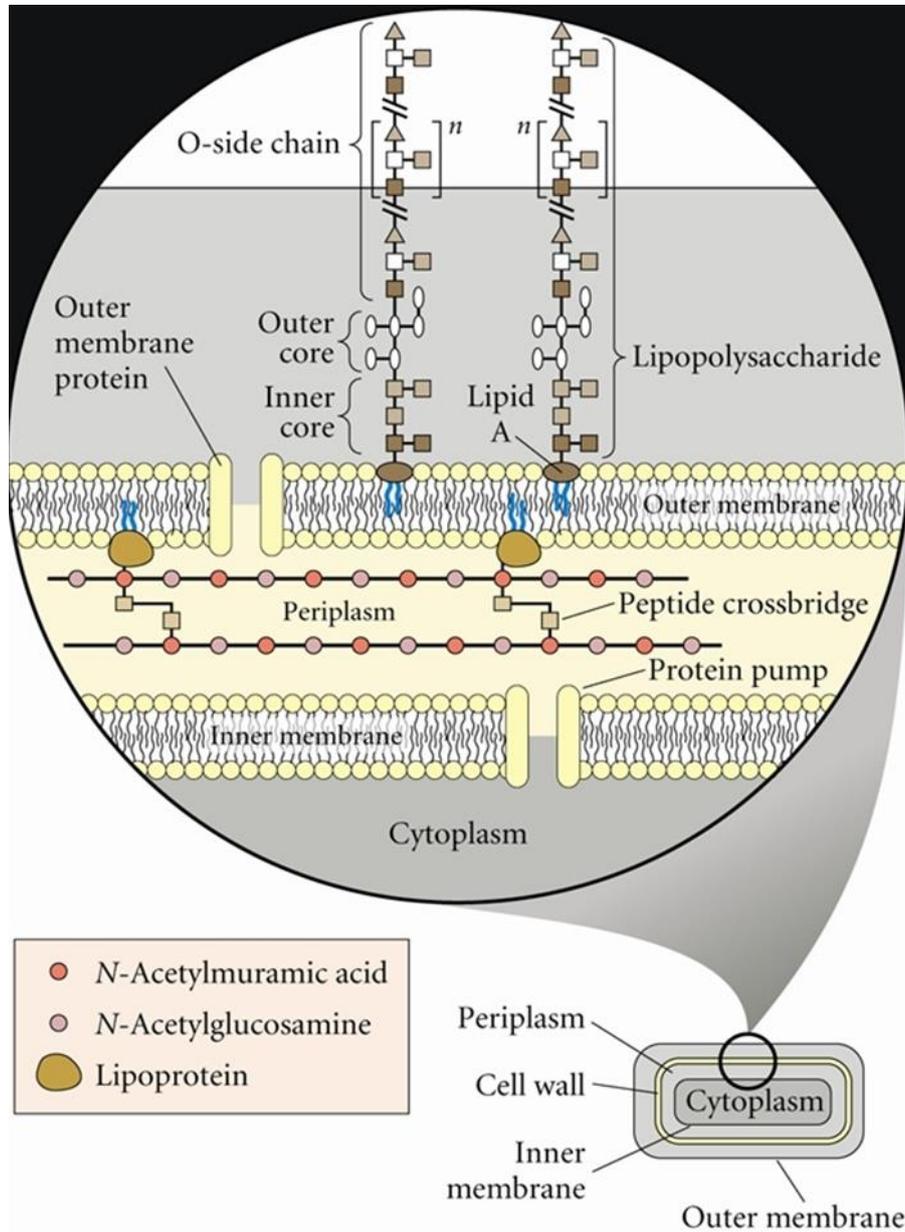


Figure 7 : Structure de la paroi des BGN.

(PPD, 2010).

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, la colistine possède plusieurs groupements amines libres (5 au total) qui vont lui conférer une charge globale positive. Par

conséquent, la colistine est un polypeptide cationique. Mais grâce à ses charges positives, la colistine va pouvoir interagir (i.e. interactions électrostatiques) avec le LPS, et plus précisément le Lipide A qui lui, à l'inverse, possède une charge anionique (Figure 8).

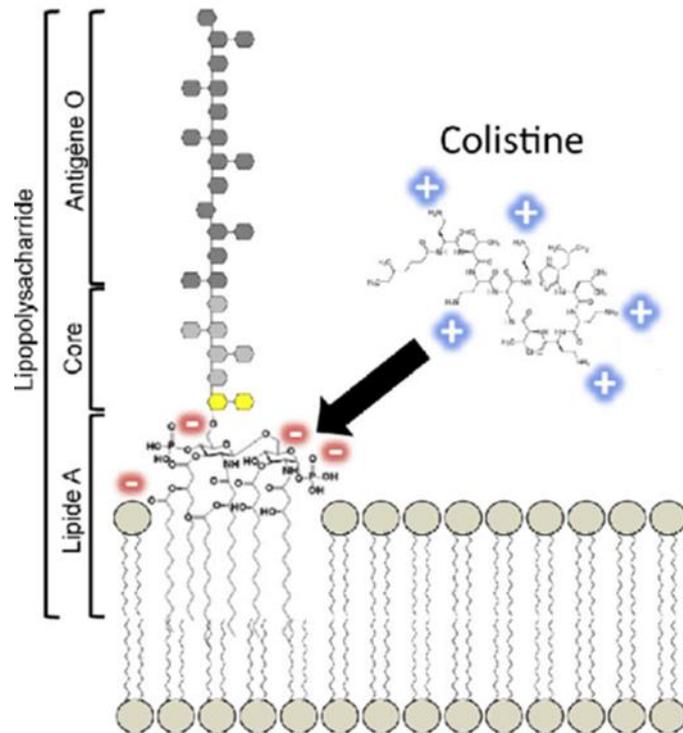


Figure 8 : Interactions électrostatiques entre la colistine et le Lipide A du LPS.
(Dortet et al., 2016).

Le Lipide A joue un rôle majeur dans la stabilisation, dans l'organisation de la membrane externe des BGN. Grâce à ses groupements phosphate (qui lui confèrent sa charge négative), le Lipide A interagit avec des cations divalents : magnésium (Mg^{2+}) et le calcium (Ca^{2+}), présents à la surface de la membrane externe (Hancock, 1997 ; Falagas & Kasiakou, 2005). Les ions Mg^{2+} et Ca^{2+} forment alors des « ponts » entre les molécules de LPS et permettent ainsi la stabilisation de la membrane externe (Nikaido, 2003 ; Raetz & Whitfield, 2002). Une fois liée au Lipide A, la colistine va entrer en compétition avec les ions Mg^{2+} et Ca^{2+} . Cette compétition aboutit à un déplacement de ces cations et entraîne une perturbation locale de la membrane externe des BGN (Figure 9). Cette perturbation se « propage » dans la paroi des BGN et provoque : (i) une augmentation de la perméabilité des membranes externe et cytoplasmique,

(ii) une fuite du contenu cytoplasmique et enfin (iii) la mort de la bactérie (Figure 9) (Li et al., 2006).

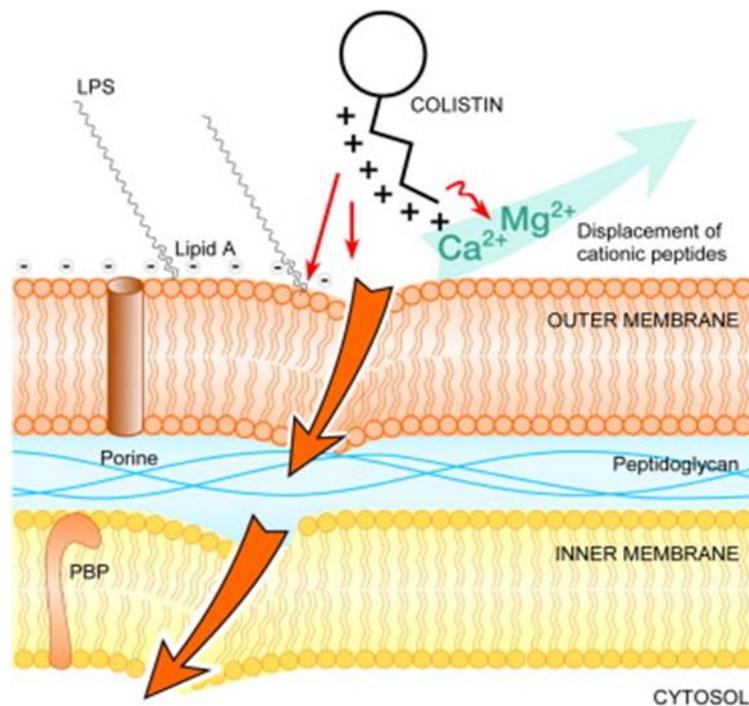


Figure 9 : Représentation schématique du mécanisme d'action générale de la colistine.
(Martis et al., 2014).

La colistine est donc un antibiotique bactéricide.

Post-scriptum

Quelques travaux ont aussi suggéré que le mécanisme d'action de la colistine pouvait être dû à la production de radicaux libres (Yu et al., 2015). Nous pouvons citer à titre d'exemple les travaux de Sampson et collègues menés sur *Acinetobacter baumannii* (Sampson et al., 2012). Mais ces travaux restent « confidentiels » et à l'heure actuelle, le mécanisme reposant sur la lyse des membranes bactériennes demeure (pour une majorité de chercheurs) la voie « principale » (Dortet et al., 2016).

Enfin, pour être complet, la colistine possède aussi une activité antitoxinique (Falagas & Kasiakou, 2005).

Mécanisme(s) de résistance à la colistine

Comme nous l'avons vu précédemment, l'augmentation des infections causées par des bactéries à Gram-négatif (BGN) multirésistantes aux antibiotiques (ou « multidrug resistance » (MDR)) (BGN-MDR), en particulier les bactéries résistantes aux carbapénèmes comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*, a conduit à un très net regain d'intérêt pour les polymyxines (et plus particulièrement la colistine) qui sont alors devenues le traitement de dernier recours (Stein & Raoult, 2002 ; Falagas & Michalopoulos, 2006 ; Biswas et al., 2012). Mais la résistance aux polymyxines chez des bactéries normalement sensibles est alors apparue (Johansen et al., 2008 ; Arduino et al., 2012 ; Mammina et al., 2012). En outre, l'augmentation des infections causées par des bactéries naturellement résistantes aux polymyxines, telles que *Proteus*, *Providencia*, *Morganella* et *Serratia*, ont aussi été rapportées (Hayakawa et al., 2012 ; Merkier et al., 2013 ; Samonis et al., 2014).

Les bactéries utilisent plusieurs moyens pour se protéger des stimuli environnementaux délétères, comme l'exposition aux peptides antimicrobiens (PAM) cationiques, tels que la colistine. Ces stratégies correspondent majoritairement à des altérations du lipopolysaccharide (LPS), qui possède une charge globale négative et représente la cible première de la colistine (Moffatt et al., 2010) (Figure 10 A). Ces modifications peuvent être obtenues de différentes façons : modifications covalentes de la fraction Lipide A du LPS par addition de phosphoéthanolamine (PEtN) et de 4-amino-4-désoxy-L-arabinose (L-Ara4N), désacylation, hydroxylation et palmitoylation par *pagP* (la palmitoylation existe mais ne contribue pas à la résistance aux polymyxines) (Ernst et al., 2001 ; Raetz et al., 2007) (Figure 10 B).

D'autres stratégies reposent sur l'utilisation de pompe d'efflux ou sur la présence de la capsule (Campos et al., 2004 ; Padilla et al., 2010).

La modification du LPS la plus fréquente est sans conteste l'addition du L-Ara4N sur les groupements phosphate du Lipide A, ce qui diminue la charge nette négative du Lipide A à 0. La deuxième modification la plus fréquente est l'addition du groupement PEtN qui elle diminue la charge nette de -1,5 à -1 (Nikaido, 2003). La modification de charge induite par l'addition de L-Ara4N est la plus efficace en raison de la nature de la modification de charge. Cette modification de charge produit un LPS « modifié » avec une affinité de liaison pour la colistine nettement diminuée, ce qui aboutit à la résistance.

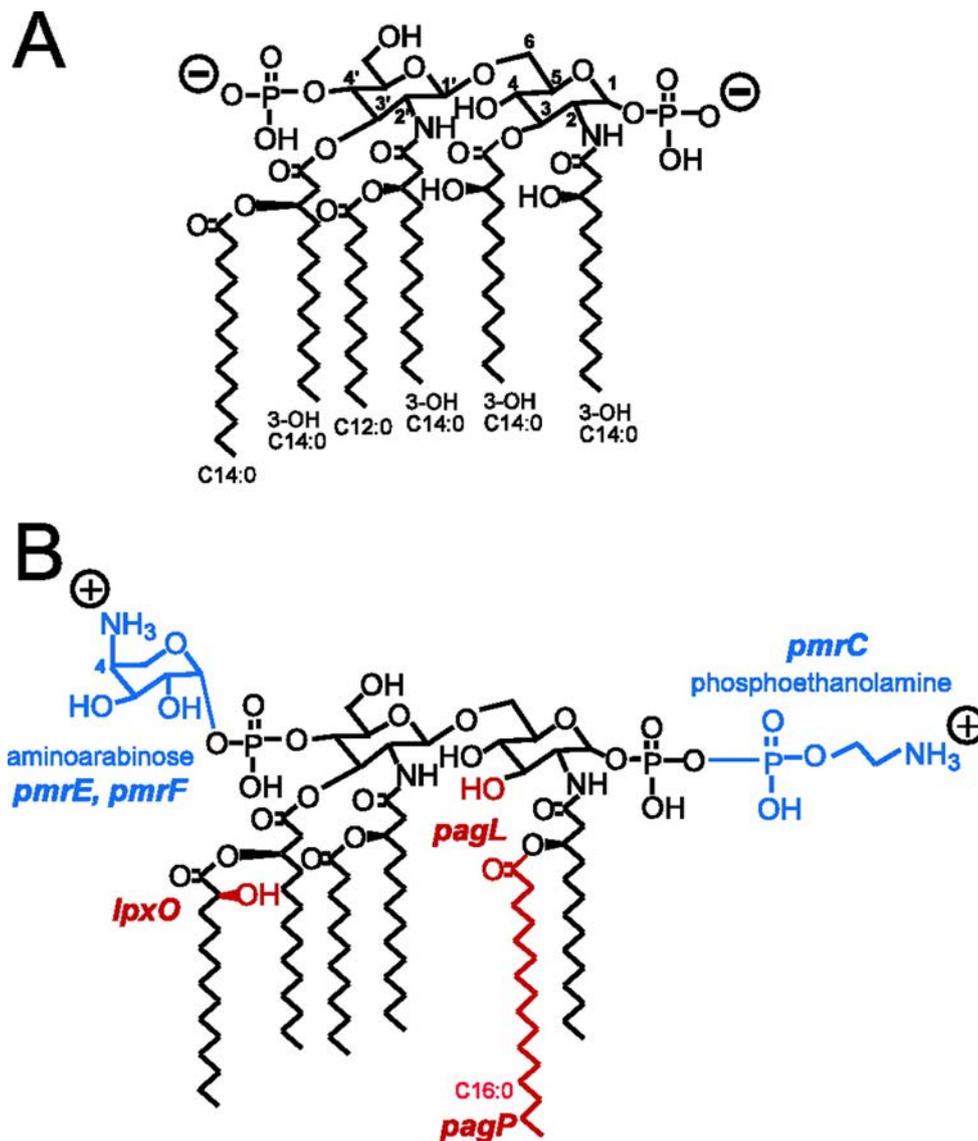


Figure 10 : Principales modifications du Lipide A.

(A) Structure du Lipide A « sauvage » de *S. enterica* serovar Typhimurium.

(B) Ensemble des modifications covalentes pouvant être retrouvées sur un Lipide A d'une souche de *S. enterica* serovar Typhimurium résistante à la colistine (Kawasaki et al., 2007).

L'activation des systèmes à deux composants (TCSs) impliquant PhoP/PhoQ et PmrA/PmrB est déclenchée : soit par des stimuli environnementaux, soit par des mutations spécifiques au sein des TCS qui entraînent leur activation constitutive et leur surexpression subséquente des gènes modifiant le LPS (Gunn et Miller, 1996 ; Gunn et al., 2000 ; Trent et al., 2001b ; Abraham et Kwon, 2009 ; Barrow et Kwon, 2009 ; Miller et al., 2011) (Figure 11).

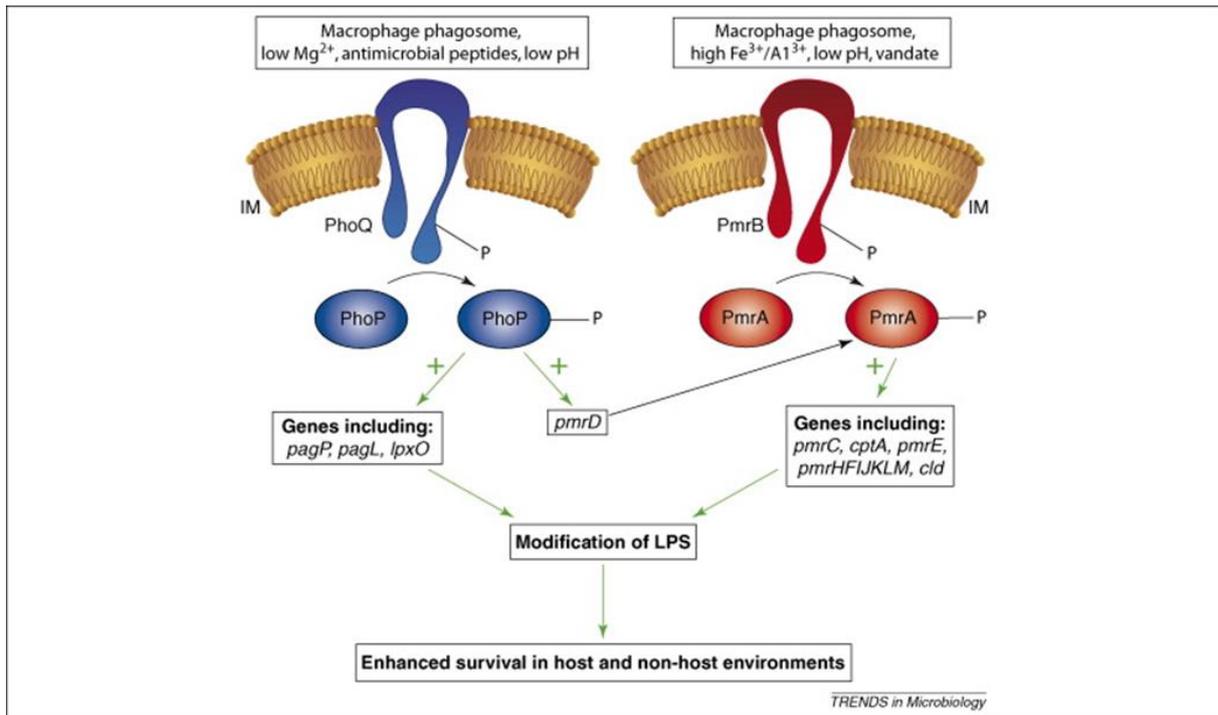


Figure 11 : Voies d'activation des TCSs PhoP/PhoQ et PmrA/PmrB.

Modèle de l'activation et de l'interaction des TCSs PhoPQ et PmrAB chez *Salmonella* spp.

PmrAB peut être activé soit indirectement *via* PhoPQ et PmrD soit directement, suite à l'activation par autophosphorylation de PmrB puis la phosphorylation de PmrA. La phosphorylation de PmrA améliore sa liaison aux promoteurs cibles. En détectant l'activation des signaux environnementaux, PhoPQ induit la transcription de plusieurs gènes, y compris *pmrD*, dont le produit se lie à et stabilise PmrA dans son état phosphorylé. Cette boucle peut être désactivée par la répression transcriptionnelle de *pmrD* par PmrA. PmrB peut détecter directement les stimuli environnementaux et déclencher une cascade de phosphorylation aboutissant à l'activation de PmrA (Gunn, 2008).

L'activation du TCS PmrA/PmrB conduit à la régulation positive des opérons *pmrCAB* et *arnBCADTEF-pmrE* (également appelés *pmrHFIJKLM-ugd*) (Figure 12) qui sont responsables de la synthèse et du transfert sur le Lipide A des groupements PEtN et L-Ara4N (Gunn, 2001 ; Raetz et al., 2007 ; Yan et al., 2007). Le TCS PhoP/PhoQ est connu pour contribuer à la résistance aux polymyxines en activant indirectement le TCS PmrA/PmrB *via* PmrD, sauf chez quelques bactéries, telles que *E. coli* (Kox et al., 2000 ; Kato et al., 2003 ; Winfield et Groisman, 2004). Une fois activée, la protéine PmrA phosphorylée se lie à la région promotrice de l'opéron *arnBCADTEF*, augmentant la reconnaissance et la liaison de l'ARN polymérase et entraînant une régulation positive de l'opéron (Wosten et Groisman, 1999).

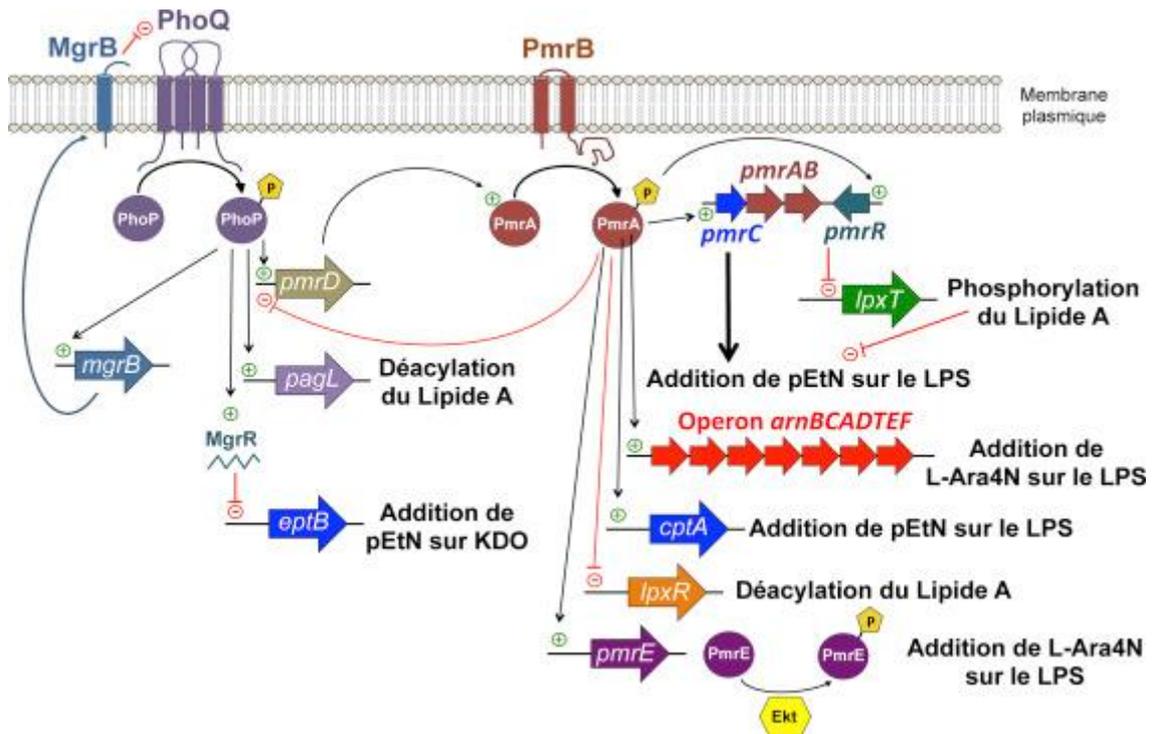


Figure 12 : Schéma des différentes voies induisant les modifications du LPS dans la résistance aux polymyxines.

(Dortet et al., 2016)

Dans la suite du document nous nous intéresserons aux mécanismes de résistance à la colistine qui ont été décrits chez les *Enterobacteriaceae*. Nous ne développerons pas les mécanismes qui ont été décrits chez les BGN non fermentants, telles que *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*...

La résistance aux polymyxines chez les *Enterobacteriaceae*

La résistance intrinsèque

Au sein de la famille des Entérobactéries plusieurs genres/espèces sont connus pour être naturellement résistants aux polymyxines : *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* (les trois étant désignés collectivement sous le nom de « tribu des *Proteeae* »), *Serratia* spp. et *Edwardsiella tarda* (Muyembe et al., 1973 ; Rozalski et al., 1997 ; Biswas et al., 2012 ; Samonis et al., 2014). La plupart de ces bactéries naturellement résistantes, possèdent un LPS modifié par addition du groupement L-Ara4N, ce qui explique le phénotype de résistance intrinsèque à la colistine (Basu et al., 1986 ; Boll et al., 1994 ; Vinogradov et al., 2006).

Proteus mirabilis

Le Lipide A et les résidus Kdo du LPS de *Proteus mirabilis* (phénotype sauvage) sont connus pour posséder des groupements L-Ara4N (Sidorczyk et al., 1983 ; Boll et al., 1994). En outre, chez les souches mutantes de *P. mirabilis*, sensibles aux polymyxines, on ne retrouve généralement pas de groupements L-Ara4N au niveau du LPS ; et de la même façon, les mutants qui présentent une résistance réduite aux polymyxines en contiennent moins (Kaca et al., 1990 ; McCoy et al., 2001). Enfin, il a été démontré que le génome de *P. mirabilis* contenait le gène *eptC*, qui est impliqué dans la modification des LPS via l'addition de PEtN (Aquilini et al., 2014).

Des études de mutagenèse dirigée, via l'utilisation de transposon, ont été réalisées pour obtenir des mutants sensibles aux polymyxines, et ainsi mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de la résistance aux polymyxines chez *P. mirabilis*. Plusieurs *loci* putatifs pouvant être impliqués directement ou indirectement dans les mécanismes de modification du LPS ont pu ainsi être identifiés. Nous pouvons citer, par exemple, l'opéron *sap* (qui code une protéine de transport), le gène de l'ATPase et un gène putatif codant une O-acétyltransférase (probablement impliquée dans la biosynthèse ou le transfert du groupement amino-arabinose) (McCoy et al., 2001).

Le gène *galU* (impliqué dans la biosynthèse L-Ara4N) et un TCS appelé *rppA/rppB*, qui montre d'importantes similitudes avec les TCSs *pmrA/pmrB* et *phoP/phoQ* et qui peut activer l'opéron *arnBCADTEF*, ont aussi récemment été identifiés comme pouvant jouer un rôle dans la résistance aux polymyxines chez *P. mirabilis* (Wang et al., 2008 ; Jiang et al., 2010a,b).

L'inactivation de l'un de ces gènes chez *P. mirabilis* aboutit à un phénotype « polymyxine-sensible » (Wang et al., 2008 ; Jiang et al., 2010a,b).

Autres exemples, l'inactivation des gènes *PpmrI* (homologue à l'*arnA* de *S. enterica* serovar Typhimurium) et *rppA* (homologue à la fois *pmrA* et *phoP* de *S. enterica* serovar Typhimurium) chez *P. mirabilis* entraîne une augmentation d'un facteur 10240 et 160, la sensibilité à la polymyxine B, par rapport à la souche parente de *P. mirabilis* de phénotype sauvage (Wang et al., 2008 ; Jiang et al., 2010b).

En outre, l'analyse génomique de *Morganella morganii* qui est naturellement résistante à la colistine, et de surcroît étroitement liée au genre *Proteus*, a révélé que cette bactérie possédait un opéron *arnBCADTEF* et un gène *eptB*, les 2 étant bien connus pour être responsables de l'addition des groupements L-Ara4N ou PEtN au niveau du LPS (Olaitan et al., 2014a). Le génome de *M. morganii* contient également la plupart des gènes, tels que les TCSs *rppA/rppB* et *phoP/phoQ*, qui ont été identifiés dans la résistance intrinsèque aux polymyxines chez *P. mirabilis* (Olaitan et al., 2014a). Il est donc plus que probable que les bactéries de la tribu *Proteae* possèdent toutes les mêmes mécanismes de résistance aux polymyxines.

Serratia marcescens

L'inactivation des gènes *arnB* et *arnC*, qui font partie de l'opéron *arnBCADTEF*, aboutit à une sensibilité aux polymyxines chez *Serratia marcescens* (Lin et al., 2014). Ainsi, il a été montré que les mutants *arnB* et *arnC* présentent une augmentation très forte de la sensibilité à la polymyxine B avec une chute des valeurs de CMI de 2048 (pour le type « sauvage » de *S. marcescens*) à 2 mg/L (pour les mutants). Cet opéron a également été identifié comme étant régulé par *phoP*, i.e. le régulateur du TCS *phoP/phoQ* (Lin et al., 2014). Ainsi, ces observations tendent à démontrer que ces modifications du LPS sont, pour tout ou partie, responsables de la résistance intrinsèque aux polymyxines chez *S. marcescens*.

Au final, il semble que l'opéron *arnBCADTEF* soit exprimé de façon constitutive chez les bactéries intrinsèquement résistantes. Mais la principale question qui reste en suspens est : pourquoi cela n'est vrai que pour ces deux genres bactériens ? Il apparaît donc nécessaire de continuer à explorer ce mécanisme et plus particulièrement chez les autres Entérobactéries résistantes aux polymyxines.

Hafnia

Très récemment, une étude menée par Jayol et coll tend à démontrer que le genre *Hafnia* serait lui aussi naturellement résistant à la colistine (Jayol et al., 2017). Cette étude a été réalisée sur 15 souches de *H. alvei* et 10 souches de *H. paralvei*. La sensibilité/résistance à la colistine a été déterminée à l'aide de 5 techniques différentes : la microméthode en milieu liquide, les bandelettes Etest, la méthode des disques, le Rapid Polymyxin NP Test et une technique automatisée (Phoenix). Au final, cette étude suggère que, compte tenu (i) du niveau élevé de résistance à la colistine retrouvé chez ces souches (notamment à l'aide de la microméthode en milieu liquide, la méthode de référence) et (ii) de la proximité génétique du genre *Hafnia* avec les genres *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* et *Serratia* (étude comparative des ARNr 16S) ; le genre *Hafnia* serait lui aussi naturellement résistant à la colistine (Jayol et al., 2017).

La résistance acquise chromosomique

Le LPS : une cible de choix !

Rôle des systèmes à deux composants PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ dans les modifications du LPS.

Salmonella enterica

Salmonella enterica serovar Typhimurium a été utilisée comme bactérie modèle pour la plupart des études portant sur la compréhension des mécanismes de résistance aux peptides antimicrobiens (PAM) cationiques, y compris les polymyxines. Ainsi, Vaara et coll. ont observé que le LPS chez une souche de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mutée au niveau de *pmrA* (i.e. résistante aux polymyxines) possède 4 à 6 fois plus de groupement L-Ara4N au niveau du Lipide A que la souche parente. En outre, une augmentation du taux de PEtN a été aussi observée chez ce mutant (Vaara et al., 1981 ; Trent et al., 2001b). Chez les souches de *Salmonella* résistantes aux polymyxines, le mécanisme qui a été identifié comme étant principalement responsable de ces modifications, implique des mutations au niveau des TCSs PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ (Figure 13).

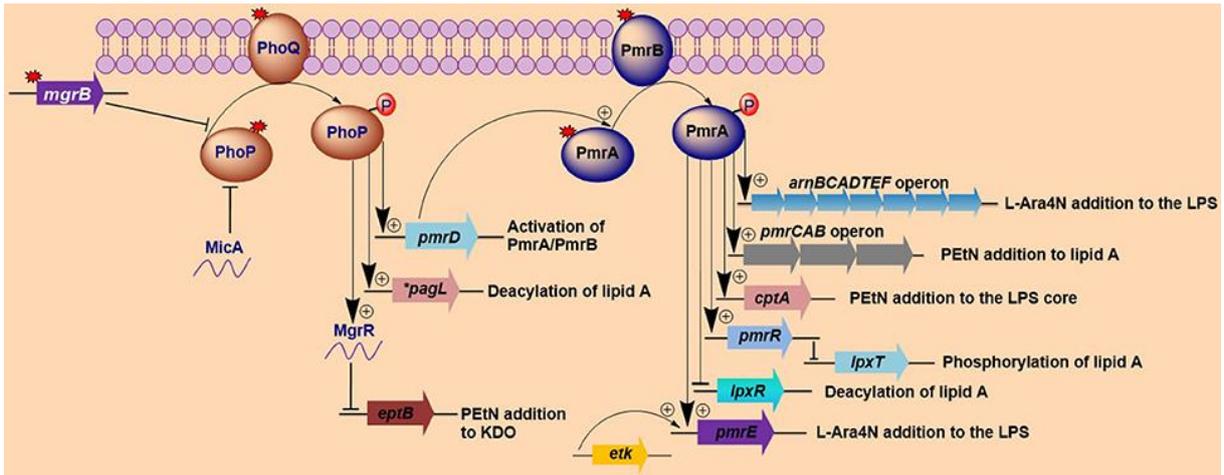


Figure 13 : Les TCSs PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ : activation/régulation et impact sur le LPS. (Olaitan et al., 2014c)

Des mutations au niveau de ces TCSs peuvent provoquer leur surexpression constitutive, entraînant l'activation des opérons *arnBCADTEF* et *pmrCAB* et *de facto*, la modification du Lipide A par addition soit de L-Ara4N, soit de PEtN (Figure 13) (Roland et al., 1993 ; Guo et al., 1997 ; Gunn et al., 1998 ; Zhou et al., 2001 ; Lee et al., 2004). *In vitro*, plusieurs mutations activatrices du TCS PmrA/PmrB ont été identifiées chez les mutants *Salmonella enterica* serovar Typhimurium résistants aux polymyxines (Figure 14).

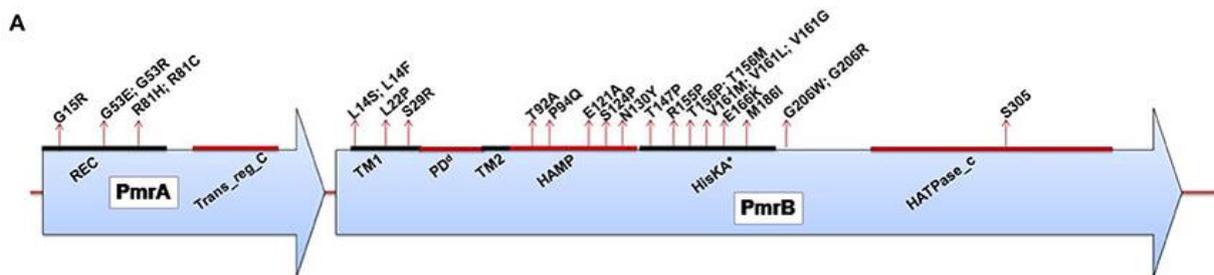


Figure 14 : Cartographie des différentes mutations identifiées sur PmrA/PmrB chez *Salmonella*.

(Olaitan et al., 2014c)

Nous pouvons, par exemple, citer les premiers travaux de Roland et coll. qui ont identifié la mutation faux-sens responsable de la substitution R81H dans *pmrA* (Roland et al., 1993). Par la suite, une analyse génétique poussée du TCS *pmrA/pmrb* chez des mutants spontanément « colistine-résistant » a permis d'identifier de nombreuses autres mutations. Au total, 26 mutations faux-sens différentes au niveau des gènes *pmrA* et *pmrB* ont été identifiées. Toutes se traduisent par une augmentation de l'expression du gène *arnB* (ou *pmrH*) (Sun et al., 2009).

Les CMI pour la colistine, chez ces mutants, varient de 0,25 à 4,4 mg/L, ce qui correspond, en fonction des souches, à une augmentation de 20 à 30 fois la CMI (Figure 15).

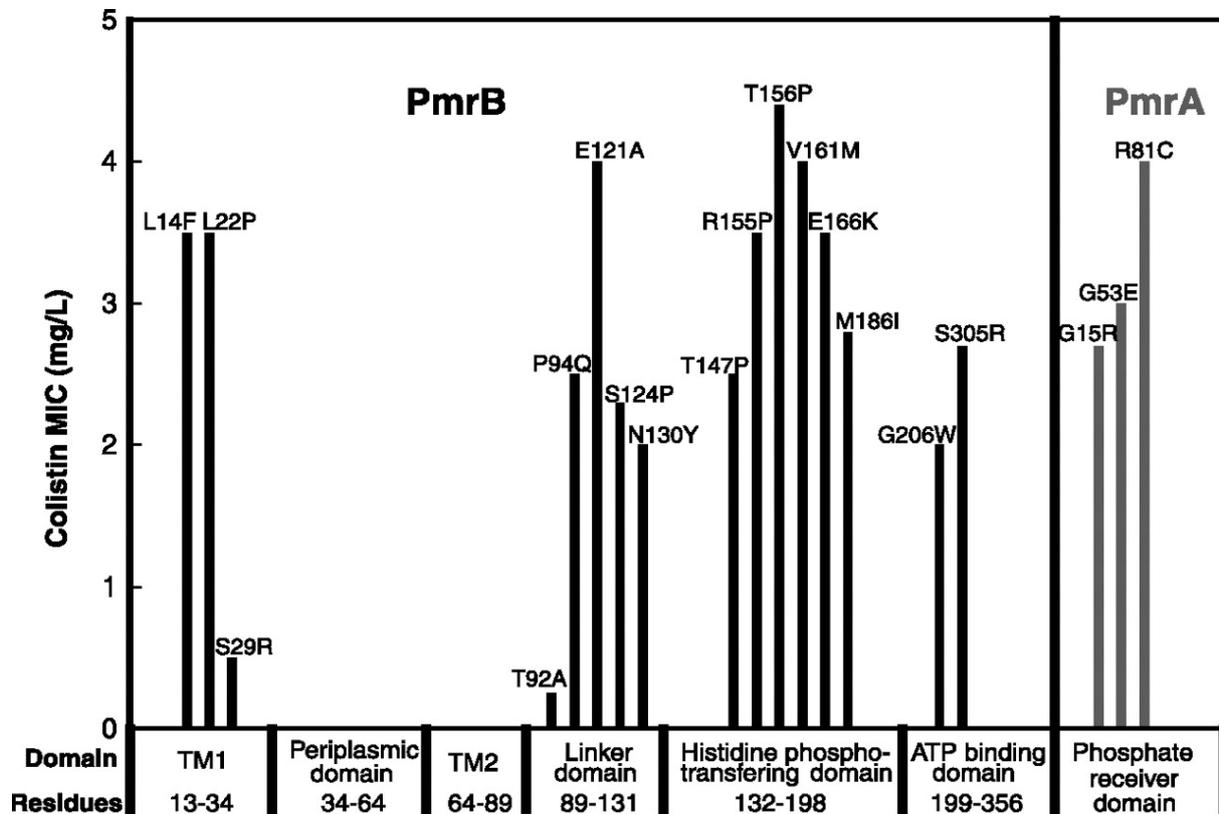


Figure 15 : Mutations sur PmrA et PmrB et impact sur les valeurs de CMI pour la colistine.

Localisation des différentes mutations sur PmrA et PmrB conférant un phénotype « colistine résistance » chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium et impact sur les valeurs de CMI à la colistine (Sun et al., 2009).

De façon remarquable, il apparaît que pour PmrA, toutes les mutations sont retrouvées au niveau du domaine de liaison du phosphate, tandis que les mutations au niveau de PmrB sont plus dispersées (Figure 15).

Le gène *pmrB* qui code une histidine kinase, semble être plus fréquemment muté par rapport au *pmrA* gène régulateur de la réponse. Cependant, toutes les mutations faux-sens de *pmrA/pmrb* n'entraînent pas systématiquement leur activation constitutive et par conséquent la résistance aux polymyxines. En effet, certaines de ces mutations faux-sens (i.e. n'induisant pas la résistance aux polymyxines) ont été observées dans le TCS *pmrA/pmrb* chez divers sérotypes de *Salmonella* (Agero et al., 2012).

Chez des mutants *pmrA* de *S. enterica* ser. Typhimurium, il a été observé que jusqu'à 88% des groupements 4'-phosphate du Lipide A pouvaient être modifiés par addition de groupement L-

Ara4N (Helander et al., 1994). En règle générale, le groupement L-Ara4N est ajouté sur le résidu 4'-phosphate, tandis que le groupement PEtN est lui ajouté au niveau du résidu le 1-phosphate. Cependant, dans certains cas, l'addition de 1 ou 2 groupements L-Ara4N et/ou PEtN peuvent être ajoutés sur le résidu 4'-phosphate ou le résidu 1-phosphate du Lipide A (Figure 16) (Zhou et al., 2001 ; Lee et al., 2004).

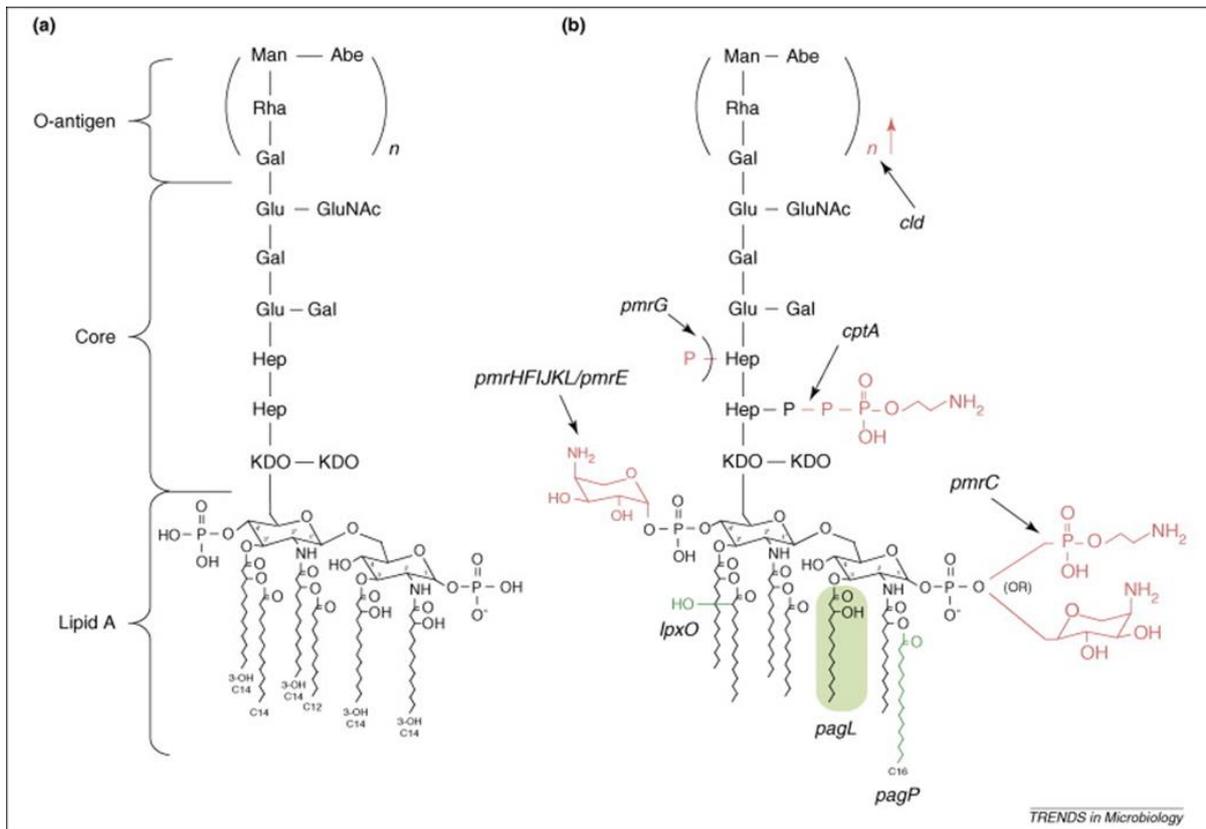


Figure 16 : Modifications du LPS induites par les TCS PhoP/PhoQ et PmrA/PmrB retrouvées *in vivo* chez *S. enterica* ser. Typhimurium.

(a) LPS "sauvage" (non muté) et (b) LPS muté, retrouvé chez les souches *S. enterica* ser. Typhimurium résistantes à la colistine. Le LPS peut être modifié par des mécanismes régulés soit par PhoP/PhoQ (en vert) soit par PmrA/PmrB (en rouge) (Gunn, 2008).

Ces deux modifications sont contrôlées par l'opéron *arnBCADTEF* ou l'opéron *pmrC* (aussi appelé *eptA*). En outre, le résidu d'heptose-I phosphorylé (au niveau du core du LPS) peut lui aussi être modifié par addition du groupement PEtN *via* le gène *cptA* (Tamayo et al., 2005a) (Figure 16). Chez *Salmonella*, les opérons *arnBCADTEF* (aussi appelé opéron *pmrF* ou opéron *arnT*), *pmrC* et *cptA* sont tous régulés par *pmrA* (Tamayo et al., 2005b) (Figure 13). Ces

modifications (addition des groupements L-Ara4N ou PEtN) au niveau des résidus phosphate du LPS sont responsables de la perte d'affinité des polymyxines pour le Lipide A.

La modification du LPS par addition du groupement L-Ara4N confère un niveau de résistance aux polymyxines plus élevé que celle de PEtN (Tamayo et al., 2005a). Et si nous devons effectuer un classement des modifications les plus efficaces (i.e. pour le mécanisme de résistance aux polymyxines chez *Salmonella*) ; en premier nous aurions l'opéron *arnT*, suivi par *pmrC* et *cptA*.

Le résidu 1-phosphate du Lipide A peut-être phosphorylé par LpxT pour former le 1-diphosphate (1-PP) (Jones et al., 2008 ; Touze et al., 2008). Cette altération augmente la charge négative nette du Lipide A et de fait, réduit l'efficacité de la modification par addition du groupement PEtN (Herrera et al., 2010). Ce processus devrait normalement augmenter la sensibilité « globale » de *S. enterica* ser. Typhimurium aux polymyxines. Cependant, chez *S. enterica* ser. Typhimurium, LpxT est inhibée par l'activation de la *pmrA* (Herrera et al., 2010) via *pmrR* (un gène régulateur) ce qui au final aboutit à un phénotype de résistance aux polymyxines encore plus fort (Figure 13) (Kato et al., 2012). Le fonctionnement et le rôle de ces deux gènes (*lpxT* et *pmrR*) dans la résistance aux polymyxines n'ont pas encore été complètement élucidés, mais il est plus que probable qu'ils aient un impact direct sur ce mécanisme de résistance compte tenu de leur implication dans la modification de la charge globale du LPS.

Chez *Salmonella*, le groupement R-3-hydroxymyristate en position 3 du Lipide A peut être éliminé par *pagL* (Figure 13). On parle alors de désacylation. PagL est inhibée par les modifications induites par l'addition des groupements L-Ara4N et PEtN sur le Lipide A : PagL est donc normalement à l'état latent (Kawasaki et al., 2005, 2007). PagL est aussi activée par PhoP (Trent et al., 2001a). Quoiqu'il en soit, la désacylation du Lipide A induite par PagL peut se produire dans des souches incapables de modifier ce Lipide A par addition de L-Ara4N ou PEtN. Par conséquent, dans de telles souches, la désacylation du Lipide A médiée par PagL augmente la résistance aux polymyxines (Kawasaki et al., 2007). Cette découverte implique que les différentes formes de modifications qui peuvent se produire au niveau du Lipide A, en particulier l'addition des groupements L-Ara4N et PEtN ainsi que la désacylation, peuvent se « compenser » les unes des autres, en tout cas chez certaines bactéries comme *Salmonella*. Cette observation souligne en outre, la complexité et l'intrication des interactions entre les divers mécanismes qui interviennent dans la résistance bactérienne aux PAM, y compris les polymyxines.

Certains gènes sont connus, pour être impliqués dans la résistance aux polymyxines, et dans le temps même temps pour être indépendants des TCSs PmrA/PmrB et PhoP/PhoQ. Le gène *rpoN* est un de ces gènes. Le gène *rpoN* code un facteur sigma alternatif connu pour activer la transcription de plusieurs gènes (Kazmierczak et al., 2005). Les souches de *S. enterica* ser. Typhimurium avec un *rpoN* inactivé ont montré une résistance aux polymyxines au moins deux fois plus élevée, et ce indépendamment de *pmrA*. Il semble que cela soit dû à la diminution de l'expression des gènes régulés par *rpoN* et liés à la résistance aux polymyxines (Barchiesi et al., 2009).

La pertinence clinique de la résistance aux polymyxines chez *Salmonella* peut, de prime abord, nous paraître inintéressante... En effet, les polymyxines ne sont pas, en général, utilisées pour traiter les infections à *Salmonella*. Toutefois, une résistance *in vivo* à la colistine a été observée chez des animaux tels que les porcs et les volailles (EMEA, 2002 ; de Jong et al., 2012 ; Morales et al., 2012 ; Kempf et al., 2013 ; Quesada et al., 2015), et nous ne pouvons pas éluder la possibilité d'une transmission horizontale à l'Homme de ces souches... J'ajouterai même que, comme nous le verrons plus tard, la résistance à la colistine chez les animaux d'élevage, son étude, a pris un tout autre tournant avec la découverte toute récente du premier mécanisme de résistance à la colistine sur élément génétique mobile, un plasmide, *mcr1*, justement chez des animaux d'élevage...

Klebsiella pneumoniae

Beaucoup d'études ont été réalisées chez *K. pneumoniae* pour tenter d'élucider le mécanisme de résistance à la colistine chez cette bactérie.

Ainsi, chez une souche de *K. pneumoniae* résistante aux polymyxines, mais pour laquelle nous n'avons pas les caractéristiques génétiques, il a été montré que les résidus phosphate du Lipide A contenaient cinq fois plus de groupement L-Ara4N que la souche sensible (Helander et al., 1996). Chez *K. pneumoniae*, cette modification de la membrane externe est connue pour abaisser la charge globale négative de surface (Velkov et al., 2013a), ce qui conduit à une affinité diminuée des polymyxines pour le LPS. Une étude moléculaire globale des altérations structurelles du LPS chez des souches de *K. pneumoniae* résistantes aux polymyxines, a montré l'implication des TCSs PhoP/PhoQ et PmrA/PmrB (Cheng et al., 2010). En effet, il a été observé que les TCSs PhoP/PhoQ et PmrA/PmrB sont surexprimés chez *K. pneumoniae* suite à une exposition aux polymyxines (Kim et al., 2014). Ces systèmes sont par conséquent impliqués dans la résistance aux polymyxines chez cette bactérie. L'activation constitutive du système

PmrA/PmrB peut également être provoquée par des mutations faux-sens dans *pmrA* ou *pmrB*. Cette activation entraîne alors la régulation positive de *pmrC* et l'opéron *arnBCADTEF*, ce qui se traduit par la synthèse et l'addition des groupements PEtN ou L-Ara4N au Lipide A (Figure 13). Grâce à ces nombreuses études, diverses mutations faux-sens ont ainsi pu être identifiées au niveau des gènes *pmrA* et *pmrB* dans des isolats cliniques et non cliniques de *K. pneumoniae* résistants à la colistine (Figure 17) (Cannatelli et al., 2014b ; Jayol et al., 2014 ; Olaitan et al., 2014b).

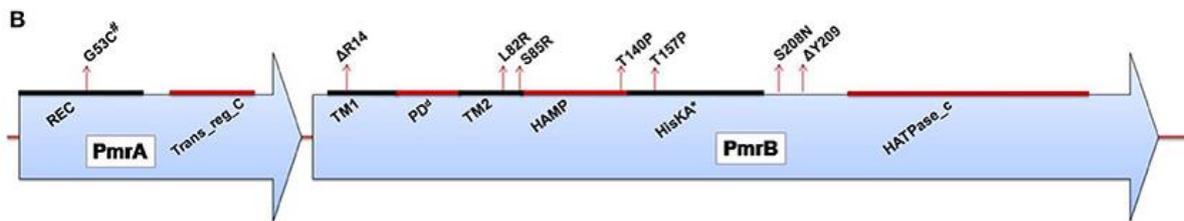


Figure 17 : Cartographie des différentes mutations identifiées sur PmrA/PmrB chez *Klebsiella*.

(Olaitan et al., 2014c)

Dans toutes ces études, les valeurs de CMI pour la colistine étaient comprises entre 3-16 mg/L. Il est intéressant de noter que des mutations similaires dans les mêmes *loci* (i.e. *pmrA* et *pmrB*) ont également été retrouvées chez d'autres Entérobactéries résistantes à la colistine : *Salmonella*, *Enterobacter aerogenes*... (avec une CMI pour la colistine à 32 mg/L) (Diene et al., 2013). De même, des mutations dans le gène *phoQ* entraînant une résistance à la colistine ont également été observées chez *K. pneumoniae* (Olaitan et al., 2014b).

Mais un des principaux mécanismes responsables de l'émergence de la résistance à la colistine chez *K. pneumoniae* est sans doute l'invalidation du gène *mgrB* (Cannatelli et al., 2013). Le gène *mgrB* est un gène très conservé de 141 nucléotides (la longueur peut varier en fonction des Entérobactéries considérées) qui code une courte protéine transmembranaire de 47 aa. Cette protéine exerce un rétrocontrôle négatif sur le système de régulation PhoP/PhoQ. En effet, MgrB agirait sur PhoQ, soit en inhibant l'activité kinase soit en stimulant son activité phosphatase. Quelle que soit l'action de MgrB sur PhoQ, cela aboutit à la non phosphorylation de PhoP et par conséquent, à la répression des gènes régulés par PhoP (Figure 13) (Lippa et Goulian, 2009). Et en effet, il a été démontré que la délétion de *mgrB* chez *E. coli* entraînait une augmentation de l'expression des gènes régulés par PhoP (Lippa et Goulian, 2009).

De nombreuses études ont démontré que le gène *mgrB* jouait un rôle très important dans la résistance à la colistine chez *K. pneumoniae*.

En effet, différentes perturbations du gène *mgrB* ont été identifiées dans des isolats cliniques et non cliniques de *K. pneumoniae* et *K. oxytoca* résistants à la colistine. Ces perturbations peuvent par exemple correspondre à une inactivation du gène par mutation insertionnelle ; comme l'insertion d'un élément génétique mobile de type IS5 ou d'autres séquences d'insertion (Figure 18) (Cannatelli et al., 2013 ; López-Camacho et al., 2013 ; Gaibani et al., 2014 ; Olaitan et al., 2014b ; Poirel et al., 2015). Mais d'autres altérations du gène *mgrB* ont aussi été décrites : des mutations non-sens qui aboutissent à un arrêt précoce de la traduction de la protéine transmembranaire MgrB ; des mutations faux-sens qui aboutissent à des substitutions d'acides aminés (Cannatelli et al., 2014a ; Olaitan et al., 2014b ; Poirel et al., 2015).

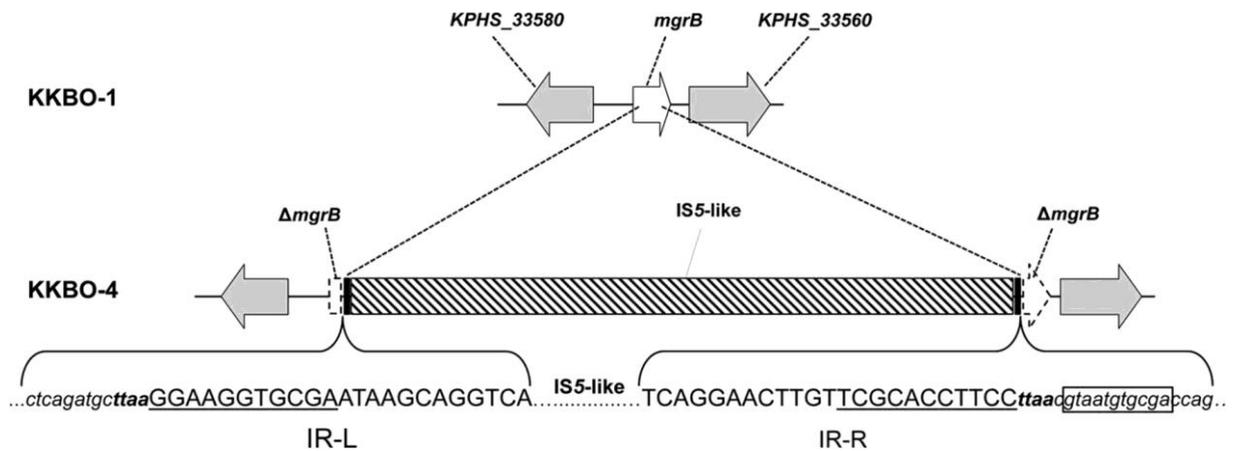


Figure 18 : Représentation schématique du locus *mgrB* chez *Klebsiella*.

KKBO-1 : *K. pneumoniae*, souche colistine sensible et KKBO-4 : *K. pneumoniae*, souche colistine résistante. Nous pouvons noter l'insertion de l'élément génétique mobile « IS5-like » qui interrompt le gène *mgrB* (Cannatelli et al., 2013).

Les valeurs de CMI pour la colistine qui ont été rapportées pour ces isolats, varient entre 4-64 mg/L. Les séquences d'insertion capables d'induire la troncature de *mgrB* sont nombreuses ; nous pouvons citer les éléments génétiques mobiles de type IS5, IS903B, IS1F ou ISKpn14. Il a aussi été démontré que ces éléments génétiques peuvent avoir une origine plasmidique (e.g. IS5D) et sont tout à fait capables d'inactiver *mgrB* (Cannatelli et al., 2014a ; Olaitan et al., 2014b). De même, plusieurs substitutions d'acides aminés, telles que C28F (qui a déjà été rapportée comme affectant l'activité PhoQ chez *E. coli*) (Lippa et Goulian, 2012), ont été décrites chez des souches de *K. pneumoniae* résistants à la colistine (Cannatelli et al., 2014a ;

Olaitan et al., 2014b). En outre, une petite délétion ou une délétion complète du *locus mgrB* a été décrite dans de nombreuses souches résistantes à la colistine (Cannatelli et al., 2014a ; Olaitan et al., 2014b). Enfin, des études de complémentation menées sur certaines de ces souches mutantes *mgrB* ont permis de restaurer la sensibilité à la colistine (Cannatelli et al., 2013, 2014a). Cette mutation par insertion au niveau du gène *mgrB* peut entraîner l'induction de l'opéron *arnBCADTEF*, celui-là même qui est responsable de l'addition du groupement L-Ara4N au Lipide A (Cannatelli et al., 2013). L'induction de l'opéron *arnBCADTEF* est attribuée à la cascade de signalisation PhoP-PmrD-PmrA, et dont le déclenchement résulte directement de l'inactivation de MgrB (Cheng et al., 2010 ; Kim et al., 2014).

De plus, il a été démontré que PhoP une fois phosphorylée, peut également activer directement l'opéron *arnBCADTEF* chez *K. pneumoniae*, et ce indépendamment de PmrD et PmrA (Mitrophanov et al., 2008). Enfin, il a été démontré que la mutation par inactivation de *mgrB* entraîne une plus forte résistance à la colistine chez *K. pneumoniae* par rapport au niveau de résistance résultant des mutations au niveau des TCS (PmrA/PmrB ou PhoP/PhoQ) (Olaitan et al., 2014b). Cette observation démontrerait que *mgrB* joue un rôle central et majeur dans la résistance aux polymyxines chez *K. pneumoniae*.

Une interaction croisée entre le TCS PhoP/PhoQ et le système de régulation de la synthèse de la capsule (Rcs) a été mis en évidence chez *K. pneumoniae*. En effet, il a été montré que le mutant *rscB* surexprime l'expression de PhoP/PhoQ ; ce qui implique qu'en temps normal le système Rcs régule négativement le TCS PhoP/PhoQ (Llobet et al., 2011). Compte tenu de cette connexion entre ces deux systèmes de régulation, il apparaît plausible qu'une mutation dans *rscB* puisse jouer un rôle dans la résistance aux polymyxines, *via* la régulation positive du système PhoP/PhoQ chez *K. pneumoniae*. Mais à ce jour, ce mécanisme reste à démontrer.

Escherichia coli

Chez des souches d'*E. coli* résistantes aux polymyxines, le Lipide A est majoritairement modifié soit par ajout d'un groupement 2-aminoéthanol mais aussi par ajout du groupement L-Ara4N (Nummila et al., 1995). Le groupement 2-aminoéthanol est ajouté au niveau du groupement diphosphate, tandis que le groupement L-Ara4N est ajouté sur le 4'-phosphate (Nummila et al., 1995) (Figure 19). L'importance de la modification médiée par le groupement L-Ara4N pour la résistance aux polymyxines chez *E. coli*, a été démontrée ultérieurement dans d'autres études (Yan et al., 2007).

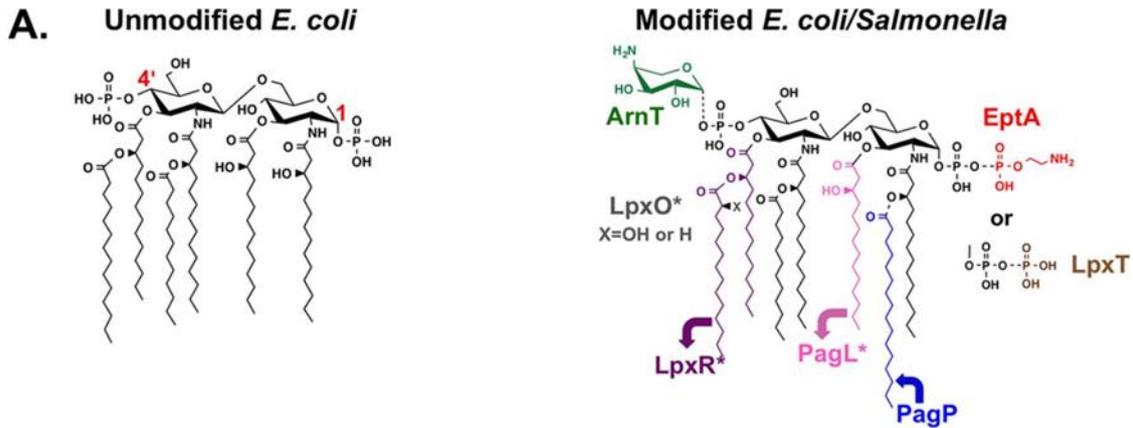


Figure 19 : Modifications du Lipide A chez *Escherichia coli*.

A gauche, le Lipide A retrouvé chez les souches d'*Escherichia coli* sensibles à la colistine. A droite, les différentes modifications du Lipide A retrouvées chez des souches d'*E. coli* résistantes à la colistine (Rubin et al., 2015).

Chez *E. coli* plusieurs gènes ou groupe de gènes ont été identifiés comme étant impliqués dans la résistance aux polymyxines : le gène *ugd* (ou *pmrE* qui une Uridine DiPhosphate (UDP)-glucose déshydrogénase), l'opéron *arnT* qui sont tous les deux sous le contrôle du TCS PmrA/PmrB et induits suite à la phosphorylation de PmrA (Aguirre et al., 2000).

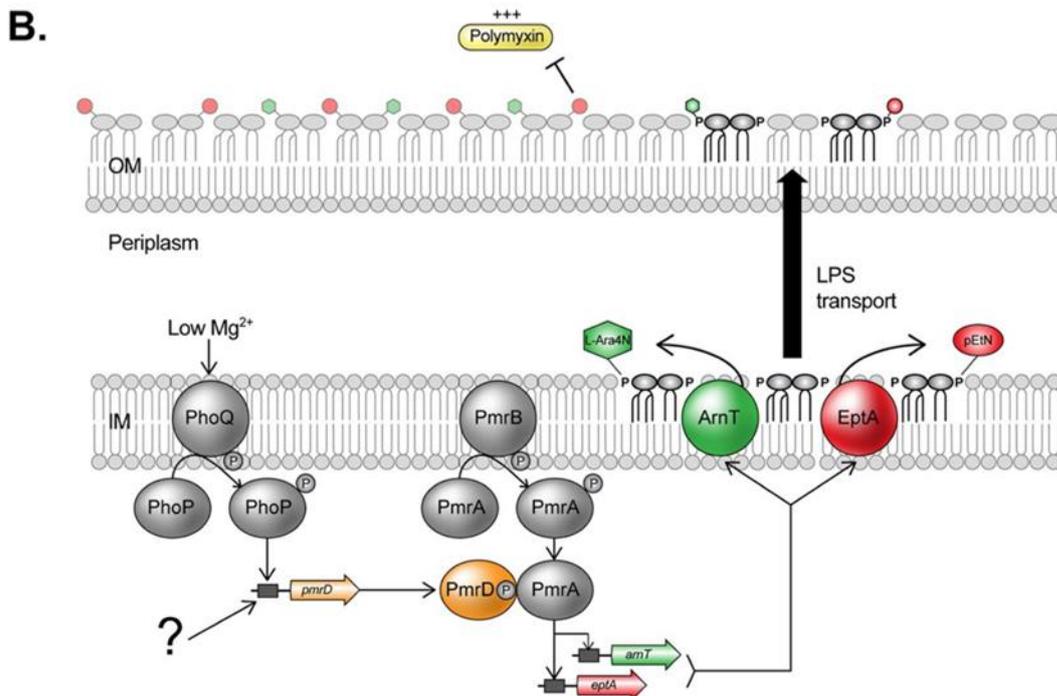


Figure 20 : Les voies de modification du LPS chez *Escherichia coli*.

(Rubin et al., 2015)

On notera aussi la présence du gène *etk* (qui code une tyrosine kinase) qui est lui aussi capable d'induire l'expression d'*ugd* (Lacour et al., 2006). Une mutation au niveau d'un de ces gènes, provoque une sensibilité accrue de la bactérie *E. coli* à la polymyxine B. La phosphorylation de la protéine Ugd par Etk augmente l'activité de l'Ugd déshydrogénase. Cette activité élevée conduit à une augmentation de la synthèse de l'acide UDP-glucuronique, qui est l'élément de base pour la synthèse du groupement L-Ara4N par l'opéron *arnT* (Figure 21) (Lacour et al., 2008).

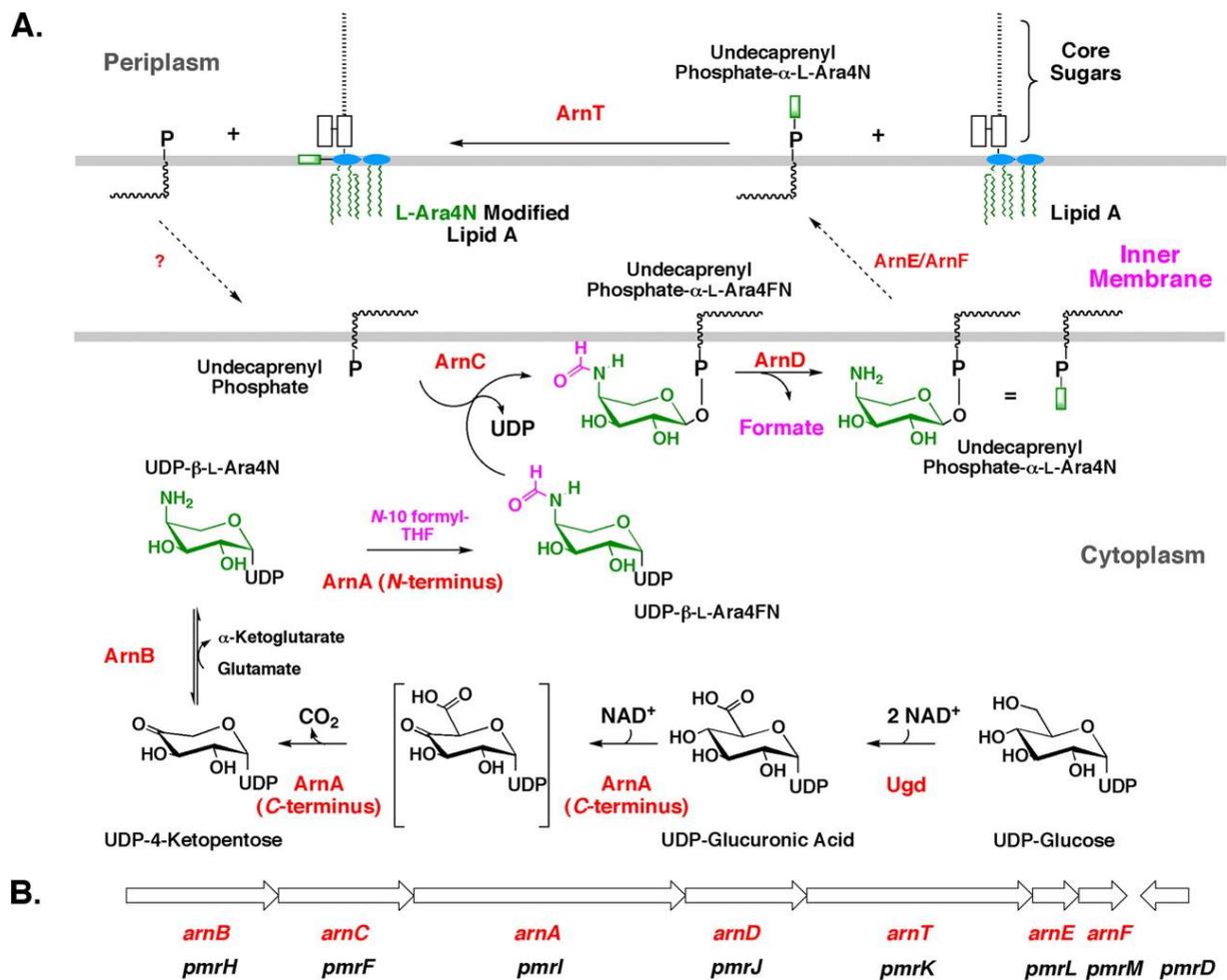


Figure 21 : Voie de biosynthèse du groupement L-Ara4N.

A. Voie de biosynthèse du groupement L-Ara4N à partir de l'UDP-Glucose jusqu'à son transfert sur le Lipide A ; en rouge les différentes enzymes impliquées dans la voie de biosynthèse.

B. Organisation de l'opéron *arn* (Yan et al., 2007).

De manière intéressante, le gène *etk* est exprimé sous des conditions qui sont également connues pour activer le TCS PmrA/PmrB (Lacour et al., 2008). Ce fait semble vouloir indiquer que le

mécanisme de résistance aux polymyxines lié à l'addition du groupement L-Ara4N sur le LPS, et qui est normalement sous le contrôle du TCS PmrA/PmrB, pourrait aussi être partiellement régulé par *etk*. D'ailleurs certaines études ont montré que la protéine Ugd n'est pas directement activée par PmrA (Wosten et Groisman, 1999), résultats qui n'ont pas pu être totalement confirmés (Aguirre et al., 2000). Mais il est possible que le produit du gène *etk* soit un activateur fort d'Ugd.

Dans une moindre mesure, le Lipide A, au niveau du groupe 1-phosphate, peut aussi être modifié par PEtN (Kim et al., 2006). L'addition du groupement PEtN est réalisée par le gène *pmrC* (également appelé *eptA*) et régulée par PmrA (Raetz et al., 2007). Le Lipide A d'*E. coli* O157:H7 est clairement modifié par l'addition du groupement PEtN, probablement en raison de l'activité accrue de *pmrC* dans ce sérotype. Mais cette modification confère une légère résistance au PAM cationique PMBN (Kim et al., 2006).

Le gène *mgrR* est un autre déterminant génétique impliqué dans la résistance aux polymyxines chez *E. coli*. Le gène *mgrR* est un Hfq ARNs-dépend, un des régulons connus pour être sous le contrôle du TCS PhoP/PhoQ chez *E. coli*. Le gène *mgrR* est (très) conservé dans d'autres genres bactériens de la famille des Entérobactéries : *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella*. Il a été décrit pour réguler négativement *eptB*, qui induit la modification des résidus externes de Kdo (acide 3-désoxy-D-manno-octulosonique) du LPS par addition de groupement PEtN (Figure 1) (Reynolds et al., 2005 ; Raetz et al., 2007). Mais *eptB* n'est pas directement sous le contrôle du TCS PhoP/PhoQ (Moon et Gottesman, 2009). La modification des résidus Kdo, suite à l'addition des groupements PEtN, réduit la charge négative nette du LPS, ce qui pourrait aboutir à un phénotype de résistance aux polymyxines (Moon et Gottesman, 2009). Toujours chez *E. coli*, la délétion du gène *mgrR* entraîne une augmentation de la modification de Kdo par PEtN, ce qui entraîne une augmentation de la résistance à la polymyxine B (Moon et Gottesman, 2009). Chez *E. coli*, l'expression du TCS PhoP/PhoQ est elle-même sous le contrôle d'un Hfq ARNs-dépend appelé MicA, capable de réprimer l'expression de PhoP (Coornaert et al., 2010). Au final, cette cascade contrôle plusieurs gènes régulés par PhoP, y compris MgrR. Ainsi, il est possible que MicA puisse également jouer un rôle dans ce mécanisme de résistance aux polymyxines, même si cette hypothèse n'a jamais encore été démontrée à ce jour.

Récemment, chez *E. coli*, il a été montré qu'une connexion entre les TCS QseB/QseC (protéines régulatrices du quorum-sensing) et PmrA/PmrB existait : PmrB peut activer QseB (chez des souches d'*E. coli* ne possédant pas QseC) et PmrA peut également directement réguler la

transcription du TCS QseB/QseC (Guckes et al., 2013). Cette interaction soulève la question des connexions qui peuvent exister entre les différents TCSs qui peuvent par conséquent influencer tels ou tels TCSs ; comme par exemple PhoP/PhoQ, PmrA/PmrB dans la résistance des bactéries aux PAM cationiques.

La sous-acylation du Lipide A et son effet sur la résistance aux polymyxines

Salmonella enterica

L'importance de la myristoylation du Lipide A (qui correspond à une acylation secondaire tardive) par rapport au mécanisme de résistance aux polymyxines, a été mise en évidence pour la première fois chez *Salmonella*. Les souches de *Salmonella msbB* (équivalentes à des mutants *lpxM*) qui produisent principalement un Lipide A pentacylé (i.e. sous-acylé), sont *de facto* incapables d'ajouter un groupement myristoyl au Lipide A et présentent une sensibilité accrue aux polymyxines (Tran et al., 2005 ; Murray et al., 2007). En effet, la myristoylation du Lipide A est une étape essentielle pour permettre l'addition du groupement de L-Ara4N sur les phosphates de Lipide A (Tran et al., 2005). Néanmoins, une souche de *Salmonella* mutante *lpxM* peut recouvrer un phénotype résistant aux polymyxines, *sipmrA* est aussi muté. En effet, cette double mutation a pour conséquence de provoquer une autre modification du Lipide A, *via* l'ajout de groupement PEtN. Ceci étant il est important de noter que l'addition du groupement L-Ara4N confère un phénotype de plus haute résistance aux polymyxines, que l'ajout du groupement PEtN. Pour conclure, il est possible d'affirmer que cette acylation secondaire (ou tardive) du Lipide A est primordiale pour l'addition de L-Ara4N aux groupements phosphate et pour la résistance aux polymyxines ; tandis que pour l'addition du groupement PEtN, non.

Klebsiella pneumoniae

Chez *K. pneumoniae*, le gène *lpxM* code également une enzyme impliquée dans l'addition du groupement myristoyl au Lipide A, ce qui entraîne la formation d'un Lipide A hexa-acylé. Il a été montré qu'un mutant *lpxM* chez *K. pneumoniae* qui produit principalement un Lipide A penta-acylé, est 8 à 16 fois plus sensible aux polymyxines (polymyxine B et colistine) qu'une souche de phénotype sauvage (i.e. avec un Lipide A hexa-acylé) (Clements et al., 2007). Velkov et collègues ont démontré que le LPS d'une souche *K. pneumoniae* mutée pour *lpxM* (avec CMI = 0,25 mg/L pour la colistine) présente une affinité de liaison 4 fois plus élevée pour les

polymyxines par rapport à la souche sauvage, qui elle a une CMI = 4 mg/L (Velkov et al., 2013b).

Réciproquement, un degré plus élevé d'acylation a été observé chez des souches de *K. pneumoniae* résistantes aux polymyxines (Helander et al. 1996). Enfin, il a été rapporté qu'une sous-acylation jouerait un rôle important dans la résistance aux polymyxines chez *K. pneumoniae* (comme chez *Salmonella* spp) ; et ce probablement en raison de l'incapacité du mutant *K. pneumoniae* sous-acylé à effectuer l'ajout du groupement L-Ara4N au Lipide A (Tran et al., 2005). Mais d'autres auteurs ont proposé que la sensibilité accrue du mutant *K. pneumoniae* sous-acylé, proviendrait d'une meilleure insertion des têtes polaires ou des « queues » d'acides gras des polymyxines dans les membranes et donc une affinité de liaison plus élevée de Lipide A pour ces antibiotiques (Clements et al., 2007, Velkov et al., 2013b).

Escherichia coli

La myristoylation du Lipide A par *lpxM* conduisant à un Lipide A hexa-acylé est également importante pour l'addition du groupement L-Ara4N au Lipide A chez *E. coli*. Par conséquent, une absence de myristoylation du Lipide A chez un mutant *lpxM* entraîne une non addition du groupement L-Ara4N et par conséquent une diminution de la résistance aux polymyxines (Tran et al., 2005).

Autres modifications au niveau du LPS

L'élimination du résidu 3-acyloxyacyl du Lipide A a été observée chez *S. enterica* ser. Typhimurium. Cette élimination est sous le contrôle de *lpxR*, gène qui code une 3-O-déacylase et que l'on retrouve chez d'autres BGN. Le gène *lpxR* est à l'état basal réprimé par le TCS PmrA/PmrB (Reynolds et al., 2006). L'élimination de ce résidu 3'-acyloxyacyl entraîne la fixation d'un nombre réduit de groupes « acyl » au Lipide A, et cette modification peut être responsable du mécanisme de résistance aux polymyxines (Helander et al., 1996 ; Tran et al., 2005 ; Clements et al., 2007 ; Murray et al., 2007). Cependant, la contribution exacte du gène *lpxR* dans la résistance aux polymyxines, n'a pas encore été clairement démontrée.

Récemment, une analyse génomique réalisée chez des souches colistine-résistante de *K. pneumoniae* a révélé des mutations distinctes dans les régions codantes et non codantes par rapport aux isolats sensibles.

Des mutations ont été détectées dans des gènes codant pour un transporteur de microcin, une protéine membranaire, une protéine de transport, la protéine *SmvA* impliquée dans la résistance au méthyl-viologène (un analogue aux ammoniums quaternaires) (Snitkin et al., 2012). Chez ces mutants, les valeurs de CMI pour la colistine sont comprises entre 4-128 mg/L. Dans une autre étude, une comparaison des génomes menée sur deux souches de *K. pneumoniae* résistantes à la colistine a identifié des mutations non synonymes dans les gènes *waaL*, *rfaA* et *vacJ*. Ces trois gènes sont connus pour être impliqués dans la biosynthèse des protéines de membrane externe (Sassera et al., 2013). Cependant, on ne sait pas si ces gènes ou leurs mutations contribuent à la résistance à la colistine. En outre, il a été démontré qu'une mutation dans le gène *waaP* (un gène codant une protéine impliquée dans la phosphorylation du résidu d'heptose du noyau interne de LPS) chez *Salmonella enterica* provoquait une sensibilité accrue aux polymyxines (Yethon et al., 2000).

Ce qu'il faut retenir, c'est que l'activité de la plupart de ces gènes est liée à la membrane externe des BGN, et il est plus que vraisemblable que tout gène qui peut modifier l'intégrité de la membrane externe peut de ce fait jouer un rôle dans la résistance aux polymyxines (Snitkin et al., 2012). Par conséquent, il serait intéressant de pousser un peu plus loin l'étude de ces gènes.

Rôle de la capsule

K. pneumoniae est une Entérobactérie un peu particulière car elle possède une capsule. La capsule résulte de la synthèse et de l'excrétion, par la bactérie (i.e. *K. pneumoniae*) à sa surface, des polysaccharides capsulaires (« capsular polysaccharides », CPS). Ces CPS une fois excrétés sont capables de piéger ou de lier les polymyxines, réduisant *de facto* la quantité d'antibiotiques susceptible d'atteindre la surface de la bactérie ; ce qui au final se traduit par une résistance accrue, de la bactérie, aux polymyxines (Llobet et al., 2008). Là aussi, ce mécanisme d'inhibition des polymyxines est la conséquence d'interactions électrostatiques entre les polymyxines, cationiques, et les CPS, anioniques. Il a aussi été démontré que les CPS jouaient un rôle direct dans la résistance aux peptides antimicrobiens (PAM), comme la polymyxine B. Ils sont capables de réduire l'interaction des PAM avec la membrane externe de la bactérie, principalement par la sur-expression des gènes de biosynthèse de la capsule. Et il a été montré que les PAM, et plus particulièrement la polymyxine B, étaient capables d'induire la sur-expression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des CPS (Campos et al., 2004). Cependant, le rôle de la capsule dans la résistance aux polymyxines fait l'objet de

nombreux débats. En effet, diverses études ont montré que la capsule ne jouait aucun rôle dans la résistance aux PAM, e.g. la polymyxine B (Weiss et al., 1982 ; Clements et al., 2007). Mais de façon intéressante, le gène *ugd* semble jouer un « double jeu » car il est impliqué à la fois dans la voie de biosynthèse des CPS et dans la voie de biosynthèse du groupement L-Ara4N (Lacour et al., 2006). Sa phosphorylation servirait de « connexion » entre la synthèse de la capsule et la résistance aux polymyxines (Lacour et al., 2008).

Rôle des pompes d'efflux

Quelques études ont montré que les pompes d'efflux peuvent également contribuer à la résistance aux polymyxines. Les pompes d'efflux qui ont été étudiées sont AcrA et KpnEF. Chez *K. pneumoniae*, il a été montré qu'une mutation dans le gène *acrB* aboutissait à une sensibilité significativement plus élevée à la polymyxine B, par rapport à la souche sauvage. Toujours chez *K. pneumoniae*, il a été montré que l'expulsion de la polymyxine B par les pompes d'efflux, était un processus énergie-dépendant (Padilla et al., 2010). Une autre étude a rapporté qu'une souche de *K. pneumoniae* mutée au niveau de KpnEF (un membre de la famille des petites pompes d'efflux retrouvées chez les bactéries MDR) a une sensibilité augmentée à plusieurs antibiotiques, dont la colistine, par rapport à une souche sauvage ; et ce type de mutant présente des valeurs de CMI à la colistine divisées par 2, toujours par rapport à une souche sauvage (Srinivasan et Rajamohan, 2013). Fait intéressant, le même mutant *kpnEF* présente également une altération de la voie de biosynthèse de la capsule (Srinivasan et Rajamohan, 2013).

Résistance acquise plasmidique

Le gène plasmidique *mcr-1* (Figure 22) responsable du transfert horizontal de la résistance à la colistine, a été décrit pour la première fois en Chine, chez des isolats de *E. coli* et *K. pneumoniae* récupérés entre 2011 et 2014 (Figure 23) (Liu et al., 2016).

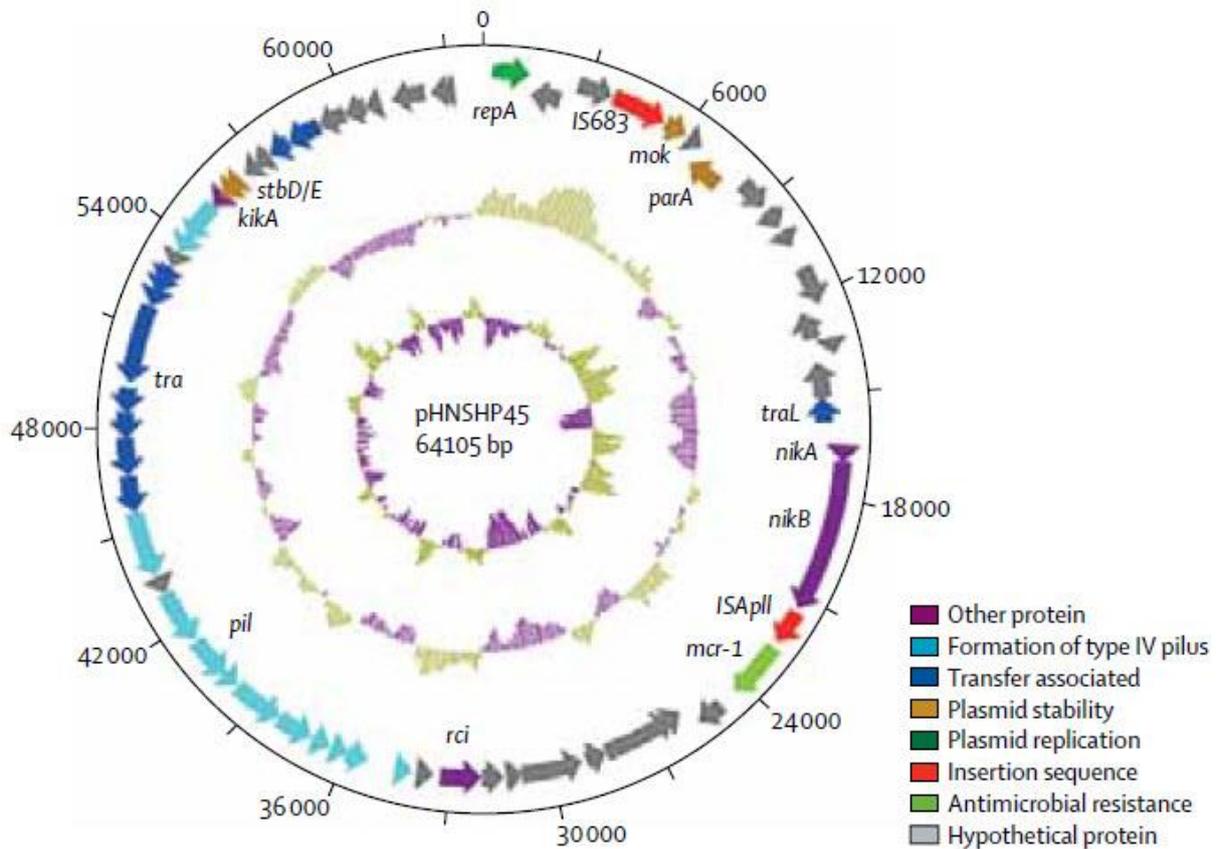


Figure 22 : Structure du plasmide pHNSHP45 porteur du gène *mcr-1*.

Le gène *mcr-1* se trouve au niveau du cadre de lecture en vert « Antimicrobial resistance » (Liu et al., 2016).

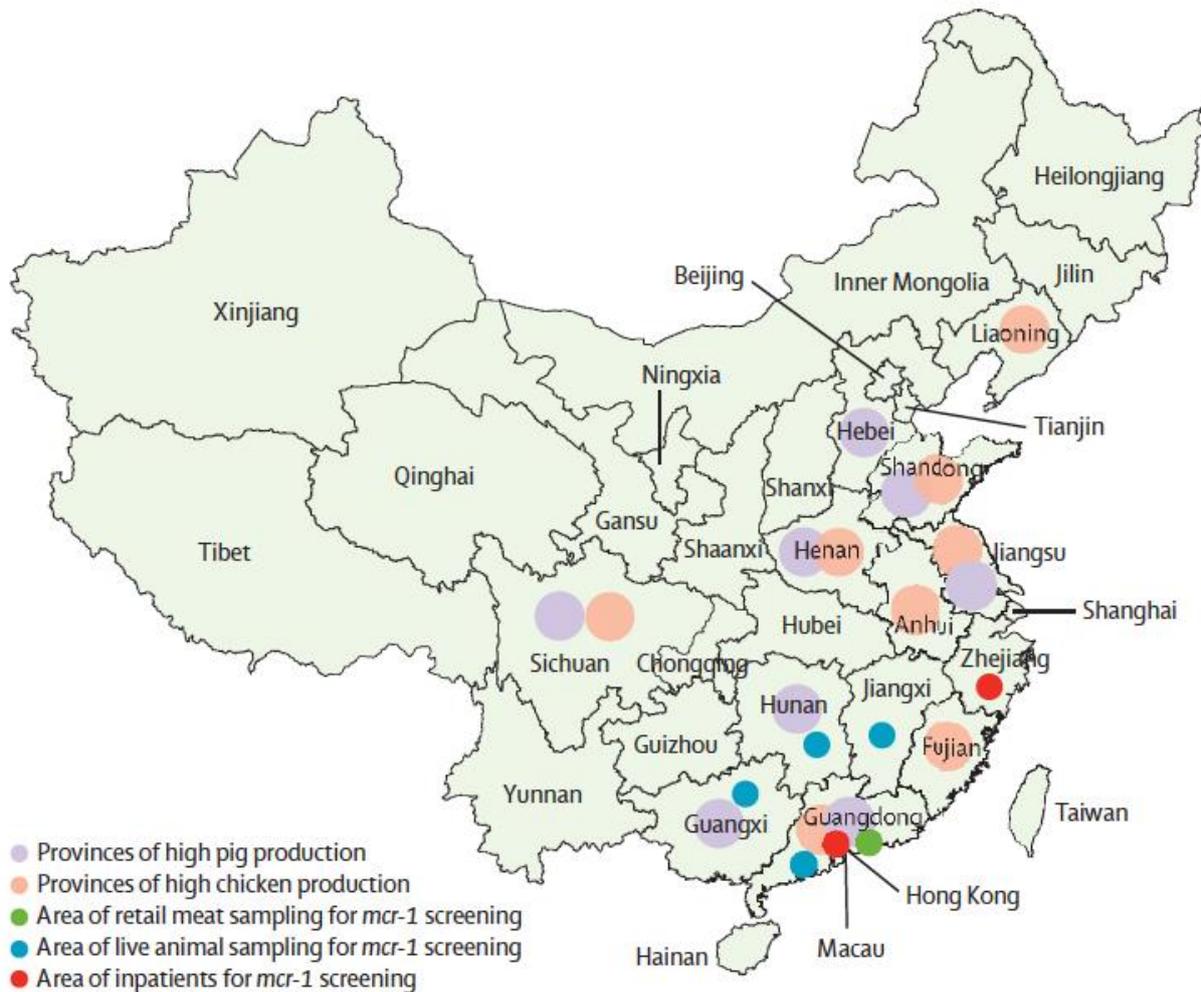


Figure 23 : Localisation des isolats bactériens porteurs du plasmide *mcr-1* en Chine.

Carte de Chine représentant les différentes provinces où ont été retrouvés les isolats d'*E. coli* et/ou *K. pneumoniae*, collectés entre 2011 et 2014, et porteurs du plasmide codant *mcr-1* (Liu et al., 2016).

La protéine MCR-1 est un membre de la famille des enzymes de type phosphoéthanolamine transférase, car son acquisition entraîne l'addition du groupement phosphoéthanolamine au Lipide A. La conséquence est l'obtention d'un LPS modifié, plus « cationique », identique à celui décrit ci-dessus (i.e. § Résistance acquise chromosomique).

Globalement, la production de MCR-1 chez *E. coli* entraîne une augmentation de 4 à 8 fois des CMI pour les polymyxines. Par conséquent, sans mécanismes de résistance supplémentaires, la production de MCR-1 est suffisante pour conférer une résistance à la colistine chez *E. coli*, mais aussi chez d'autres espèces d'Entérobactéries, telles que *K. pneumoniae*. Il est important de noter que, malgré le fait que les polymyxines et les PAM cationiques (PAMc) - tels que la cathélicidine LL-37, l' α -défensine 5 (HD5), ou la β -défensine 3 (HDB3), qui sont des

composants normaux du système immunitaire - partagent le même mécanisme d'action, aucune co-résistance aux PAMc et aux polymyxines n'a été observée (Dobias et al., 2017).

En dehors de la résistance aux polymyxines, il a été montré que la production de MCR-1 conférait une résistance au lysozyme (Sherman et al., 2016).

La structure de MCR-1 a été récemment résolue par cristallographie, révélant, de façon non surprenante, que son site actif est similaire à celui des phosphoéthanolamine transférases apparentées (Stojanoski et al., 2016). La thréonine 285 a été identifiée comme nucléophile putatif pour la catalyse, car elle était phosphorylée dans le domaine catalytique de MCR-1 (cMCR-1). Quatre ions zinc ont été identifiés dans le site actif de cMCR-1, qui est *de facto* une métalloenzyme (Figure 24).

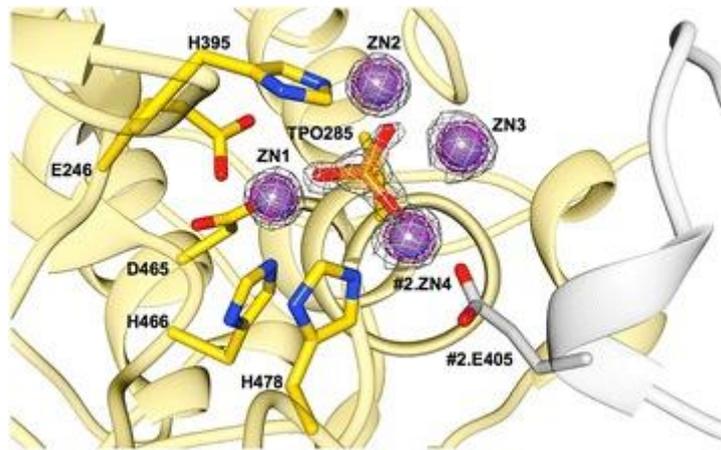


Figure 24 : Structure du site catalytique de MCR-1.

La phosphothréonine (TPO285) est représentée sous la forme « bâtonnet » de couleur jaune-orange-rouge. Les ions de zinc (ZN1, ZN2, ZN3 et ZN4) qui l'entourent sont représentés sous la forme de « sphère » de couleur violet (Stojanoski et al., 2016).

A la suite de ces premiers résultats, le gène *mcr-1* a été rapporté dans le monde entier et au-delà de la Chine, sur tous les continents (Figure 25).

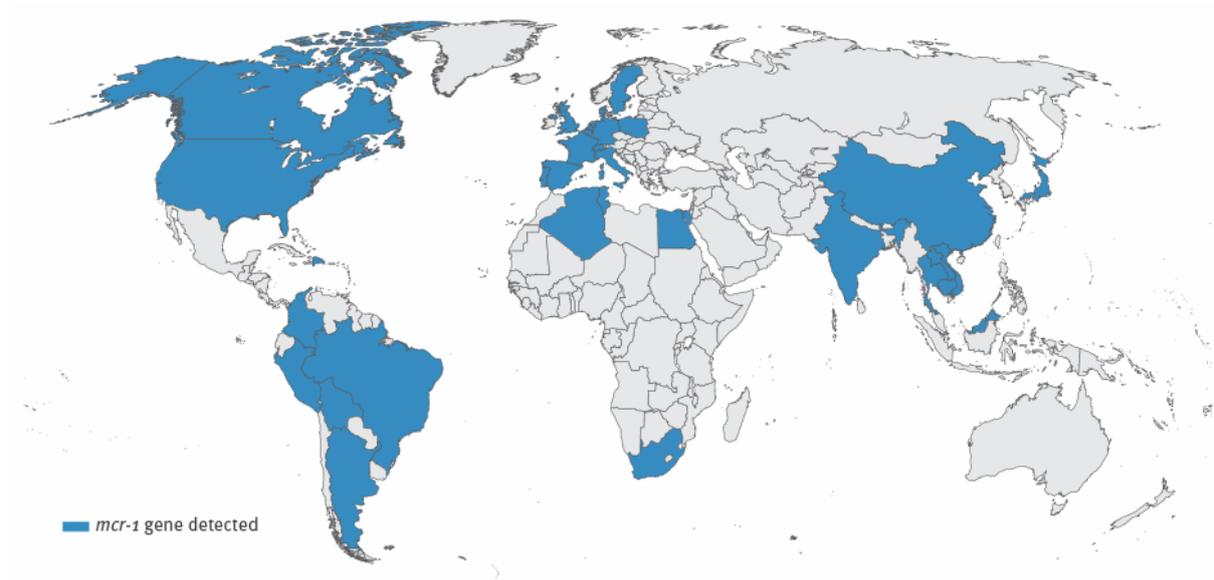


Figure 25 : Dissémination du plasmide *mcr-1* dans le monde.

Carte des 32 pays ayant signalé la présence du plasmide codant *mcr-1* dans des échantillons d'origine animale, environnementale ou humaine (données collectées jusqu'au 27 juin 2016) (Xavier et al., 2016).

Des études rétrospectives ont au final démontré que la première souche *mcr-1*-positive a été collectée sur des poulets en Chine il y a plus de 30 ans (Shen et al., 2016), lorsque la colistine a commencé à être utilisée (puis de façon extensive) chez les animaux d'élevage (Figure 26).

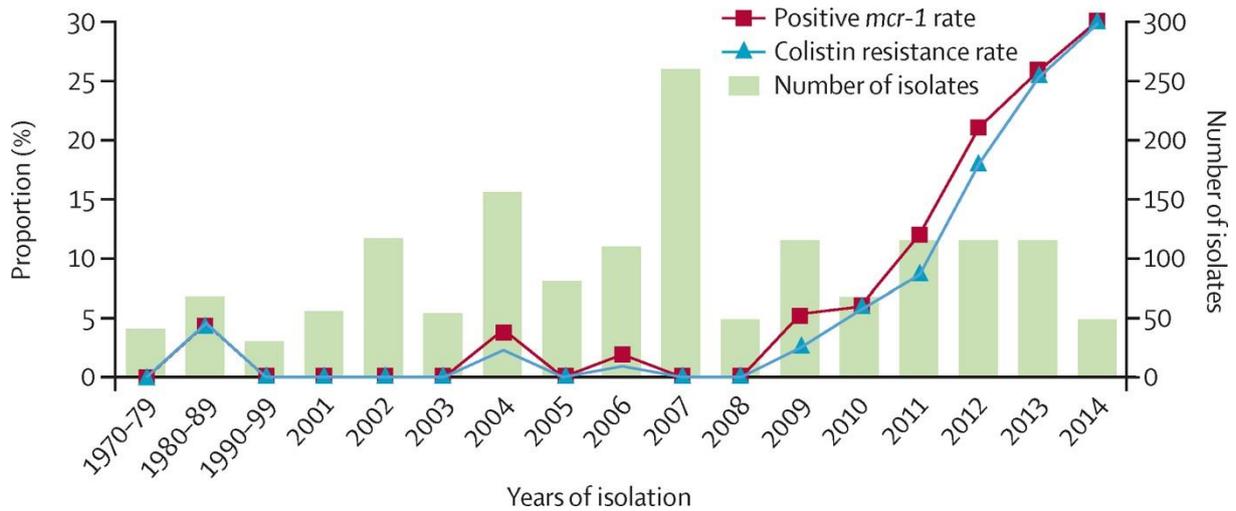


Figure 26 : Etude rétrospective de la présence de *mcr-1* chez l'animal.

Présence du plasmide of *mcr-1* et évolution de la résistance à la colistine chez des souches d'*E. coli* prélevées dans des élevages de poulet sur la période 1970-2014 (Shen et al., 2016).

Depuis, le gène *mcr-1* a été retrouvé dans divers genres d'*Enterobacteriaceae* (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Cronobacter*, *Salmonella*, *Shigella* et *Kluyvera*) isolés de l'environnement, de végétaux et d'aliments carnés, d'animaux et chez l'Homme (Poirel et al., 2017).

L'hypothèse selon laquelle les animaux, en particulier les porcs et les bovins, pourraient être la principale source de production de MCR-1 est plus que probable. En effet, plusieurs éléments « à charge » soutiennent une telle hypothèse, comme le lien qui semble exister entre, d'un côté une pression de sélection élevée dans la pratique vétérinaire, et de l'autre et de façon concomitante, la large présence de ce génotype de résistance dans les isolats issus d'animaux d'élevage (Poirel & Nordmann, 2016).

La génétique de l'acquisition du gène *mcr-1* a été étudiée de manière approfondie. Ce gène a été trouvé dans des plasmides possédant des structures très variées (IncI2, IncHI2, IncP, IncX4, IncFI et IncFIB) et de tailles différentes (de 58 à 251 kb). Ainsi, en amont du gène *mcr-1*, la séquence d'insertion IS*Apl1* n'est pas constamment retrouvée (Liu et al., 2016) (Figure 27).

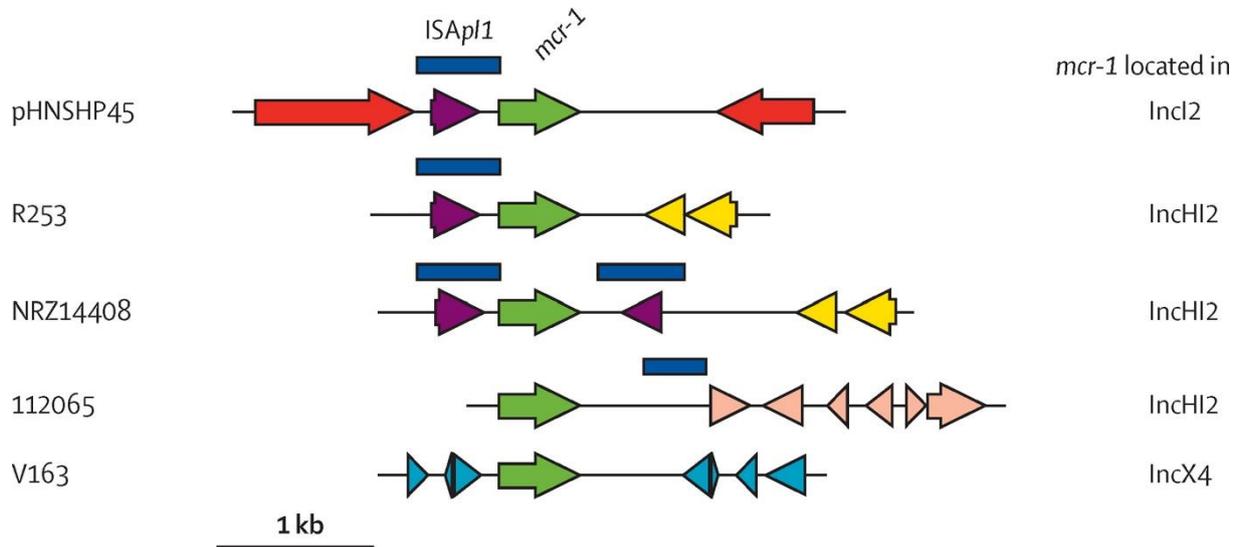


Figure 27 : Comparaison des séquences génétiques portant le gène *mcr-1*.
(Falgenhauer et al., 2016)

En outre, Thanh et coll. ont décrit, chez un isolat de *Shigella sonnei*, un gène *mcr-1* interrompu par une séquence répétée en tandem de 22 pb (Thanh et al., 2016). Cette souche, porteuse de ce gène *mcr-1* muté, est sensible à la colistine. Mais sous pression de sélection (i.e. en présence de colistine) la séquence génétique de 22 pb répétée peut être déléetée, rétablissant alors le cadre ouvert de lecture « originel » de *mcr-1* et conférant à nouveau un phénotype de résistance à la colistine chez cette souche. Cette version « inactivée » du gène *mcr-1* suggérerait que l'expression du gène *mcr-1* représenterait un coût énergétique non négligeable pour la bactérie. De fait, cette bactérie serait alors capable d'activer/désactiver le gène *mcr-1* en réponse à une situation de stress (i.e. en présence de colistine) pour assurer sa survie dans des conditions environnementales qui lui seraient devenues défavorables.

Certains plasmides, mais pas tous, portant le gène *mcr-1* portent aussi d'autres gènes de résistance aux antibiotiques utilisés couramment en thérapie humaine. Nous pouvons notamment citer les gènes de résistance aux β -lactamines, amino(glyco)sides, quinolones, sulfonamides, tétracyclines ou à la fosfomycine. La présence du gène *mcr-1* sur des plasmides multirésistants aux antibiotiques est préoccupante car l'utilisation d'antimicrobiens autres que

les polymyxines peut alors participer à la cosélection des souches bactériennes porteuses du gène de *mcr-1* et par conséquent à sa propagation. Plus inquiétant encore, le gène *mcr-1* plasmidique a été identifié dans des isolats d'*Enterobacteriaceae* hautement résistants aux antibiotiques hébergeant des plasmides codant pour des gènes de carbapénémases (*bla_{NDM-1}*, *bla_{NDM-5}*, *bla_{NDM-9}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{KPC-2}* et *bla_{VIM-1}*) (Yao et al., 2016 ; Du et al., 2016 ; Zhong et al., 2017 ; Poirel et al., 2016a ; Falgenhauer et al., 2016 ; Mulvey et al., 2016 ; Liu et al., 2017).

D'autres investigations seront nécessaires pour mieux comprendre le processus d'acquisition du gène *mcr-1* ; toutefois, certains auteurs ont récemment montré que le gène *mcr-1* se situait dans une structure génétique de 2 600 pb, définie comme la « cassette *mcr-1* » (Figure 28) ; et qui, de fait, pourrait être mobilisée par transposition (Poirel et al., 2016b). Ces auteurs ont démontré que cette cassette comportait toutes les séquences promotrices nécessaires et suffisantes à l'expression de *mcr-1* (Figure 28).

```

CAAATTATAAATACTCTCAAGTGTATATTCAGTATGGGATTGCGCAATGATTGCCTAATAAAATTTCTGAAATATTTCTG
                                     -35      P1-mcr-1      -10      +1
TATCGCATAATTTTTTATATCAGATAAATTGTACTGGATTTCTTAAAAAATTGCAGTATAAATTGCCGCAATTATCCCACC
GTTTATTTTTTTGAGTAGTTTCTCATGATGCAGCATACTTCTGTGTGGTACCGACGC-----//-----
                M M Q H T S V W Y R R
                --> mcr-1

TGATGTCACCGCGGACAAAGTCAAAGACCGCACCGCATTTCATCCGCTTGATTTCTCCCTGTATTTTTTCCAAACCCACCGC
    D V T A D K V K D R T A F I R *

-----//640 bp //-----
GGCTGCTATAAGATGATTATTGGCGATCATTTTTTGGAGCCATACGGTGGTGTTCGATGATGCTTGGCGTGGGCGATGTCCGC
AGGGCTTGGCGTGGGTGTTTTTTAAGAAGGGTGAACAAGTT
    
```

Figure 28 : Séquence de la cassette *mcr-1*.

Cette séquence est longue de 2 600 pb. Les codons de début et d'arrêt de *mcr-1* sont en gras. Le sens de transcription est indiqué par une flèche. Les acides aminés de la séquence MCR-1 sont indiqués en dessous de la séquence nucléotidique. P1-*mcr-1* : promoteur avec ses séquences bordantes (-35 et -10) ; +1 : début de la transcription (Poirel et al., 2016b).

En outre, il a été montré que plusieurs souches possédaient le gène *mcr-1* situé dans une structure « composite » de transposon bornée par deux copies de IS*AplI* (Snesrud et al., 2016). Cependant, cette structure n'a pas été systématiquement retrouvée, et par conséquent d'autres investigations sont encore nécessaires pour mieux comprendre le processus d'acquisition de ce

gène à partir d'un progéniteur inconnu dans les plasmides se répliquant chez les *Enterobacteriaceae*.

Les souches d'Entérobactéries productrices de MCR-1 ont souvent été identifiées comme des « colonisateurs » chez l'Homme ou les animaux. Néanmoins, des cas d'infection ont été signalés (Falgenhauer et al., 2016 ; Nordmann et al., 2016 ; ...).

Un variant fonctionnel de *mcr-1* (Q3L) codant MCR-1.2 a été détecté chez une souche *K. pneumoniae* producteur de KPC-3 en Italie (Di Pilato et al., 2016), partageant probablement la même activité que MCR-1.

Récemment, un autre gène de résistance à la colistine plasmidique a été identifié. IL s'agit du gène *mcr-2*, isolé dans des souches de *E. coli* récupérées sur des porcelets en Belgique (Xavier et al., 2016). Il présente 77% d'identité nucléotidique avec *mcr-1* et est porté sur un plasmide IncX4.

Epidémiologie de la résistance à la colistine

Bien que les polymyxines conservent actuellement une activité *in vitro* significative contre la plupart des BGN, la résistance à cette famille d'antibiotiques est de plus en plus fréquemment rapportée dans la littérature (Bialvaei et al., 2015 ; Ah et al., 2014).

Le programme de surveillance « SENTRY » a mené une enquête mondiale en 2009 et signalé de faibles taux de résistance aux polymyxines (<0,1 à 1,5%) chez les principales BGN pathogènes (e.g. *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa*, *E. coli* et *Klebsiella* spp.) (Gales et al., 2011). Cependant, une tendance à la hausse a été observée au cours de la période 2006-2009 chez les isolats de *K. pneumoniae* (taux de résistance de 1,2% en 2006 et 1,8% en 2009), probablement en raison de l'utilisation extensive et/ou inadéquate des polymyxines, à l'échelle du globe, pour la prise en charge des infections à BGN MDR.

La résistance à la colistine chez *K. pneumoniae* représente un problème de santé publique grandissant, car cette espèce bactérienne est l'un des principaux agents pathogènes responsables d'infections nosocomiales. En outre, cette espèce a « collectionné » au fil des ans un très large éventail de mécanismes de résistance aux antibiotiques à large spectre. La présence de souches de *K. pneumoniae* résistantes à la colistine a été signalée dans le monde entier au cours d'études cliniques et/ou de surveillance (Gales et al., 2001). De nombreuses études rapportent une augmentation du taux de résistance chez les isolats de *K. pneumoniae* déjà multirésistants, en particulier chez les isolats de *K. pneumoniae* résistants aux carbapénèmes, avec des taux élevés de résistance à la colistine. Plus inquiétant, de nombreuses épidémies d'isolats cliniques résistants aux carbapénèmes et à la colistine ont été signalées en Amérique du Nord et en Europe (Figure 29).

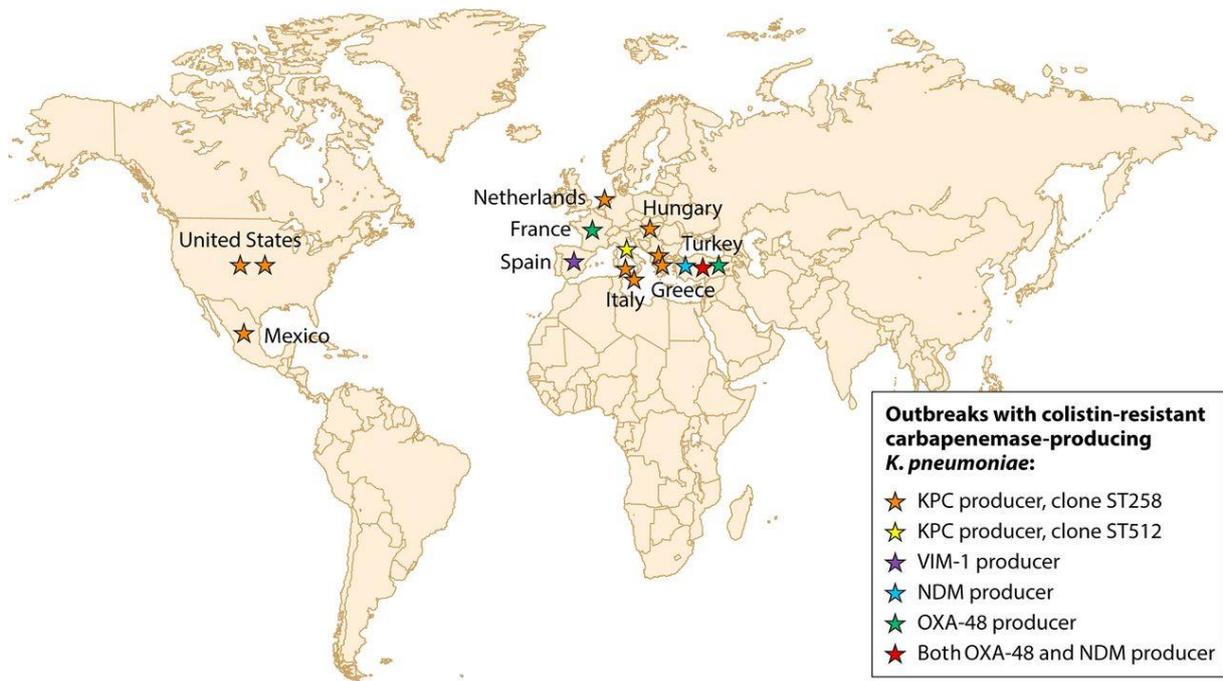


Figure 29 : Epidémies à *K. pneumoniae* résistante à la colistine et productrice de carbapénémases.

Chaque étoile indique la notification d'une épidémie (Poirel et al., 2017).

Amérique du Nord

Des enquêtes multicentriques ont révélé de faible taux de résistance à la colistine chez les souches de *K. pneumoniae* au Canada (2,9%) (Walkty et al., 2009) et aux États-Unis (4%) (Sutherland et al., 2015). Cependant, le taux de résistance à la colistine était plus élevé (6,7 à 18%) parmi les isolats producteurs de carbapénémases (Sutherland et al., 2015 ; Tijet et al., 2014 ; Bratu et al., 2005). En outre, des épidémies à *K. pneumoniae* productrices de KPC résistantes à la colistine, principalement attribuables au clone épidémique international de type ST258, ont été signalées aux États-Unis (Bogdanovich et al., 2011 ; Marchaim et al., 2011) et au Mexique (Garza-Ramos et al., 2014).

Amérique du Sud

Les résultats du programme de surveillance SENTRY ont montré un taux de résistance modéré en Amérique latine en 2009 (3%) (Gales et al., 2011) ; cependant, l'émergence d'isolats cliniques de *K. pneumoniae* résistants à la colistine a été signalée en Argentine (Arduino et al., 2012), en Colombie (Jayol et al., 2014) et au Brésil (Perez, 2015).

Europe

De multiples épisodes à *K. pneumoniae* résistants aux carbapénèmes et à la colistine ont été signalés en Europe. Des épidémies à *K. pneumoniae* productrices de KPC attribuées au clone épidémique international de type ST258 ont été signalés aux Pays-Bas (Weterings et al., 2015), en Hongrie (Toth et al., 2010), en Grèce (Kontopoulou et al., 2010 ; Antoniadou et al., 2007) et en Italie (Mezzatesta et al., 2011 ; Mammima et al., 2012).

En plus de ces deux foyers attribués au clone ST258, une très forte épidémie nosocomiale d'isolats de ST512 (i.e. *K. pneumoniae* résistants à la colistine et producteurs de KPC) a été signalée en Italie (Giani et al., 2015). Plus inquiétant encore, la résistance à la colistine a récemment été signalée à un niveau très préoccupant (> 20%) parmi des isolats producteurs de carbapénémases en USI dans deux hôpitaux italiens (Parisi et al., 2015 ; Mezzatesta et al., 2014), avec un taux encore plus élevé (36,1%) dans les hôpitaux de Rome (Capone et al., 2013). Enfin, une étude a rapporté que la dissémination de la résistance à la colistine chez les souches de *K. pneumoniae* productrices de KPC était un phénomène d'une ampleur sans précédent qui touchait tout le pays, avec 43% des isolats cliniques résistants à la colistine (Monaco et al., 2014).

En Grèce, plusieurs épidémies causées par des souches de *K. pneumoniae* productrices de KPC et résistantes à la colistine ont été signalées (Kontopoulou et al., 2010 ; Antoniadou et al., 2007). Des études réalisées dans deux hôpitaux grecs ont rapporté une augmentation considérable de la résistance à la colistine en quelques années (avec une incidence < 3,5% avant 2010 et > 20% après 2010) (Meletis et al., 2015 ; Zagorianou et al., 2012).

Sur une période de 2 ans (2010-2012) en Espagne, une étude a montré une augmentation de la prévalence de la résistance à la colistine de 13,5 à 31,7% chez les souches de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases, et une épidémie à *K. pneumoniae* productrice VIM-1 et résistante à la colistine a été signalée (Pena et al., 2014).

En France, une enquête nationale a révélé un faible taux de résistance à la colistine (6,2%) parmi les souches de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases ; néanmoins, une épidémie de souches de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases de type OXA-48 et résistantes à la colistine a été signalée (Jayol et al., 2016).

Proche Orient

En Turquie et en Israël, de faibles taux de résistance à la colistine les souches de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases ont été rapportés (2,7% et 4,5%, respectivement). Cependant, des épidémies multi-clonales à *K. pneumoniae* productrices de OXA-48, de NDM ou des deux, sont actuellement en cours en Turquie (Kilic et Baysallar, 2015). Récemment, cette « co-production » de OXA-48 et de NDM a même été caractérisée chez d'autres Entérobactéries (e.g. *E. cloacae*) (Haciseyitoglu et al., 2017). Et pour être complet, des isolats de *K. pneumoniae* producteurs de NDM et résistants à la colistine viennent d'être caractérisés en Turquie (Cizmeci et al., 2017).

Afrique

Un taux de résistance très faible à la colistine a été signalé parmi les souches de *K. pneumoniae* en Tunisie (1,2%), mais ce taux a probablement été sous-estimé car la sensibilité à la colistine a été principalement testée à l'aide de la méthode des disques ; mais cette méthode n'est pas fiable et devrait être abandonnée (Poirel et al., 2017). L'émergence de la résistance à la colistine a été rapportée pour les isolats de *K. pneumoniae* récupérés en Afrique du Sud (Jayol et al., 2015 ; Jayol et al., 2014) et au Nigeria (Olaitan et al., 2014b).

Asie

Des taux modérés de résistance à la colistine (environ 6 à 11%) ont été signalés dans des isolats de *K. pneumoniae* provenant de Corée du Sud (Suh et al., 2010) et de Singapour (Tan et Ng, 2006) ; et des taux de résistance similaires (de 4,4 à 12,1%) en Chine (Chen et al., 2011) et à Taïwan (Chiu et al., 2013). Des souches de *K. pneumoniae* résistantes à la colistine ont également été signalées au Laos et en Thaïlande (Olaitan et al., 2014b).

RESISTANCE A LA COLISTINE :
APPROCHE EXPERIMENTALE

L'équipe « Membrane Infectiologie Cancérologie » (MIC) dont je suis l'animateur au sein de l'UMR 7565 « Structure et Réactivité des Systèmes Moléculaires Complexes » (SRSMC) CNRS-Université de Lorraine ; a pour axes de recherche :

- La recherche de nouvelles molécules anti-infectieuses, et
- Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques

qui passent par la compréhension (i) des mécanismes d'action des agents anti-infectieux et (ii) des mécanismes de résistance des agents pathogènes à ces agents anti-infectieux.

Le sujet de recherche sur la résistance à la colistine a été initié en 2011, et correspond au recrutement comme post-doctorant, au sein du laboratoire, de Céline VIDAILLAC. Depuis, le sujet a (beaucoup) évolué, plusieurs chercheurs se sont succédés, plusieurs collaborations ont vu le jour... Je pense notamment aux collaborations avec Etienne DAGUE, CR1-CNRS au LAAS à Toulouse ; et Igor CLAROT, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Nancy.

J'ai volontairement choisi de ne pas parler ici des travaux qui sont actuellement en cours, voire en cours de publication. Je pense notamment aux travaux de Marine HEROLD-MANUELLI, actuellement en Doctorat d'Université au sein de l'équipe. Mais que les choses soient claires, il ne s'agit pour moi de minimiser ou de dévaloriser le travail de recherche effectué par Marine (il y a toujours des personnes qui ont l'esprit mal tourné)... Non, au contraire, il s'agit pour moi de protéger son travail, et surtout qu'elle soit la première à en bénéficier, vu l'investissement dont elle a fait preuve... Il s'agit tout simplement d'honnêteté...

Enfin je voudrais ajouter que l'histoire du sujet « résistance à la colistine » au sein de l'équipe est avant tout une histoire de rencontre(s), de belles rencontres comme celle avec Céline, Etienne (& Cécile), Igor (bien évidemment), Marine... et tous les autres... Et j'espère très sincèrement que ces rencontres persisteront dans le futur.

Au final, c'est un peu le « fruit » de ces rencontres que je vous présente ici...

J'ai donc choisi de présenter dans cette partie « résultats » de cette thèse, les 3 articles qui ont été publiés sur cette thématique de recherche dans des journaux internationaux à Comité de Lecture (vive l'HCERES !!).

Résistance à la colistine... Quelle(s) stratégie(s) thérapeutique(s) ?

Quel(s) antibiotique(s) utiliser ?

Contexte

Comme nous l'avons vu en introduction, au début des années 2000, la situation sur le front de l'antibiorésistance était critique : nous étions confrontés, depuis plusieurs années, à une très nette diminution de l'arsenal thérapeutique et dans le même temps les infections causées par des bactéries multirésistantes aux antibiotiques n'avaient de cesse de croître. Cette situation était particulièrement vraie pour les bactéries à Gram-négatif (BGN), et notamment pour les BGN résistantes aux carbapénèmes. *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli* étaient (et sont toujours) les espèces bactériennes pour lesquelles la situation devenait (très) préoccupante...

Cette situation a amené les cliniciens à « ressortir des tiroirs » d'anciennes molécules dont l'utilisation était alors extrêmement limitée, voire anecdotique. Ce fut par exemple le cas de la colistine qui devient rapidement, dans plusieurs pays à la surface du globe, l'antibiotique de la dernière chance (« last-resort treatment option ») pour la prise en charge et le traitement des infections causées par ces BGN multirésistantes. Mais très rapidement, des souches bactériennes résistantes à la colistine apparurent, ce qui laissait entrevoir une situation jusqu'alors inédite : l'impasse thérapeutique, ou l'impossibilité pour le clinicien d'avoir à disposition un antibiotique (encore) efficace pour traiter une infection bactérienne.

Pour être tout à fait honnête, cette situation d'impasse thérapeutique n'était, déjà à l'époque, pas si rare que ça ; certaines situations infectieuses devenaient de plus en plus difficiles à traiter. Devant cette problématique, une des réponses apportées par les cliniciens a consisté à recourir aux associations d'antibiotiques (bithérapies, voire trithérapies), pour (i) avoir une meilleure efficacité de traitement (on parlera alors de synergie ou d'associations synergiques), mais aussi (ii) limiter la sélection de mutants résistants. Certains antibiotiques sont d'ailleurs connus pour ne jamais être utilisés seuls (monothérapie) du fait justement de la sélection trop rapide de mutants résistants. Nous pouvons citer à titre d'exemple, la rifampicine, l'acide fusidique, la fosfomycine.

Malheureusement toutes les associations d'antibiotiques ne sont pas synergiques... et de loin, ce serait trop simple et trop beau... Non, ces associations peuvent être « additives », « indifférentes » et même « antagonistes ».

On dit d'une association qu'elle est :

- « synergique », quand l'action antibactérienne conjointe des deux antibiotiques est supérieure à la somme des actions de chacun des deux antibiotiques pris isolément ;
- « additive », quand l'action antibactérienne conjointe des deux antibiotiques est égale à la somme des actions de chacun des deux antibiotiques pris isolément ;
- « indifférente », quand l'action antibactérienne conjointe des deux antibiotiques est égale à l'action du meilleur antibiotique seul ;
- « antagoniste », quand l'action antibactérienne conjointe des deux antibiotiques est inférieure à la somme des actions de chacun des deux antibiotiques pris isolément.

A titre d'exemple, nous pouvons citer l'association « triméthoprim + sulfaméthoxazole » (ou cotrimoxazole, Bactrim®) qui est connue pour être synergique et qui est utilisée telle quel depuis plusieurs années.

Dans l'absolu, il est impossible de prévoir si une association de tel ou tel antibiotique sera synergique (ou pas) pour une bactérie donnée ; en tenant compte bien évidemment de l'espèce mais aussi et surtout des mécanismes de résistance aux antibiotiques qui pourraient être retrouvés chez cette bactérie. Normalement, et avant toute utilisation en thérapeutique, il faudrait procéder à l'évaluation *in vitro* du potentiel de synergie de chaque association...

Enfin, il convient aussi d'ajouter qu'à l'heure actuelle l'antibiorésistance est telle que parfois il arrive, que des associations entre deux antibiotiques pour lesquels la bactérie serait encore sensible ne soient plus possible, du fait de l'accumulation d'un trop grand nombre de mécanismes de résistance au sein d'une même souche bactérienne. Le clinicien se voit alors contraint de tenter des associations d'antibiotiques catégorisés « S + I » voire pire...

Objectifs

Nous avons voulu évaluer le potentiel de synergie de 3 associations d'antibiotique dites « non conventionnelles » : « Colistine+Vancomycine » (CST+VAN), « Colistine+Triméthoprim » (CST+TMP) et « Colistine+Cotrimoxazole » (CST+TMP/SMX) sur 3 BGN : *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* et *Klebsiella pneumoniae*. L'originalité de ce travail a aussi consisté en l'évaluation du potentiel de synergie de ces associations sur des souches sensibles ou résistantes à la colistine.

Méthodes

Le potentiel de synergie a été évalué sur 12 souches d'*Acinetobacter baumannii* (n = 4), *Pseudomonas aeruginosa* (n = 4), et *Klebsiella pneumoniae* (n = 4). Parmi ces souches nous avons 6 isolats cliniques multirésistants, les souches de référence : *K. pneumoniae* ATCC 700603, *A. baumannii* ATCC 19606, *P. aeruginosa* ATCC 27853, et leurs dérivés résistants à la colistine, sélectionnés *in vitro* (respectivement KPm1, ABm1, et PAm1). La sensibilité de chaque souche, pour chacun des antibiotiques, a été évaluée par la méthode de microdilution en milieu liquide et l'analyse des profils de population. Le potentiel de synergie des combinaisons associant la colistine a été évalué par la technique de l'échiquier, et la réalisation des courbes de bactéricidie à 0,5x et 0,25x la CMI.

Résultats

Les valeurs de CMI pour les 12 souches étaient :

- ≥ 128 $\mu\text{g/mL}$ pour VAN,
- comprises entre 4 et ≥ 128 $\mu\text{g/mL}$ pour TMP et,
- comprises entre 2/38 et $> 128/2432$ $\mu\text{g/mL}$ pour TMP/SMX (1/19)

Le phénotype « résistance à la colistine » a démontré peu d'impact sur les valeurs de CMI des antibiotiques (VAN, TMP et TMP/SMX) seuls. Divers niveaux de sous-populations de résistance hétérogène à la colistine ont été observés dans toutes les cultures testées. Grace aux courbes de bactéricidie, nous avons démontré que toutes les combinaisons testées étaient synergiques contre KPm1 à 0,25xCMI et 0,5xCMI et ABm1 et PAm1 à 0,5xCMI (Tableau III).

Tableau III : Evaluation de l'activité bactéricide et de l'activité bactériostatique des combinaisons antibiotiques à base de colistine.

Isolate	CST + VAN			CST + TMP			CST + TMP/SMX (1/19)		
	0.5× MIC	0.25× MIC	ΣFIC	0.5× MIC	0.25× MIC	ΣFIC	0.5× MIC	0.25× MIC	ΣFIC
<i>A. baumannii</i>									
ATCC 19606	-4.72 ± 0.05	-4.70 ± 0.03	0.25	-4.33 ± 0.33	+3.46 ± 0.36	0.50	-4.40 ± 0.27	+3.65 ± 0.60	0.37
ABm1	-4.74 ± 0.01	-4.61 ± 0.13	0.18	-4.83 ± 0.01	-0.71 ± 0.37	0.37	-4.23 ± 0.07	+2.15 ± 0.38	0.20
AB1	-4.54 ± 0.10	-1.26 ± 0.63	0.50	-4.25 ± 0.78	+3.03 ± 0.36	0.5	-4.65 ± 0.12	+3.05 ± 0.40	0.37
AB2	-4.88 ± 0.13	-4.74 ± 0.18	0.37	-2.66 ± 0.36	+3.42 ± 0.17	0.37	-2.04 ± 0.36	+3.21 ± 0.41	0.5
<i>K. pneumoniae</i>									
ATCC 700603	+2.20 ± 0.04	+2.93 ± 0.13	>0.50	-4.00 ± 0.41	+2.98 ± 0.38	>0.5	-3.00 ± 0.40	+3.57 ± 0.64	>0.5
KPm1	-3.01 ± 0.24	-1.47 ± 0.84	0.25	-4.67 ± 0.03	-1.99 ± 0.63	0.25	-4.82 ± 0.09	-3.85 ± 1.45	0.25
KP3	+3.23 ± 0.50	+3.26 ± 0.34	>0.50	+3.38 ± 0.60	+3.59 ± 0.69	>0.5	+2.84 ± 0.24	+3.32 ± 0.27	>0.5
KP4	+2.92 ± 0.15	+3.52 ± 0.25	>0.5	+2.76 ± 0.46	+3.36 ± 0.39	>0.5	+3.00 ± 0.13	+3.31 ± 0.18	>0.5
<i>P. aeruginosa</i>									
ATCC 27853	+3.98 ± 0.28	+3.52 ± 0.25	>0.5	+3.95 ± 0.46	+2.80 ± 0.01	>0.5	+3.95 ± 0.10	+3.31 ± 0.18	>0.5
PAm1	-1.65 ± 0.26	+3.05 ± 0.01	>0.5	-4.32 ± 0.32	+2.40 ± 0.50	>0.5	-4.82 ± 0.18	+2.26 ± 0.01	>0.5
PA4	+2.59 ± 0.50	+3.21 ± 0.04	>0.5	+2.66 ± 0.47	+2.77 ± 0.46	>0.5	+2.38 ± 0.73	+3.16 ± 0.14	>0.5
PA5	+3.58 ± 0.84	+4.06 ± 0.10	>0.5	+2.60 ± 0.30	+3.60 ± 0.60	>0.5	+2.86 ± 0.35	+4.01 ± 0.33	>0.5

Les activités bactéricides ont été déterminées par la méthode du « Time-Kill Assay » et les activités bactériostatiques par la méthode du « Checkerboard Assay ». CST : colistine ; TMP : triméthoprime ; TMP/SMX : triméthoprime-sulfaméthoxazole (ou cotrimoxazole) ; MIC : « Minimum Inhibitory Concentration » (ou CMI). (Vidaillac et al., 2012).

En revanche, aucune des combinaisons testées n'a démontré de synergie pour les isolats de *P. aeruginosa* susceptibles à la colistine et les souches cliniques de *K. pneumoniae*. Enfin, seules les combinaisons « CST + TMP » ou « CST + SMP/SMX » se sont révélées être synergiques et bactéricides à 0,5xCMI sur *K. pneumoniae* ATCC 700603 (Tableau III).

Discussion/Conclusion

L'acquisition du phénotype « résistance à la colistine » semble favoriser l'activité *in vitro* des combinaisons de colistine non conventionnelles.

Publication n°1

Vidaillac C., Benichou L., Duval R.E.

In-vitro Synergy of Colistin Combinations against Colistin-Resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates.
Antimicrob Agents Chemother (2012) 56, 4856-4861.

In Vitro Synergy of Colistin Combinations against Colistin-Resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae* Isolates

Céline Vidailiac,^{a,b,*} Lothaire Benichou,^a and Raphaël E. Duval^{a,b}

SRSMC, UMR CNRS 7565^a and ABC Platform,^b Université de Lorraine, Nancy, France

Colistin resistance, although uncommon, is increasingly being reported among Gram-negative clinical pathogens, and an understanding of its impact on the activity of antimicrobials is now evolving. We evaluated the potential for synergy of colistin plus trimethoprim, trimethoprim-sulfamethoxazole (1/19 ratio), or vancomycin against 12 isolates of *Acinetobacter baumannii* ($n = 4$), *Pseudomonas aeruginosa* ($n = 4$), and *Klebsiella pneumoniae* ($n = 4$). The strains included six multidrug-resistant clinical isolates, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *A. baumannii* ATCC 19606, *P. aeruginosa* ATCC 27853, and their colistin-resistant derivatives (KPm1, ABm1, and PAm1, respectively). Antimicrobial susceptibilities were assessed by broth microdilution and population analysis profiles. The potential for synergy of colistin combinations was evaluated using a checkerboard assay, as well as static time-kill experiments at $0.5\times$ and $0.25\times$ MIC. The MIC ranges of vancomycin, trimethoprim, and trimethoprim-sulfamethoxazole (1/19) were ≥ 128 , 4 to ≥ 128 , and 2/38 to $> 128/2,432$ $\mu\text{g/ml}$, respectively. Colistin resistance demonstrated little impact on vancomycin, trimethoprim, or trimethoprim-sulfamethoxazole MIC values. Isolates with subpopulations heterogeneously resistant to colistin were observed to various degrees in all tested isolates. In time-kill assays, all tested combinations were synergistic against KPm1 at $0.25\times$ MIC and $0.5\times$ MIC and ABm1 and PAm1 at $0.5\times$ MIC. In contrast, none of the tested combinations demonstrated synergy against any colistin-susceptible *P. aeruginosa* isolates and clinical strains of *K. pneumoniae* isolates. Only colistin plus trimethoprim or trimethoprim-sulfamethoxazole was synergistic and bactericidal at $0.5\times$ MIC against *K. pneumoniae* ATCC 700603. Colistin resistance seems to promote the *in vitro* activity of unconventional colistin combinations. Additional experiments are warranted to understand the clinical significance of these observations.

Because of the rapid spread of antimicrobial resistance and the slow development of novel antimicrobials, Gram-negative infections are becoming very challenging for clinicians and a real threat to international public health (20). Gram-negative bacteria are characterized by the presence of an outer membrane, limiting the penetration of hydrophobic and/or large antibiotics. The protective function of the outer membrane mainly relies on the presence of lipopolysaccharide (LPS) constituents at the surface of the cell. Thus, studies investigating bacterial mutants of *Escherichia coli* producing defective LPS demonstrated their increased susceptibility to hydrophobic antibacterial agents and suggested greater penetration of the agents through the outer membrane (24). Colistin sulfate (also referred to as polymyxin E) is a cyclic polypeptide exhibiting detergent-like properties. Colistin is known to interact with LPS and phospholipids present at the surface of the outer membrane, to disturb membrane permeability, and finally to bind to phospholipids present at the surface of the cytoplasmic membrane. The last interaction is thought to result in disruption of the osmotic equilibrium and leakage of the cell contents (7, 10, 22). Increased permeability of the outer membrane secondary to colistin exposure should lead to increased permeability to hydrophobic and/or large molecules. A few studies have evaluated the potential for synergy of unconventional colistin combinations (13, 25). In contrast, little is known regarding the potential for synergy of colistin combinations against colistin-resistant bacillus isolates (3, 5, 18), and to date, no data are available on colistin-resistant *Klebsiella* spp., an emerging threat, considering the worldwide increased prevalence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (2, 6, 23).

The objectives of our study were to evaluate the potential for

synergy and bactericidal activity of colistin plus vancomycin, trimethoprim, or trimethoprim-sulfamethoxazole (1/19 ratio) against colistin-susceptible and -resistant strains of *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *K. pneumoniae*. Observations made through this study were also expected to provide additional insights into the mechanism(s) of resistance to colistin among three major Gram-negative species.

(A portion of this work was presented at the 51st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, IL, 2011 [abstract E-732].)

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and media. Six clinical isolates of *A. baumannii* (AB1 and AB2), *P. aeruginosa* (PA4 and PA5), and extended-spectrum beta-lactamase-producing strains of *K. pneumoniae* (KP3 and KP4) were selected from the ABC Platform Bugs Bank Collection (ABC Platform, Université de Lorraine, Nancy, France). Three ATCC strains (*A. baumannii* ATCC 19606, *K. pneumoniae* ATCC 700603, and *P. aeruginosa* ATCC 27853; Fisher Scientific, SAS, Illkirch, France) and their colistin-resistant derivatives (ABm1, KPm1, and PAm1) were also included in our study.

Received 25 October 2011 Returned for modification 9 January 2012

Accepted 24 June 2012

Published ahead of print 2 July 2012

Address correspondence to Céline Vidailiac, celine.vidailiac@pharma.uhp-nancy.fr.

* Present address: Céline Vidailiac, Clinical and Epidemiological Investigation Center, CRP-Santé, Strassen, Luxembourg.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.05996-11

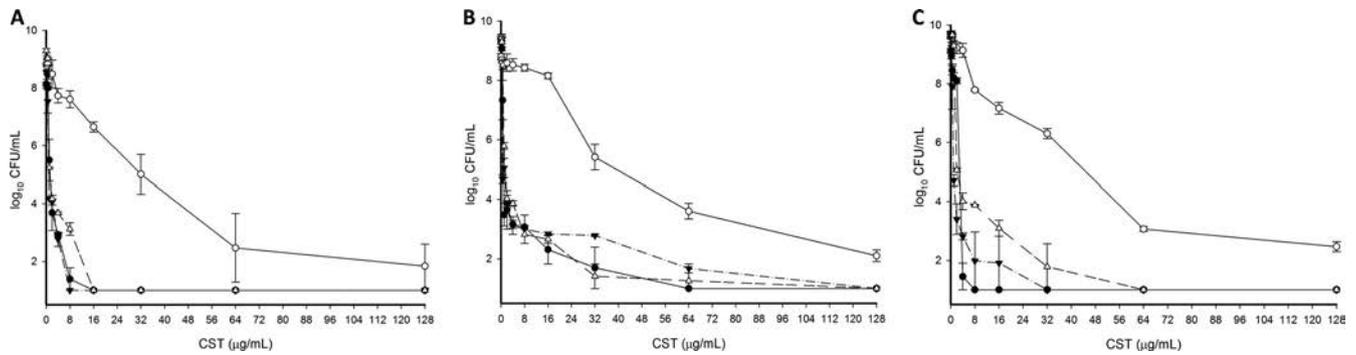


FIG 1 Colistin population analysis profiles. (A) ●, *A. baumannii* ATCC 19606; ○, ABm1; ▽, AB1; △, AB2. (B) ●, *K. pneumoniae* ATCC 700603; ○, KPm1; ▽, KP3; △, KP4. (C) ●, *P. aeruginosa* ATCC 27853; ○, PAm1; ▽, PA4; △, PA5. The error bars indicate standard deviations.

Strains ABm1 and KPm1 were selected *in vitro* using the gradient plate method, as previously described by Bryson and Szybalski (6a), whereas PAm1 was obtained from successive exposures to increased colistin concentrations, as described elsewhere (12). All three mutants were stable over 5 passages on drug-free agar. Mueller-Hinton broth II (MHB II) (Difco, Fisher Scientific, SAS, Illkirch, France) containing 12.5 $\mu\text{g/ml}$ magnesium and 25 $\mu\text{g/ml}$ calcium (supplemented MHB II [SMHBII]) was used for all *in vitro* experiments. The suitability of the medium for trimethoprim-sulfamethoxazole testing was verified using control strains according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) recommendations (9). Mueller-Hinton agar (MHA) (Difco, Fisher Scientific, SAS, Illkirch, France) was utilized for growth and colony quantification.

Antimicrobial agents. Colistin sulfate, vancomycin, trimethoprim, and sulfamethoxazole were commercially obtained (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Each agent was freshly prepared according to the CLSI guidelines in the appropriate solvent (9).

Susceptibility testing. MIC values were determined in duplicate according to CLSI guidelines at $\sim 5.5 \times 10^5$ CFU/ml in SMHB II (9).

Colistin population analysis profiles (PAPs). The presence of subpopulations resistant to colistin was evaluated for all ATCC isolates, as previously described by Li et al. (19). Briefly, 50 μl of full 24-h cultures (10^9 CFU/ml) or appropriate serial dilutions in cold and sterile normal saline were plated onto MHA plates containing 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, and 128 $\mu\text{g/ml}$ of colistin sulfate. After a 48-h incubation at 35°C, colonies were counted and \log_{10} CFU/ml values were plotted versus time. Graphs were then used to calculate an area under the curve from zero to infinity ($\text{AUC}_{0-\infty}$) (SigmaPlot version 11.0; Systat Software). A heterogeneous population in terms of colistin resistance was defined as an isolate with detectable subpopulations growing in the presence of concentrations of colistin greater than the MIC, as defined by broth microdilution (19).

Bacteriostatic activity. Interactions between colistin and vancomycin, trimethoprim, or trimethoprim-sulfamethoxazole (1/19) were evaluated by a checkerboard titration assay in microplates, as described previously (11). Bacterial inocula were prepared as recommended for MIC determination. Colistin was tested at concentrations ranging from 1 to 64 and from 0.06 to 8 $\mu\text{g/ml}$ for resistant and susceptible isolates, respectively. Vancomycin, trimethoprim, and trimethoprim-sulfamethoxazole (1/19) were tested at concentrations varying from 0.25 to 128 $\mu\text{g/ml}$. Bacterial growth was visually assessed after 24 h of incubation at 35°C. The activity of each antimicrobial combination was estimated using the point of maximal effectiveness or index of fractional inhibitory concentration (ΣFIC). ΣFIC values were interpreted according to the following criterion: the potential for bacteriostatic effect, meaning the potential for synergy when ΣFIC is ≤ 0.5 (11). All experiments were performed in triplicate to ensure reproducibility, and the results were expressed as the mode values.

Synergy and bactericidal activity. The potential for synergy and/or bactericidal activity of colistin plus vancomycin, trimethoprim, or tri-

methoprim-sulfamethoxazole (1/19) was evaluated using a 2-ml time-kill assay and a starting inoculum of $\sim 10^5$ to 10^6 CFU/ml. Each experiment was performed in duplicate to ensure reproducibility. Antimicrobial regimens consisted of multiples of the MIC (0.25 \times and 0.5 \times MIC) of each agent alone or in combination. When the MIC value was greater than 128 $\mu\text{g/ml}$, we considered 128 $\mu\text{g/ml}$ the MIC value. Samples were removed at 0, 1, 2, 4, 8, and 24 h. For all time-kill experiments, aliquots (100 μl) were serially diluted in cold and sterile normal saline. Bacterial counts were determined by plating three spots of 10 μl of appropriate dilutions on MHA plates and incubating them at 35°C for 18 to 24 h. Time-kill curves were then constructed by plotting mean colony counts (\log_{10} CFU/ml) versus time. According to the 2012 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Instructions to Authors, synergy was defined as a ≥ 2 \log_{10} CFU/ml decrease between the combination and the most efficient agent alone at 24 h. The number of surviving organisms in the presence of the combination was also ≥ 2 \log_{10} CFU/ml, and at least one of the drugs alone did not affect the growth curve of the tested organism. The bactericidal activities of drug combinations were defined as a ≥ 3 \log_{10} CFU/ml (99.9%) reduction compared to the most active drug at 24 h.

RESULTS

Selection and characterization of colistin sulfate-resistant derivatives. Using subinhibitory concentrations, colistin-resistant strains of *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, and *P. aeruginosa* ATCC isolates (i.e., ABm1, KPm1, and PAm1, respectively) were selected *in vitro*. All tested isolates appeared to be heterogeneously resistant to colistin, with the presence of subpopulations that grew in the presence of colistin concentrations higher than the MIC. However, colistin-resistant strains displayed a significant shift toward higher MIC values and exhibited greater proportions of subpopulations with higher colistin MICs (Fig. 1A to C). Of note, $\text{AUC}_{0-\infty}$ values ranged from 145.54 to 255.64 for colistin-susceptible isolates. In contrast, the colistin-resistant derivatives KPm1, ABm1, and PAm1 exhibited $\text{AUC}_{0-\infty}$ values of 570.76, 565.87, and 472.17, respectively.

Antimicrobial susceptibility. Colistin, vancomycin, trimethoprim, and trimethoprim-sulfamethoxazole MIC values are reported in Table 1. Colistin resistance had a minimal impact on the susceptibilities of other tested antimicrobials. The greatest impact observed was a 2-doubling reduction of the trimethoprim-sulfamethoxazole MIC value in the pairs of related *P. aeruginosa* isolates (from ≥ 128 $\mu\text{g/ml}$ in *P. aeruginosa* ATCC 27853 to 32 $\mu\text{g/ml}$ in PAm1). In contrast, vancomycin had no activity against any of the *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, and *A. baumannii* isolates tested (MIC > 128 $\mu\text{g/ml}$), whether they were susceptible or resistant to colistin. Of note, *K. pneumoniae* ATCC 700603 and

TABLE 1 Antimicrobial susceptibility

Isolate	MIC ($\mu\text{g/ml}$) ^a			
	CST	VAN	TMP	TMP/SMX (1/19)
<i>A. baumannii</i>				
ATCC 19606	1	>128	32	16/304
ABm1	8	128	32	16/306
AB1	0.5	>128	64	8/152
AB2	1	>128	>128	>128/2,432
<i>K. pneumoniae</i>				
ATCC 700603	0.5	>128	4	2/38
KPm1	32	>128	4	2/38
KP3	0.5	>128	>128	>128/2,432
KP4	0.5	>128	>128	>128/2,432
<i>P. aeruginosa</i>				
ATCC 27853	0.5	>128	>128	>128/2,432
PAm1	8	>128	>128	32/612
PA4	0.5	128	>128	>128/2,432
PA5	1	128	>128	>128/2,432

^a CST, colistin; VAN, vancomycin; TMP, trimethoprim; SMX, sulfamethoxazole.

KPm1 both displayed low MIC values for trimethoprim and trimethoprim-sulfamethoxazole (1/19) (4 and 2/38 $\mu\text{g/ml}$, respectively).

In vitro evaluation of antimicrobial combinations. The checkerboard assay aimed to evaluate the potential for synergy of antimicrobial combinations at fixed concentrations. All tested combinations were synergistic ($0.18 < \Sigma\text{FIC} \leq 0.5$) against *A. baumannii* isolates. Interestingly, the ΣFIC values observed with the colistin-resistant derivative ABm1 were slightly lower than those observed with its parent susceptible strain, *A. baumannii* ATCC 19606 (0.18 versus 0.25, 0.375 versus 0.5, and 0.25 versus 0.37 for vancomycin, trimethoprim, and trimethoprim-sulfame-

thoxazole, respectively). None of the combinations was synergistic ($\Sigma\text{FIC} > 0.5$) against any of the colistin-susceptible *K. pneumoniae* isolates or any of the *P. aeruginosa* isolates tested, including PAm1. In contrast, ΣFIC values of 0.2 to 0.25 were observed for all antimicrobial combinations against the colistin-resistant derivative KPm1 (Table 2).

The potential for synergy and bactericidal activity of each combination was further evaluated by static time-kill experiments at 0.25 \times and 0.5 \times MIC using inocula of 10^5 to 10^6 CFU/ml. Tested alone at 0.25 \times and 0.5 \times MIC, all the antimicrobials resulted in at least 1 \log_{10} CFU/ml increase of the viable count at 24 h (data not shown). Changes observed at 24 h confirmed the results observed in the checkerboard assay against all *A. baumannii* isolates, i.e., the potential for synergy of colistin combined with vancomycin at 32 and 64 $\mu\text{g/ml}$ (considered for the purposes of the assay to be 0.25 \times and 0.5 \times MIC), and with trimethoprim or trimethoprim-sulfamethoxazole (1/19) at 0.5 \times MIC (Table 2). The limit of detection (1 \log_{10} CFU/ml) was achieved for most of the tested combinations demonstrating synergy (Table 2). Bactericidal activity ($\geq 3 \log_{10}$ CFU/ml) was achieved within 2 to 4 h against all *A. baumannii* isolates, but the killing activity of the combinations was slightly slower against ABm1 than *A. baumannii* ATCC 19606 (Fig. 2A and B).

None of the tested combinations demonstrated synergy against clinical isolates of colistin-susceptible *K. pneumoniae* (KP3 and KP4) using the time-kill assay (Table 2). Colistin plus trimethoprim or trimethoprim-sulfamethoxazole (1/19) demonstrated synergy at 0.5 \times MIC against *K. pneumoniae* ATCC 700603, and sustained bactericidal activity was achieved at 2 h. The limit of 3 \log_{10} CFU/ml decrease in the viable count was achieved with colistin plus vancomycin at 0.5 \times MIC at 4 h, but sustained bacterial regrowth was observed afterward (Fig. 2C). In contrast and of interest, all tested combinations were synergistic and bactericidal against KPm1, with a time to achieve 99.9% kill

TABLE 2 In vitro evaluation of the bacteriostatic (checkerboard assay) and bactericidal activity (time-kill assay) of colistin combinations at 0.5 \times and 0.25 \times MIC^a

Isolate	CST + VAN			CST + TMP			CST + TMP/SMX (1/19)		
	0.5 \times MIC	0.25 \times MIC	ΣFIC	0.5 \times MIC	0.25 \times MIC	ΣFIC	0.5 \times MIC	0.25 \times MIC	ΣFIC
<i>A. baumannii</i>									
ATCC 19606	-4.72 \pm 0.05	-4.70 \pm 0.03	0.25	-4.33 \pm 0.33	+3.46 \pm 0.36	0.50	-4.40 \pm 0.27	+3.65 \pm 0.60	0.37
ABm1	-4.74 \pm 0.01	-4.61 \pm 0.13	0.18	-4.83 \pm 0.01	-0.71 \pm 0.37	0.37	-4.23 \pm 0.07	+2.15 \pm 0.38	0.20
AB1	-4.54 \pm 0.10	-1.26 \pm 0.63	0.50	-4.25 \pm 0.78	+3.03 \pm 0.36	0.5	-4.65 \pm 0.12	+3.05 \pm 0.40	0.37
AB2	-4.88 \pm 0.13	-4.74 \pm 0.18	0.37	-2.66 \pm 0.36	+3.42 \pm 0.17	0.37	-2.04 \pm 0.36	+3.21 \pm 0.41	0.5
<i>K. pneumoniae</i>									
ATCC 700603	+2.20 \pm 0.04	+2.93 \pm 0.13	>0.50	-4.00 \pm 0.41	+2.98 \pm 0.38	>0.5	-3.00 \pm 0.40	+3.57 \pm 0.64	>0.5
KPm1	-3.01 \pm 0.24	-1.47 \pm 0.84	0.25	-4.67 \pm 0.03	-1.99 \pm 0.63	0.25	-4.82 \pm 0.09	-3.85 \pm 1.45	0.25
KP3	+3.23 \pm 0.50	+3.26 \pm 0.34	>0.50	+3.38 \pm 0.60	+3.59 \pm 0.69	>0.5	+2.84 \pm 0.24	+3.32 \pm 0.27	>0.5
KP4	+2.92 \pm 0.15	+3.52 \pm 0.25	>0.5	+2.76 \pm 0.46	+3.36 \pm 0.39	>0.5	+3.00 \pm 0.13	+3.31 \pm 0.18	>0.5
<i>P. aeruginosa</i>									
ATCC 27853	+3.98 \pm 0.28	+3.52 \pm 0.25	>0.5	+3.95 \pm 0.46	+2.80 \pm 0.01	>0.5	+3.95 \pm 0.10	+3.31 \pm 0.18	>0.5
PAm1	-1.65 \pm 0.26	+3.05 \pm 0.01	>0.5	-4.32 \pm 0.32	+2.40 \pm 0.50	>0.5	-4.82 \pm 0.18	+2.26 \pm 0.01	>0.5
PA4	+2.59 \pm 0.50	+3.21 \pm 0.04	>0.5	+2.66 \pm 0.47	+2.77 \pm 0.46	>0.5	+2.38 \pm 0.73	+3.16 \pm 0.14	>0.5
PA5	+3.58 \pm 0.84	+4.06 \pm 0.10	>0.5	+2.60 \pm 0.30	+3.60 \pm 0.60	>0.5	+2.86 \pm 0.35	+4.01 \pm 0.33	>0.5

^a CST, colistin; VAN, vancomycin; TMP, trimethoprim; SMX, sulfamethoxazole.

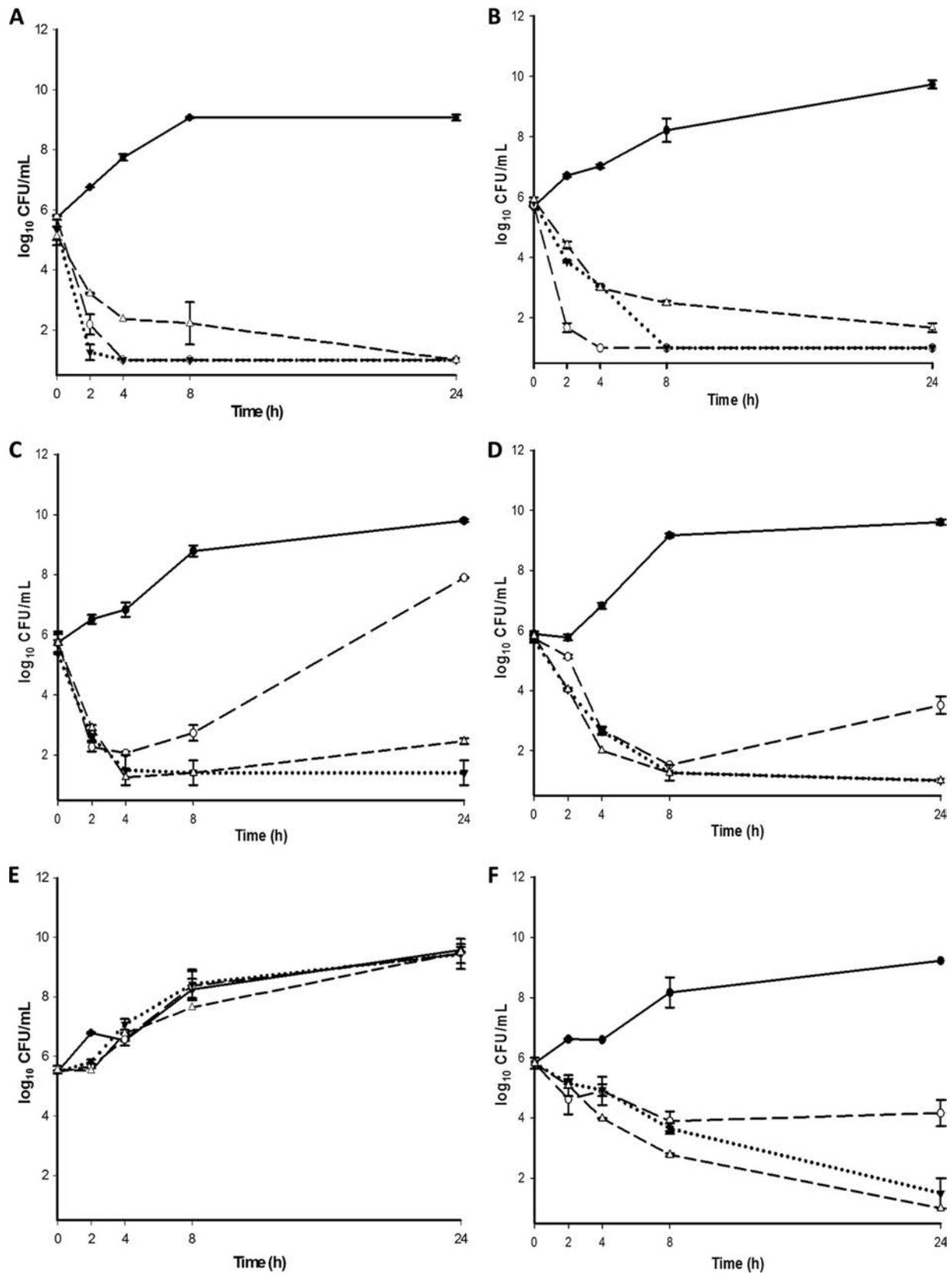


FIG 2 *In vitro* evaluation of the bactericidal activity of colistin combinations at 0.5 \times MIC against *A. baumannii* ATCC 19606 (A), *K. pneumoniae* ATCC 700603 (B), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (C), ABm1 (D), KPm1 (E), and PAm1 (F). ●, growth control; ○, colistin plus vancomycin; ▼, colistin plus trimethoprim; △, colistin plus trimethoprim-sulfamethoxazole. The error bars indicate standard deviations.

($T_{99.9\%}$) of 4 h (Fig. 2D), and no bacterial regrowth was noted at $0.5 \times$ MIC (Fig. 2D).

None of the combinations demonstrated synergy at $0.25 \times$ and $0.5 \times$ MIC against the colistin-susceptible *P. aeruginosa* strains (*P. aeruginosa* ATCC 27853, PA4, and PA5) (Table 2 and Fig. 2E). In contrast, all combinations resulted in a greater than $2 \log_{10}$ CFU/ml reduction at $0.5 \times$ MIC against PAm1 (Table 2). Colistin plus trimethoprim or trimethoprim-sulfamethoxazole (at $0.5 \times$ MIC) achieved sustained bactericidal activity against PAm1 at 8 h, whereas colistin plus vancomycin achieved a maximum of $-1.90 \pm 0.51 \log_{10}$ CFU/ml at 8 h (Fig. 2F) and $-1.65 \pm 0.26 \log_{10}$ CFU/ml at 24 h (Table 2).

DISCUSSION

Colistin's ability to disturb outer membrane permeability has been previously used to investigate the potential for synergy of colistin in combination with unconventional drugs, such as glycopeptides (13, 25), or hydrophobic compounds, such as trimethoprim (10). Thus, the synergy and bactericidal activity of colistin plus trimethoprim or vancomycin have been observed both *in vitro* and *in vivo* (in a *Galleria mellonella* model) against multidrug-resistant (MDR) *A. baumannii* isolates (13, 14, 25). However, data are available against only colistin-susceptible strains, and very little is known regarding the potential for synergy of colistin combinations against colistin-resistant Gram-negative bacteria. Bergen et al. have recently reported on the therapeutic potential of colistin plus doripenem against a single colistin-resistant clinical *P. aeruginosa* isolate using an *in vitro* pharmacokinetic/pharmacodynamic model (5). Li et al. also reported on the potential for synergy and substantial killing of colistin plus ciprofloxacin ($-2.45 \log_{10}$ CFU/ml) against an MDR *P. aeruginosa* strain resistant to colistin and ciprofloxacin (18). These preliminary results suggest that combinations of colistin with other antimicrobials may exhibit activity against colistin-resistant strains. To support this theory, Bergen et al. suggested that colistin-resistant strains have subpopulations that are heterogeneously resistant to colistin and that subpopulations for which the colistin MICs are higher may have the potential to be more susceptible to other antimicrobials (4). Our study aimed to evaluate the impact of reduced colistin susceptibility on the potential for synergy and the bactericidal activity of unconventional colistin combinations.

The collection of isolates tested included three pairs of colistin-susceptible/resistant *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, and *P. aeruginosa* isolates and six clinical strains susceptible to colistin. Consistent with the literature (5, 17), the presence of a subpopulation heterogeneously resistant to colistin was observed for all tested isolates, regardless of the MIC value. However, colistin-resistant strains (MIC > 4 μ g/ml) exhibited higher proportions of subpopulations ($AUC_{0-\infty} > 472.17$) than their related susceptible strains ($AUC_{0-\infty} < 255$). These results suggest not only the high potential for selection of colistin-resistant subpopulations during therapy, but also the potential activity of unconventional antimicrobials and combinations, since increased susceptibility to a large panel of antimicrobial classes has been previously reported (16). The mechanisms behind the phenomenon of subpopulations heterogeneously resistant to colistin have been investigated in species such as *P. aeruginosa* and *A. baumannii*, but not much is known regarding species like *K. pneumoniae*. The roles of genes involved in membrane metabolism, such as the *pmr* genes encoding lipopolysaccharide modification enzymes or the *mexAB-oprM*,

mexCD-oprJ, and *muxABC-oprB* genes encoding antimicrobial efflux transporters, have been demonstrated (1, 8), suggesting the potential clinical impact of this phenomenon in multidrug-resistant Gram-negative isolates. The mechanisms responsible for the emergence of subpopulations heterogeneously resistant to colistin in our study are under investigation in order to further understand the impact of colistin exposure on phenotypic and genotypic characteristics of major Gram-negative pathogens.

Also consistent with previously published data (13), we found that colistin plus vancomycin, trimethoprim, or trimethoprim-sulfamethoxazole (1/19) displayed synergistic and bactericidal effects against all colistin-susceptible *A. baumannii* isolates. The time to achieve 99.9% kill was found to be only slightly delayed in ABm1 compared to the colistin-susceptible isolates, suggesting that the alterations responsible for colistin resistance in *A. baumannii* isolates do not significantly affect the potential for synergy of the 3 unconventional combinations.

In contrast with the literature, no activity was observed for colistin-susceptible trimethoprim- and trimethoprim-sulfamethoxazole-resistant *K. pneumoniae* isolates, (KP3 and KP4). Indeed, combinations of colistin plus trimethoprim or trimethoprim-sulfamethoxazole have been previously demonstrated to be synergistic against various Gram-negative species, including *P. aeruginosa*. Exceptions were made, however, for a few isolates that were sulfamethoxazole resistant (21), which was true of KP3 and KP4.

Of particular interest in this study, synergy and bactericidal activities were demonstrated for colistin plus vancomycin, trimethoprim, and trimethoprim-sulfamethoxazole at $0.25 \times$ and $0.5 \times$ MIC against Kpm1, a colistin-resistant derivative of *K. pneumoniae* ATCC 700603. As observed and previously suggested by Bergen et al. (5), the presence of higher proportions of subpopulations heterogeneously resistant to colistin in Kpm1 may favor the intracellular penetration and activity of the unconventional agents tested. Further investigations, including additional isolates and different experimental conditions, however, are warranted to better understand the impact of colistin and/or colistin resistance on the different components of antimicrobial resistance in *K. pneumoniae*.

Finally, and for the first time, we report on the activity and potential interest of colistin combinations against colistin-resistant strains of *P. aeruginosa*. Indeed, although no activity was observed with any of the tested combinations against the 3 tested colistin-susceptible *P. aeruginosa* strains, all the combinations showed synergy and/or bactericidal activity at $0.5 \times$ MIC against PAm1, the colistin-resistant derivative of *P. aeruginosa* ATCC 27853. Population analysis profiles of PA4, PA5, and *P. aeruginosa* ATCC 27853 revealed the presence of subpopulations heterogeneously resistant to colistin, but their proportions were significantly lower than for PAm1, which might explain why no synergy was observed in susceptible isolates. Further investigations, including extensive population analysis profiles and identification of markers of colistin resistance within the different species, are therefore warranted to better understand and estimate the clinical impact of our results.

Although our data suggest and somewhat confirm that colistin resistance is favorable to the *in vitro* activity of unconventional combinations, these results should be considered with care for several reasons. First, the antimicrobial concentrations required to observe synergy and bactericidal activities were well above clin-

ically relevant concentrations (up to 9, 40, 1.72, and 1.72/68 $\mu\text{g/ml}$ with colistin, vancomycin, trimethoprim, and trimethoprim-sulfamethoxazole standard therapies at steady state). However, small ΣFIC values recorded for ABm1 (less than 0.30) may suggest that lower (and perhaps clinically relevant) concentrations might result in synergy and bactericidal activity, but this remains to be confirmed. Finally, extrapolation of these results to any other Gram-negative bacilli may not be appropriate at present, since the colistin-resistant strains used in the study were generated *in vitro* from laboratory strains, and the mechanism(s) by which colistin resistance occurs in PAm1, ABm1, and KPm1 remains unclear. Additional *in vitro* and *in vivo* studies using the same or different antimicrobial agents and colistin-resistant clinical strains are therefore warranted.

Finally, it now seems crucial to evaluate the clinical significance of these observations and to better understand the dose-response relationships of combinations like colistin plus trimethoprim-sulfamethoxazole. Unconventional combinations, such as vancomycin plus colistin, may not have any clinical value, considering the risk of nephrotoxicity of each agent and the concentrations required to obtain bactericidal activity, but additional *in vitro* studies may provide more evidence or insights into the mechanism of colistin resistance and how it may be favorable to antimicrobial combinations.

ACKNOWLEDGMENTS

C.V., L.B., and R.E.D. have no conflicts to declare.

Financial support was provided to R.E.D. by the French Ministry for Education and Research and the French National Scientific Research Center. We also gratefully acknowledge the French Ministry for Education and Research for its financial support provided through an innovation project grant from the Université de Lorraine's technology development and transfer office. We also acknowledge the French Ministry for Education and Research, Lorraine region, and DRRT Lorraine (Délégation Régionale à la Recherche et à la Technologie).

The ABC Platform was deposited by the Université de Lorraine.

REFERENCES

- Adams MD, et al. 2009. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrAB two-component system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:3628–3634.
- Antoniadou A, et al. 2007. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *J. Antimicrob. Chemother.* 59:786–790.
- Bercot B, Poirel L, Dortet L, Nordmann P. 2011. *In vitro* evaluation of antibiotic synergy for NDM-1-producing Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:2295–2297.
- Bergen PJ, et al. 2011. Clinically relevant plasma concentrations of colistin in combination with imipenem enhance pharmacodynamic activity against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* at multiple inocula. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:5134–5142.
- Bergen PJ, et al. 2011. Synergistic killing of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* at multiple inocula by colistin combined with doripenem in an *in vitro* pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:5685–5695.
- Bratu S, et al. 2005. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3018–3020.
- Bryson V, Szybalski W. 1952. Microbial selection. *Science* 116:45–51.
- Champlin FR, Gilleland HE, Jr, Conrad RS. 1983. Conversion of phospholipids to free fatty acids in response to acquisition of polymyxin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 24:5–9.
- Chiang WC, Pamp SJ, Nilsson M, Givskov M, Tolker-Nielsen T. 2012. The metabolically active subpopulation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms survives exposure to membrane-targeting antimicrobials via distinct molecular mechanisms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 65:245–256.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard, 9th ed. CLSI, Wayne, PA.
- Conrad RS, Gilleland HE, Jr. 1981. Lipid alterations in cell envelopes of polymyxin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *J. Bacteriol.* 148:487–497.
- Eliopoulos GM, Moellering RC. 1991. Antimicrobial combinations, p 432–492. In Lorian V (ed), *Antibiotics in laboratory medicine*. Williams & Wilkins Co., Baltimore, MD.
- Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, Fortuna M, Scalise G. 1999. *In vitro* activity of cationic peptides alone and in combination with clinically used antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 44:641–645.
- Gordon NC, Png K, Wareham DW. 2010. Potent synergy and sustained bactericidal activity of a vancomycin-colistin combination versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:5316–5322.
- Hornsey M, Wareham DW. 2011. *In vivo* efficacy of glycopeptide-colistin combination therapies in a *Galleria mellonella* model of *Acinetobacter baumannii* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:3534–3537.
- Reference deleted.
- Li J, et al. 2007. Antibigrams of multidrug-resistant clinical *Acinetobacter baumannii*: promising therapeutic options for treatment of infection with colistin-resistant strains. *Clin. Infect. Dis.* 45:594–598.
- Li J, et al. 2006. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect. Dis.* 6:589–601.
- Li J, et al. 2010. Targeting multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: pharmacodynamics of the combination of colistin and ciprofloxacin, abstr P1608. *In Prog. 20th Eur. Congr. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* April 2010, Vienna, Austria.
- Li J, et al. 2006. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:2946–2950.
- Nordmann P, Cuzon G, Naas T. 2009. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect. Dis.* 9:228–236.
- Simmons NA. 1970. Colistin, sulphamethoxazole, and trimethoprim in synergy against Gram-negative bacteria. *J. Clin. Pathol.* 23:757–764.
- Soon RL, et al. 2011. Different surface charge of colistin-susceptible and -resistant *Acinetobacter baumannii* cells measured with zeta potential as a function of growth phase and colistin treatment. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:126–133.
- Suh JY, et al. 2010. Nonclonal emergence of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from blood samples in South Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:560–562.
- Vuorio R, Vaara M. 1992. The lipid A biosynthesis mutation lpxA2 of *Escherichia coli* results in drastic antibiotic supersusceptibility. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:826–829.
- Wareham DW, Gordon NC, Hornsey M. 2011. *In vitro* activity of teicoplanin combined with colistin versus multidrug-resistant strains of *Acinetobacter baumannii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 66:1047–1051.

Résistance à la colistine chez *Klebsiella pneumoniae*... Et la capsule dans tout ça !?

Contexte

Comme nous l'avons vu dans la première partie, la résistance à la colistine peut être associée à l'expression de mécanismes de résistance différents. Certains auteurs ont émis l'hypothèse que, chez certaines bactéries, la capsule pouvait être impliquée dans un mécanisme de résistance à la colistine ; et les bactéries du genre *Klebsiella* possèdent une capsule (Drancourt, 2007) (Figure 30).

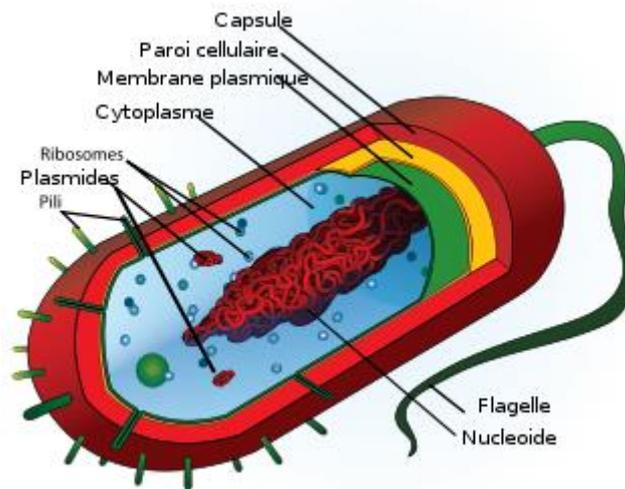


Figure 30 : Ultrastructure bactérienne.

Éléments constants (i.e. présents chez toutes les bactéries) : paroi cellulaire, membrane plasmique, cytoplasme, ribosomes, nucléotide.

Éléments inconstants (i.e. présents chez certaines bactéries) : capsule, pili, flagelle, plasmides.

Chez la bactérie *Klebsiella pneumoniae* il n'y pas de flagelle.

Etienne DAGUE et son équipe, au sein du LAAS-CNRS de Toulouse, travaillent au développement de la Microscopie à Force Atomique (AFM) pour l'étude du Vivant ; et plus particulièrement pour l'étude des membranes biologiques. Depuis plusieurs années nous avons établi une collaboration entre l'UMR 7565, SRSMC, CNRS-UL et le LAAS-CNRS pour étudier et caractériser les membranes et/ou parois microbiennes suite à un traitement par des anti-infectieux. Ce travail, fructueux, a débouché sur de nombreuses publications et a fait l'objet d'un Doctorat d'Université : la thèse de Cécile FORMOSA en 2014.

Depuis nous continuons notre collaboration...

Objectifs

Nous avons voulu déterminer, en utilisant la Microscopie à Force Atomique (ou « Atomic Force Microscopy » AFM), si la capsule de *Klebsiella pneumoniae* pouvait être impliquée dans le mécanisme de résistance à la colistine.

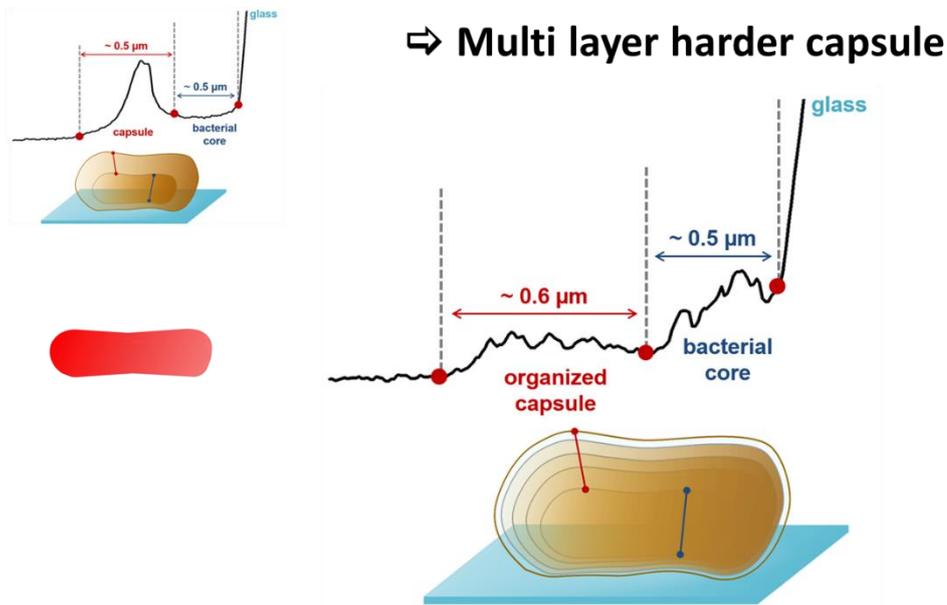
Méthodes

Nous avons utilisé deux souches de *K. pneumoniae* : une souche sensible à la colistine (i.e. *K. pneumoniae* ATCC 700603, KpATCC) et son mutant résistant à la colistine (i.e. KpATCCm, avec une CMI pour la colistine supérieure à 16 mg/L). Dans un premier temps, nous avons effectué une analyse génotypique basée sur l'expression de gènes impliqués dans la synthèse LPS et dans l'addition du groupement L-Ara4N. Nous avons aussi exploré le statut (i.e. invalidation) du gène *mgrB*. Puis dans un deuxième temps, nous avons réalisé une analyse phénotypique en utilisant la microscopie de force atomique (AFM). Le module Young a été extrait de courbes de force en utilisant le modèle de Hertz, et les valeurs de rigidité ont été extraites de courbes de force en utilisant le modèle de Hooke.

Résultats

Nous n'avons pas réussi à observer une variation dans l'expression des gènes impliqués dans la synthèse de LPS ou l'addition du groupement L-Ara4N dans le KpATCCm, en l'absence ou en présence de colistine (par rapport au niveau d'expression relevés chez KpATCC). Cela nous a amené à identifier une mutation par insertion dans le gène *mgrB* chez KpATCCm. En outre, les résultats des études phénotypiques réalisées par AFM, ont montré qu'un traitement par la colistine « retirait » la capsule chez la souche sensible (KpATCC), mais pas chez la souche résistante. Les données nanomécaniques sur la souche résistante (KpATCCm) ont montré que la colistine augmentait le module Young de la capsule. Les courbes de force enregistrées au-dessus des cellules nous ont permis de faire l'hypothèse suivante sur la nanoarchitecture de la capsule des deux souches : KpATCC a une capsule souple composée d'une couche, tandis que la capsule KpATCCm est plus dure et organisée en plusieurs couches (Figure 31).

The capsular nanoarchitecture



⇒ Does this structure participate to the colistin resistance?

Figure 31 : Etude de l'architecture de la capsule de *K. pneumoniae* à l'échelle nanométrique.

En haut à gauche, *K. pneumoniae* ATCC 700603 (KpATCC ou « colistine sensible »).

Au premier plan, KpATCCm (mutant « colistine résistant » de KpATCC).

Les données AFM nous suggère la présence d'une seule couche « molle » de capsule chez *K. pneumoniae* « colistine sensible » ; tandis que chez *K. pneumoniae* « colistine-résistant », la capsule est plus rigide, plus « dure », avec une architecture organisée en feuillets.

Discussion/Conclusion

Ces résultats nous amènent à émettre l'hypothèse que les polysaccharides de la capsule pourraient être impliqués dans le mécanisme de résistance à la colistine chez certaines souches de *K. pneumoniae*, en fonction de leur génotype.

Publication n°2

Formosa C., Herold M., Vidailac C., Duval R.E., Dague E.

Unraveling of a mechanism of resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* thanks to
Atomic Force Microscopy.

J. Antimicrob. Chemother. (2015) 70, 2261-2270.

Unravelling of a mechanism of resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* using atomic force microscopy

C. Formosa^{1–4}, M. Herold^{3–5}, C. Vidailac^{3,4†}, R. E. Duval^{3–5} and E. Dague^{1,2*}

¹CNRS, LAAS, 7 avenue du Colonel Roche, F-31400 Toulouse, France; ²Université de Toulouse, LAAS, F-31400 Toulouse, France; ³CNRS, UMR 7565, SRSMC, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France; ⁴Université de Lorraine, UMR 7565, SRSMC, Faculté de Pharmacie, F-54001 Nancy, France; ⁵ABC Platform[®], F-54001 Nancy, France

*Corresponding author. Tel: +0033-5-61-33-78-41; E-mail: edague@laas.fr

†Present address: CRP-Santé, Clinical and Epidemiological Investigation Center (CIEC), 1A rue Thomas Edison, L1445 Strassen, Luxembourg.

Received 8 September 2014; returned 13 October 2014; revised 7 April 2015; accepted 8 April 2015

Objectives: In this study we focused on the mechanism of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*.

Methods: We used two strains of *K. pneumoniae*: a colistin-susceptible strain (*K. pneumoniae* ATCC 700603, KpATCC) and its colistin-resistant derivative (KpATCCm, MIC of colistin 16 mg/L). We performed a genotypic analysis based on the expression of genes involved in LPS synthesis and L-Ara4N moiety addition. We also explored the status of the *mgrB* gene. Then, a phenotypic analysis was performed using atomic force microscopy (AFM). The Young modulus was extracted from force curves fitted using the Hertz model, and stiffness values were extracted from force curves fitted using the Hooke model.

Results: We failed to observe any variation in the expression of genes implicated in LPS synthesis or L-Ara4N moiety addition in KpATCCm, in the absence of colistin or under colistin pressure (versus KpATCC). This led us to identify an insertional inactivation/mutation in the *mgrB* gene of KpATCCm. In addition, morphology results obtained by AFM showed that colistin removed the capsule from the susceptible strain, but not from the resistant strain. Nanomechanical data on the resistant strain showed that colistin increased the Young modulus of the capsule. Extend force curves recorded on top of the cells allowed us to make the following hypothesis about the nanoarchitecture of the capsule of the two strains: KpATCC has a soft capsule consisting of one layer, whereas the KpATCCm capsule is harder and organized in several layers.

Conclusions: We hypothesize that capsular polysaccharides might be implicated in the mechanism of colistin resistance in *K. pneumoniae*, depending on its genotype.

Keywords: *K. pneumoniae*, colistin resistance, gene expression, capsules, atomic force microscopy

Introduction

Klebsiella pneumoniae, a member of the Enterobacteriaceae family, has been recognized for more than 100 years as a cause of community-acquired pneumonia.¹ However, the vast majority of *Klebsiella* infections are associated with hospitalization; urinary tract, bloodstream, lung as well as abdominal cavity infections have now become common. Numerous virulence factors have been described for *K. pneumoniae*, such as extracellular capsules. These are essential for the species' virulence, since the capsular material forms thick bundles of fibrillous structures that cover the bacterial surface in massive layers.² This protects the bacteria from phagocytosis and prevents killing by bactericidal serum factors.³ Another important feature of *K. pneumoniae* is its ability to resist a large number of antibiotics through multiple mechanisms (production of enzymes, lack of permeability and efflux pumps).

For example, within a few years after the introduction of cephalosporins, *K. pneumoniae* strains within hospitals were shown to produce β -lactamases able to inactivate these agents. These β -lactamases were in fact ESBLs, and are plasmid-mediated enzymes that hydrolyse oxyimino- β -lactams. Because these plasmids are mobile genetic elements, they spread and evolve rapidly;⁴ they now also carry genes for resistance to other antibiotics, including aminoglycosides, chloramphenicol and sulphonamides. Therefore, *K. pneumoniae* strains containing these plasmids are MDR.^{2,3,5} However, many ESBLs are readily inhibited by the commercially available β -lactamase inhibitors (clavulanic acid, tazobactam and sulbactam),⁶ which serve as an important phenotypic test to identify ESBLs. In this study, we have specifically worked on the well-characterized *K. pneumoniae* ATCC 700603 strain, a clinical isolate obtained from a patient in the USA in 1994, which produces an ESBL called SHV-18.^{7–9}

Because this ESBL is sensitive to clavulanic acid, this strain has been used as a reference strain for quality control in ESBL detection.

Management and treatment of ESBL-producing *K. pneumoniae* infections can be challenging. Currently, carbapenems are the only class of antibiotics that have consistently been effective against ESBL-producing *K. pneumoniae*. However, bacteria have developed carbapenemases (KPCs), which are ESBL-like enzymes that confer resistance to extended-spectrum cephalosporins and carbapenems.^{1,6,10} Therefore, clinicians have had to turn to an old antibiotic of the polymyxin class, colistin, as a last-resort agent for the treatment of infections caused by MDR *K. pneumoniae*.¹¹ Polymyxins are cyclic lipodecapeptides that are strongly cationic. They were discovered as early as 1947¹² and were widely used at that time. However, following reports on nephrotoxicity and neurotoxicity in the 1970s, they were largely replaced by other, less toxic antibiotics.^{13,14} Polymyxin B and polymyxin E (colistin) are the main antibiotics of this group, and the only ones used clinically. They are bactericidal and act rapidly and specifically on Gram-negative bacteria. Here, we have focused on colistin, which, like polymyxin B, has as its initial target the LPS of the outer membrane of Gram-negative bacteria. Because of its positive charges, colistin interacts electrostatically with LPS and competitively displaces divalent cations from the phosphate groups of lipid A of LPS.¹⁵ This results in a change in the permeability of the cell wall, leakage of cell contents and subsequently cell death.^{15,16} However, some authors argue that interaction with membranes is a part of the activity of polymyxin but not actually the lethal event.¹⁷ Therefore, the precise mechanism of action of colistin remains contentious,¹⁸ especially for capsulated bacterial species such as *K. pneumoniae*. Mechanisms resulting in decreased susceptibility to colistin are also unclear, and only two mechanisms of resistance, involving the modification of the extracellular capsule or the initial target of colistin, LPS, are currently recognized.¹¹ The main and most effective modification of LPS in *K. pneumoniae* involves the addition of the L-Ara4N (4-amino-4-deoxy-L-arabinose) moiety to lipid A,¹⁹ which is mediated by the two-component systems PmrA/PmrB and PhoP/PhoQ.^{20,21} This modification of the lipid A confers a less negative charge on the bacterial LPS, which leads to colistin resistance.²² Recently, another mechanism of colistin resistance was discovered; it involves mutation/inactivation of the *mgrB* gene. In *K. pneumoniae*, the disruption of *mgrB* can up-regulate the PhoP/PhoQ system and the operon *arnBCADTEF*, responsible for the addition of the L-Ara4N moiety to lipid A.²³ Therefore, the *mgrB* gene has been described as a key target for acquired resistance to colistin.²⁴

In this study, we investigated these two main mechanisms of colistin resistance in *K. pneumoniae*, using *K. pneumoniae* ATCC 700603 as a control strain and its colistin-resistant derivative, KpATCCm. To carry out this study, we first measured the level of expression of genes involved in the synthesis of LPS (*lpxA*, *lpxC* and *msbA*) and those involved in the synthesis of the L-Ara4N moiety (*pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP*, *phoQ* and *arnT*) in both colistin-susceptible and colistin-resistant strains, with and without colistin for KpATCCm. We then investigated whether the *mgrB* gene was inactivated in the colistin-resistant strain. In a second part of the study, we used atomic force microscopy (AFM) to compare the surface properties of the extracellular capsule of *K. pneumoniae* ATCC 700603 and of KpATCCm, as well as their respective responses under colistin pressure in order to understand the

mechanism of colistin resistance from the ‘outside’. Since its invention in 1986,²⁵ AFM has developed into a powerful technology in biology,²⁶ especially to probe the effects of antimicrobial drugs on live bacteria or fungi.^{27–30} Although the effects of colistin have already been shown by AFM on cells of *Pseudomonas* and *Acinetobacter baumannii*,^{31–33} no work has been performed on live cells of *K. pneumoniae* using AFM in liquid conditions. The results of this original study combine both a genotypic and a phenotypic analysis of mechanisms of colistin resistance in KpATCCm and under colistin pressure.

Materials and methods

Bacterial growth conditions

The bacteria *K. pneumoniae* ATCC 700603 and its colistin-resistant derivative KpATCCm (ABC Platform® Bugs Bank) were stocked at -80°C , revived on cation-adjusted Mueller–Hinton agar (BD, 211438) and grown in CAMHB (BD, 212322) for 24 h at 37°C . Antibiograms of the two strains are presented in Table S1 (available as Supplementary data at JAC Online).

Colistin treatment

MICs of colistin sulphate salt (Sigma-Aldrich, C4461-1G) were calculated for each strain according to the macrodilution method provided by the CLSI.³⁴ For *K. pneumoniae* ATCC 700603, the MIC of colistin was found to be 0.5 mg/L and that for KpATCCm was found to be 16 mg/L. These results were confirmed by antibiograms performed using an automated Vitek 2 system (bioMérieux, France) (Table S1). For gene expression experiments, RNAs were isolated from bacterial cells grown in CAMHB containing colistin at a concentration of $0.25 \times \text{MIC}$ or $0.5 \times \text{MIC}$ at 37°C to mid-log. For AFM experiments, bacteria were grown in CAMHB containing colistin at a concentration of $0.5 \times \text{MIC}$ or $0.75 \times \text{MIC}$ for 18–20 h at 37°C .

Genomic characterization and gene expression

RNAs were extracted using the RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, 74136) and RNA concentration was measured at 260 nm using a NanoPhotometer® P-class (Implen, Munich, Germany). Reverse transcription was performed using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, 170-8891). Sequences of primers were designed using Primer 3 and are listed in Table 1. No quantitative PCR (qPCR) reaction was performed for the *mgrB* gene. PCR products were analysed by gel electrophoresis. A molecular marker (EZ Load 100 bp molecular ruler, Bio-Rad, 170-8352) that includes 100–1000 bp in exact 100 bp increments was used. For the other genes, qPCR was performed using SsoAdvanced SYBR Green Supermix (Bio-Rad, 172-5264) on a CFX96 thermocycler (Bio-Rad). *16S* was used as the reference gene and efficacy was determined for each annealing temperature. Analyses were carried out in triplicate in three independent experiments. The data were stored and reprocessed according to the Pfaffl method with the associated software (Bio-Rad CFX Software Manager™ v2.1, Bio-Rad, Marnes la Coquette, France).

Sample preparation for AFM experiments

Bacterial cells were concentrated by centrifugation (4500 g, 3 min), washed twice in $1 \times \text{PBS}$ (Sigma, P3813-10PAK, filtered on 0.22 μm filters), resuspended in $1 \times \text{PBS}$ to a concentration of $\sim 10^8$ cells/mL and immobilized on polyethylenimine (PEI; Fluka P3142-100 mL)-coated glass slides (prepared as described elsewhere³⁵). Briefly, freshly oxygen-activated glass slides were covered with 0.2% PEI solution in deionized water and left for incubation overnight. Then the glass slides were rinsed with 20 mL of Milli-Q water and nitrogen dried. A total of 1 mL of the bacterial

Table 1. Primers used in this study

Gene name	Forward primer (F) (5'→3')	Reverse primer (R) (5'→3')	Accession number/reference
<i>16S</i>	TCA-TGG-CTC-AGA-TTG-AAC-GCT	TGC-GGT-ATT-AGC-TAC-CGT-TTC-C	NC_009648
<i>lpxA</i>	CCA-CAC-CAA-AAT-CGG-CCG-TGA	CCA-ACC-ATA-ACG-TGT-GAG-CCA	NC_009648
<i>lpxC</i>	TCA-CAC-TGA-CGT-TAC-GCC-CTG	CAT-CTT-CGA-CGC-GAA-CCG-TCT-C	NC_009648
<i>msbA</i>	CGG-GCT-AAT-CGT-AGC-GGC-GGT-G	TAA-TCG-ATG-CCC-CTT-CGC-GGA-C	NC_009648
<i>pmrA</i>	ATC-TGC-GCC-TTA-ACG-TCA-CT	ATG-CAC-TTC-CAG-GGT-ATT-GG	A79E_3435
			CDS T02213
<i>pmrB</i>	AGA-TGA-CCA-CCA-GCA-TTT-CC	GAG-ACG-ACG-GTC-TCG-TTT-TC	KPN_00806
			CDS T00566
<i>pmrD</i>	AAA-GTA-CAG-GAC-AAC-GCT-TCG	CAA-CGC-TCG-CTG-CTA-TAA-TG	KPN_02444
			CDS T00566
<i>phoP</i>	TCA-GGT-TTT-CCG-GGA-TGT-CG	CGA-ATT-GCG-CTG-ATG-AAG-GG	HF536482
<i>phoQ</i>	CAC-CAT-ATA-GCT-GCG-CTT-GA	GCA-ATG-GCT-TCC-ATG-AGA-TT	HF536482
<i>arnT</i>	CCG-TTT-GCT-TTG-GCA-ACC-CGA	CAC-CCC-AGA-AGC-TGC-ACA-TCC	NC_009648
<i>mgrB</i>	TTA-AGA-AGG-CCG-TGC-TAT-CC	AAG-GCG-TTC-ATT-CTA-CCA-CC	23

suspension was then applied to the PEI-coated glass slide, allowed to stand for 1 h and rinsed with 1× PBS.

AFM experiments

Images were recorded in 1× PBS in the Quantitative Imaging™ mode available on the Nanowizard III AFM (JPK Instruments, Berlin, Germany), with MLCT AUWH cantilevers (nominal spring constant 0.01 N/m; Bruker, USA) at an applied force of 1 nN, with a z length between 2 and 3 μm and an approach–retract speed between 130 and 250 μm/s. Cantilever spring constants were measured prior to each experiment using the thermal noise method.³⁶ Force curves were recorded in force volume mode at an applied force of 2.0 nN. Data were processed using JPK data processing software (JPK Instruments, Berlin, Germany). For nanomechanical data, the Hertz model was used to extract Young modulus values and the Hooke model to extract stiffness values. The Hertz model gives the force *F* as a function of the indentation (*δ*) and the Young modulus (*E*) according to the equation $F = (2 \cdot E \cdot \tan \alpha) / (\pi \cdot (1 - \nu^2)) \cdot \delta^2$, where *α* is the tip opening angle (35°) and *ν* the Poisson ratio (arbitrarily assumed to be 0.5).³⁷ The Hooke model considers the couple cantilever/cell wall as a spring. The stiffness of the cell wall (*k_{cell}*) is therefore determined from the slope of the linear portion of the raw force curves, according to $k_{cell} = k(s/1 - s)$, where *s* is the experimentally accessible slope of the compliance region reached for sufficient loading forces and *k* is the cantilever spring constant.³⁸

Results

Colistin resistance in KpATCCm is mediated by mgrB inactivation

We first investigated the expression of the genes involved in both the constitutive pathway of LPS synthesis and the addition of the L-Ara4N moiety. The results are presented in Table 2, and show that whatever the strain studied (colistin-resistant KpATCCm or colistin-susceptible KpATCC 700603), no modification of expression was observed in any of the gene groups analysed (i.e. LPS genes or L-Ara4N genes). This observation was also true upon treatment of the colistin-resistant KpATCCm strain with different concentrations of colistin (i.e. 0.25×MIC or 0.5×MIC) (Table 2). Therefore, in order to understand the genetic cause of the resistance of KpATCCm, we decided to study the status of the *mgrB* gene. To this end, the *mgrB*

Table 2. Monitoring of gene expression in KpATCCm, KpATCCm_{1/4} and KpATCCm_{1/2} compared with KpATCC

	Relative normalized expression ± SD			
	KpATCC	KpATCCm	KpATCCm _{1/4}	KpATCCm _{1/2}
<i>lpxA</i>	1	0.10 ± 0.57	0.01 ± 0.01	0.05 ± 0.02
<i>lpxC</i>	1	0.08 ± 0.43	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.02
<i>msbA</i>	1	0.06 ± 0.32	0.01 ± 0.00	0.04 ± 0.02
<i>pmrA</i>	1	0.17 ± 0.64	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<i>pmrB</i>	1	0.12 ± 0.43	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01
<i>pmrD</i>	1	0.09 ± 0.34	0.01 ± 0.01	0.04 ± 0.02
<i>phoP</i>	1	0.12 ± 0.45	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.01
<i>phoQ</i>	1	0.11 ± 0.41	0.01 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<i>arnT</i>	1	0.12 ± 0.51	0.01 ± 0.01	0.06 ± 0.03

gene was amplified by PCR both in KpATCC and in its colistin-resistant derivative, KpATCCm. Amplicons were then subsequently analysed by gel electrophoresis (Figure 1). After migration, we observed that the amplicons of KpATCCm migrated less than those of KpATCC, which indicates that they are larger than those of KpATCC. Therefore, we concluded that, for KpATCCm, the *mgrB* gene presents an insertion, estimated to be ~1000 bp (Figure 1). These results thus led us to conclude that colistin resistance in KpATCCm is mediated, at least in part, by *mgrB* inactivation.

Colistin removes the capsule from the susceptible strain

In the second part of this study we chose to use AFM to evaluate the morphological and nanomechanical differences between the colistin-susceptible strain and the colistin-resistant derivative strain. *K. pneumoniae* ATCC 700603 was first probed in native conditions or under colistin treatment, with AFM used in the Quantitative Imaging™ mode.³⁹ Figure 2 presents the morphological modifications of the bacteria submitted to colistin treatment. The height image in Figure 2(a) shows two bacterial cells surrounded by their capsule in the absence of colistin; the cross-section data show

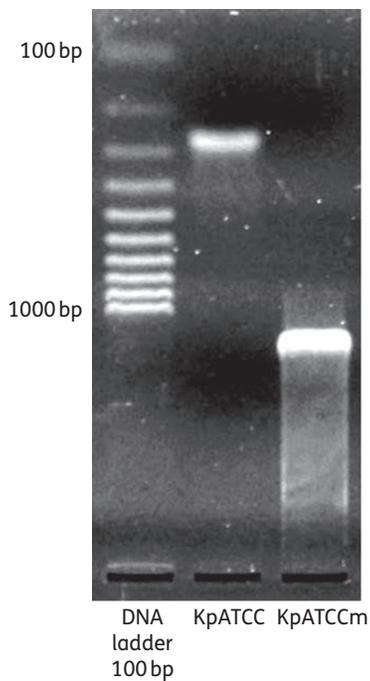


Figure 1. Gel electrophoresis of *mgrB* amplicons of KpATCC and KpATCCm.

that bacteria are $0.88 \pm 0.11 \mu\text{m}$ high and $1.12 \pm 0.15 \mu\text{m}$ wide, whereas the capsule is $0.56 \pm 0.09 \mu\text{m}$ high but covers a surface $3.46 \pm 0.28 \mu\text{m}$ in width (Figure 2b, values measured on five cells from three independent cultures). Regarding the extend force curves obtained on untreated cells, at a high applied force (2 nN), 81.3% of them ($n=5120$) showed a spike that could correspond to the moment where the tip touches the capsule and moves through it, then through the bacterial cell, before reaching the glass slide (linear portion of the force curve) (Figure 2c). When cells were treated with colistin, at either $0.5 \times \text{MIC}$ (0.25 mg/L; Figure 2d–f) or $0.75 \times \text{MIC}$ (0.375 mg/L; Figure 2g–i), the capsule was no longer visible around the cells, which was confirmed by the cross-sections showing only the bacterial profile, with a height of $0.88 \pm 0.06 \mu\text{m}$ and a width of $1.13 \pm 0.11 \mu\text{m}$ (values measured on 10 cells from six independent cultures). The extend force curves recorded on these cells did not display a spike, allowing us to hypothesize that these spikes correspond to the rupture of the capsule by the AFM tip.

Colistin-resistant strain KpATCCm displays a different capsular organization

In the case of the colistin-resistant derivative of *K. pneumoniae* ATCC 700603 (i.e. KpATCCm), as can be seen on the height images in Figure 3(a, d and g), this strain did not show any adverse

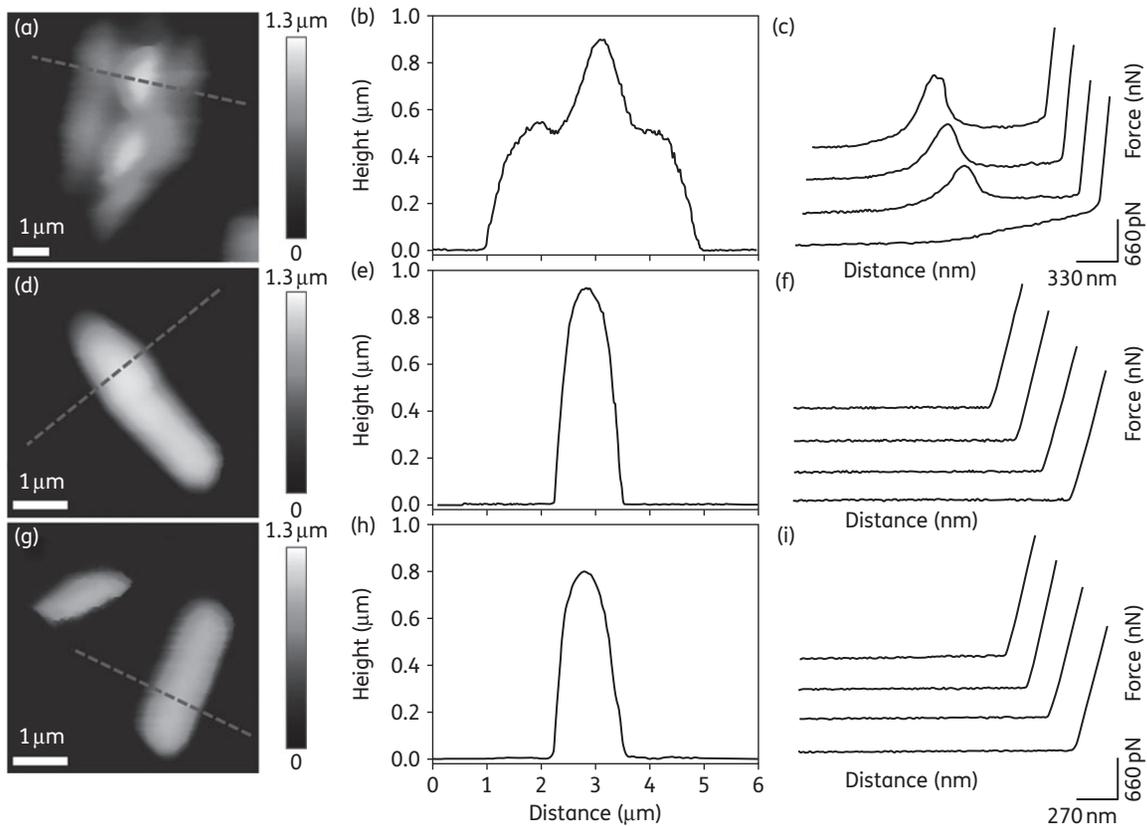


Figure 2. Imaging of *K. pneumoniae* ATCC 700603 cells. Height image of *K. pneumoniae* ATCC 700603 cells in native conditions (a), treated with colistin at $0.5 \times \text{MIC}$ (0.25 mg/L) (d) or treated with colistin at $0.75 \times \text{MIC}$ (0.375 mg/L) (g). (b, e and h) Cross-sections recorded along the broken lines in (a), (d) and (g), respectively. (c, f and i) Representative extend force curves recorded on small areas on top of cells presented in (a), (d) and (g), respectively. In each condition, force curves were recorded on five cells from three independent cultures (total of 5120 force curves per condition).

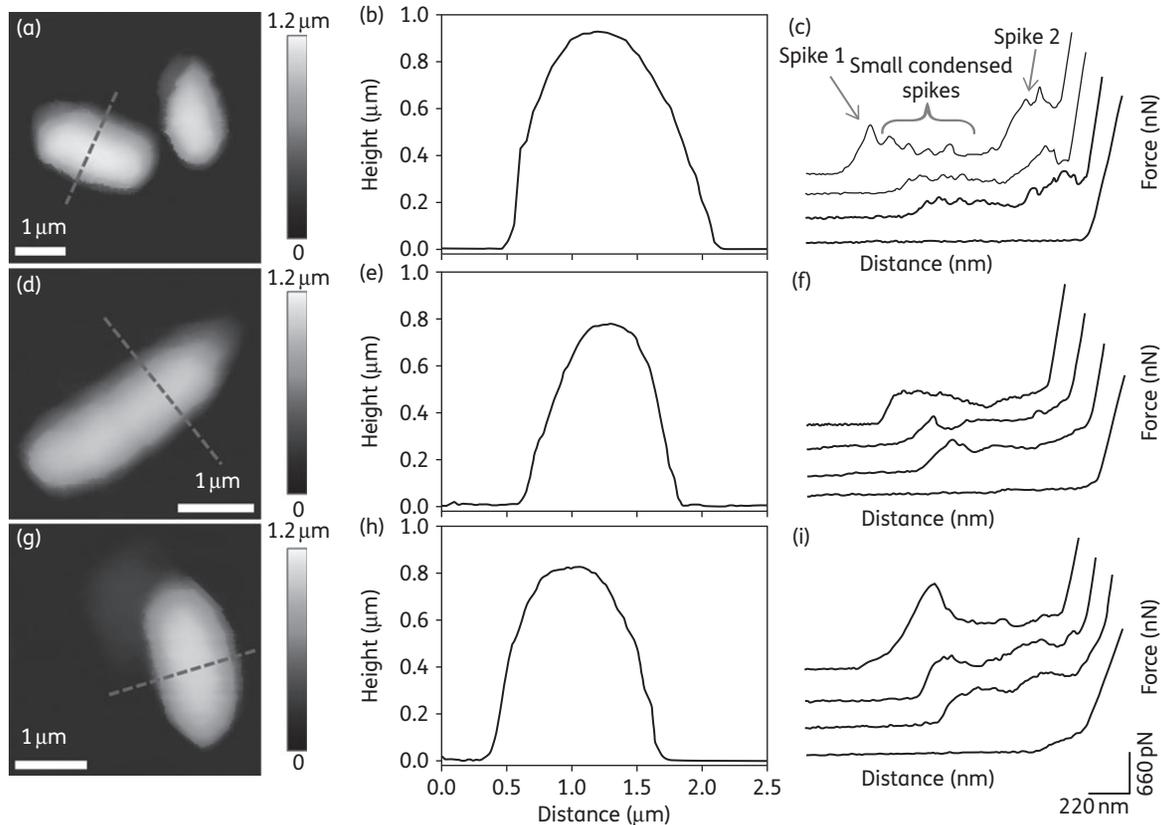


Figure 3. Imaging of *K. pneumoniae* colistin-resistant cells. Height image of *K. pneumoniae* colistin-resistant cells in native conditions (a), treated with colistin at $0.5\times\text{MIC}$ (8 mg/L) (d) or treated with colistin at $0.75\times\text{MIC}$ (12 mg/L) (g). (b, e and h) Cross-sections recorded along the broken lines on (a), (d) and (g), respectively. (c, f and i) Representative extend force curves recorded on small areas on top of cells presented in (a), (d) and (g), respectively. In each condition, force curves were recorded on five cells from three independent cultures (total of 5120 force curves per condition).

morphological changes after colistin treatment. Indeed, the cross-sections in Figure 3(b, e and h) show the same profile in the three different conditions: native or colistin treatment at $0.5\times\text{MIC}$ (8 mg/L) or at $0.75\times\text{MIC}$ (12 mg/L). The bacteria were $0.83\pm 0.06\ \mu\text{m}$ high and $1.50\pm 0.11\ \mu\text{m}$ wide, thus larger than the susceptible strain (values measured on 15 cells from nine independent cultures). It was at this stage that differences were first observed between the two strains. Even in native conditions, unlike KpATCC, KpATCCm did not have a capsule covering a large surface area. However, since KpATCCm cells were wider than susceptible strain cells, we can conclude that its capsule had a different morphology and was tightly bound to the bacterial cell wall. But the most interesting data obtained on KpATCCm cells were the extend force curves, presented in Figure 3(c, f and i). In native conditions, force curves displayed two spikes. After the first one on the left of the force curve (the one that was further away from the contact point), small condensed spikes were visible, suggesting that successive layers were ruptured by the AFM tip. When cells were treated with colistin the force curves presented the same profile, except that the small condensed spikes were not observed after the first spike, meaning that the several layers observed in native conditions were no longer present. In the three conditions mentioned earlier in this paragraph, the linear portions of the force curves corresponded to the contact of the tip with the glass slide, as force curves recorded on the glass slide with the

same tip presented the same slope (data not shown). At this stage, the morphology data and the extend force curves recorded on cells of the susceptible and resistant strains of *K. pneumoniae* demonstrated that colistin was able to remove the capsule from the bacteria only in the case of the susceptible strain, and that the two strains presented a different capsular organization that could be probed using force spectroscopy. However the force curves of treated KpATCCm cells indicated that this capsular organization was lost upon treatment. We then investigated the effects of colistin on the nanomechanical properties of the cells.

Colistin modifies the nanomechanical properties of KpATCC and KpATCCm

Figure 4 presents the nanomechanical results obtained on the susceptible strain of *K. pneumoniae*. In native conditions, extend force curves obtained on cells, converted into indentation curves (Figure 4b, grey line) and fitted through the Hertz model (Figure 4b, empty circles) indicate, according a first interpretation of the force curves, to the stiffness of the capsule. Stiffness values measured on five cells from three independent cultures were on average of $3.6\pm 1.0\ \text{kPa}$ (Figure 4a). However, when cells were treated with colistin, whatever the dose, force curves showed only a few nanometres of indentation and could not be fitted using the Hertz model. After verifying that the slope of these force curves was

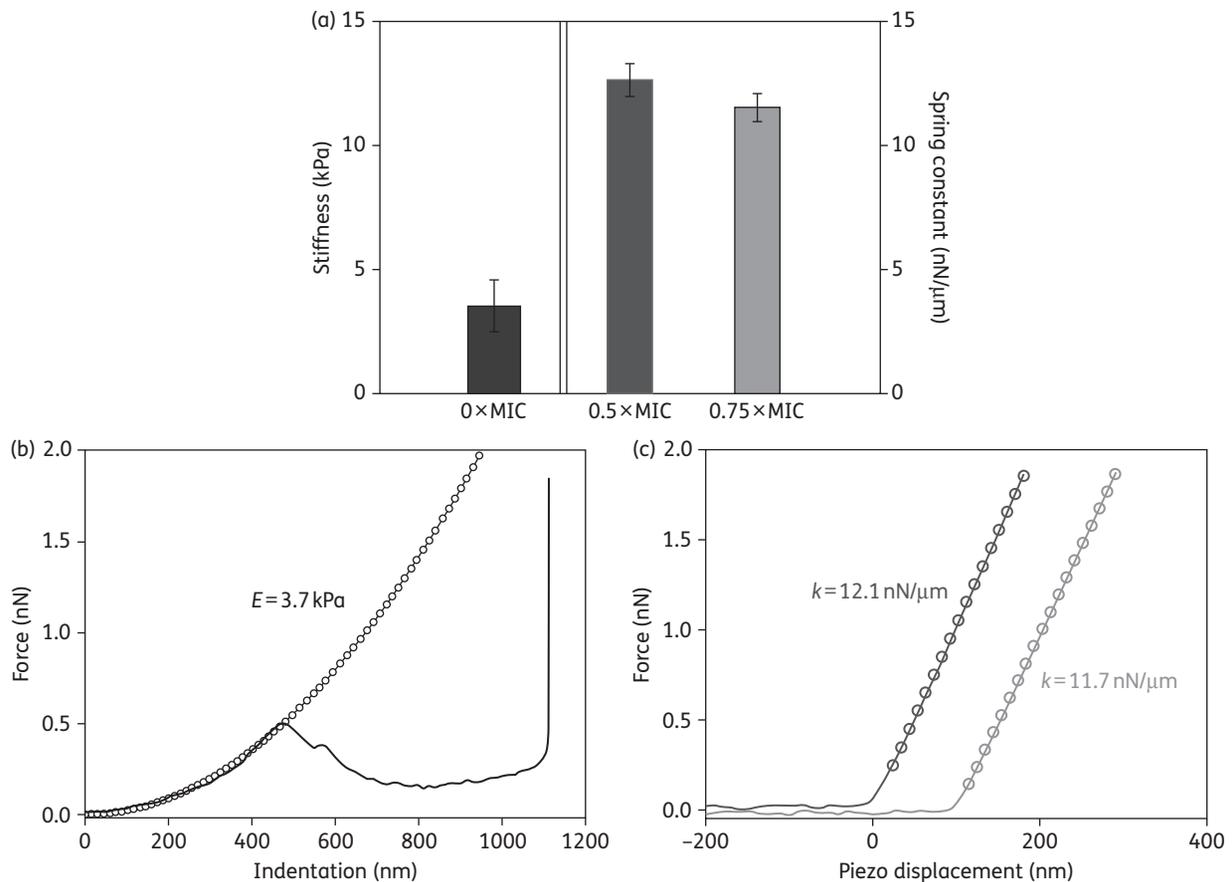


Figure 4. Nanomechanical properties of *K. pneumoniae* ATCC 700603 cells. (a) Histogram presenting the stiffness values measured on cells in native conditions (dark grey bar) and the bacterial spring constants measured on cells treated with colistin at 0.5×MIC (0.25 mg/L; mid-grey bar) or 0.75×MIC (0.375 mg/L; light grey bar). In each case, values were measured on three cells from three independent cultures. (b) Representative indentation curve obtained from the top of a cell in native conditions (grey line), fitted using the Hertz model (circles). (c) Representative force curves obtained for cells treated with colistin at 0.5×MIC (0.25 mg/L; dark grey line) or treated with colistin at 0.75×MIC (0.375 mg/L; light grey line), fitted using the Hooke model (circles).

different from those of force curves recorded on glass slides (Figure S1), we chose to analyse them with the Hooke model, which considers the couple cantilever/cell wall as a spring. This model can be used to obtain the bacterial spring constant, expressed in N/m. Figure 4(c) shows the force curves obtained for cells treated with colistin at 0.5×MIC (0.25 mg/L) and 0.75×MIC (0.375 mg/L), fitted using the Hooke model. The results obtained on five cells from three independent cultures in each case were $12.6 \pm 0.7 \text{ nN}/\mu\text{m}$ for treatment at 0.5×MIC and $11.5 \pm 0.6 \text{ nN}/\mu\text{m}$ for treatment at 0.75×MIC. The difference between these two conditions was not significant. These results allow us to conclude that, in native conditions, cells are covered by the capsule, and only the stiffness of this capsule can be measured. However, when cells were treated with colistin, the capsule was removed from the surface, allowing access of the tip to the bacterial cell wall. The cell wall was not soft enough for the tip to indent into it; as we could not compare spring constant values with those of untreated cells, where the cell wall was not accessible, it is impossible to conclude whether the cell wall is naturally stiff, or whether the high stiffness is a result of the colistin treatment.

In the case of the colistin-resistant strain, KpATCCm, the situation was different, since colistin seemed to have no effect on the morphology of the cells (Figure 3). However, extend force curves acquired on cells treated with colistin suggested that the organization of the capsule, visible in native conditions, was lost upon treatment. In native conditions we could fit the first spike of the indentation curve, likely corresponding to the capsule of the cells, using the Hertz model (Figure 5b). The values obtained for five cells from three independent cultures were $21.3 \pm 4.2 \text{ kPa}$ (Figure 5a). This value, 5-fold higher than that measured on the capsule of the susceptible strain, confirms the previous observation on the difference in capsular organization between the two strains. Since the capsule was still present when cells were treated with colistin, we could then fit the indentation curves obtained for treated cells also using the Hertz model (Figure 5b), and found an increase in average stiffness to $74.4 \pm 19.7 \text{ kPa}$ when cells were treated with colistin at 0.5×MIC (8 mg/L) and to $88.5 \pm 19.4 \text{ kPa}$ when cells were treated with colistin at 0.75×MIC (12 mg/L, Figure 5a). Therefore, along with the apparent loss of the capsule organization on the extend force curves (Figure 3) recorded on treated KpATCCm cells, the

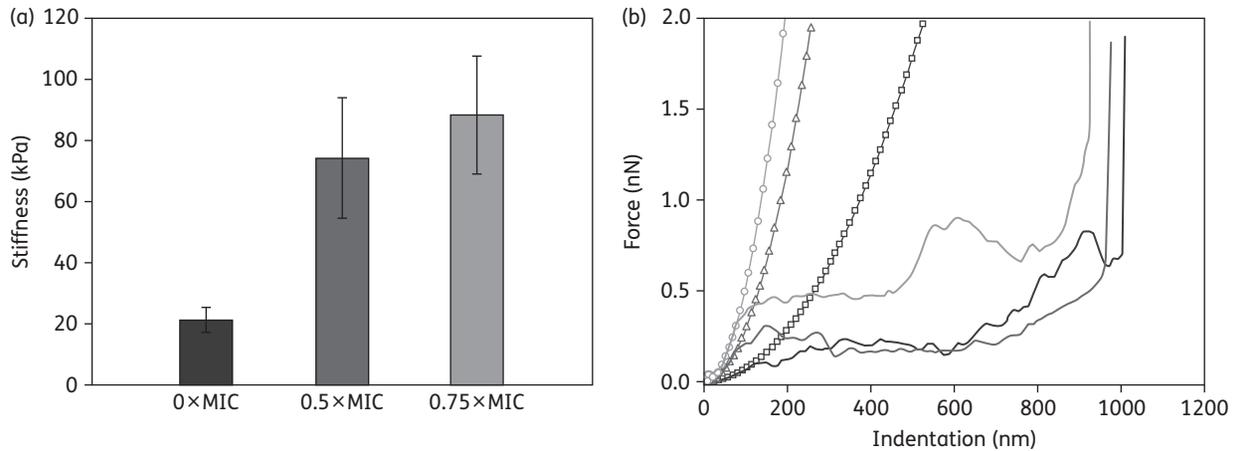


Figure 5. Nanomechanical properties of *K. pneumoniae* colistin-resistant cells. (a) Histogram presenting the stiffness values measured on cells in native conditions (dark grey bar), treated with colistin at 0.5xMIC (8 mg/L; mid-grey bar) or treated with colistin at 0.75xMIC (12 mg/L; light grey bar). In each case, values were measured on three cells from three independent cultures. (b) Representative indentation curves fitted using the Hertz model obtained from the top of a cell in native conditions (dark grey line, Hertz model, squares), treated with colistin at 0.5xMIC (8 mg/L; grey line, Hertz model, triangles) or treated with colistin at 0.75xMIC (12 mg/L; light grey line, Hertz model, circles).

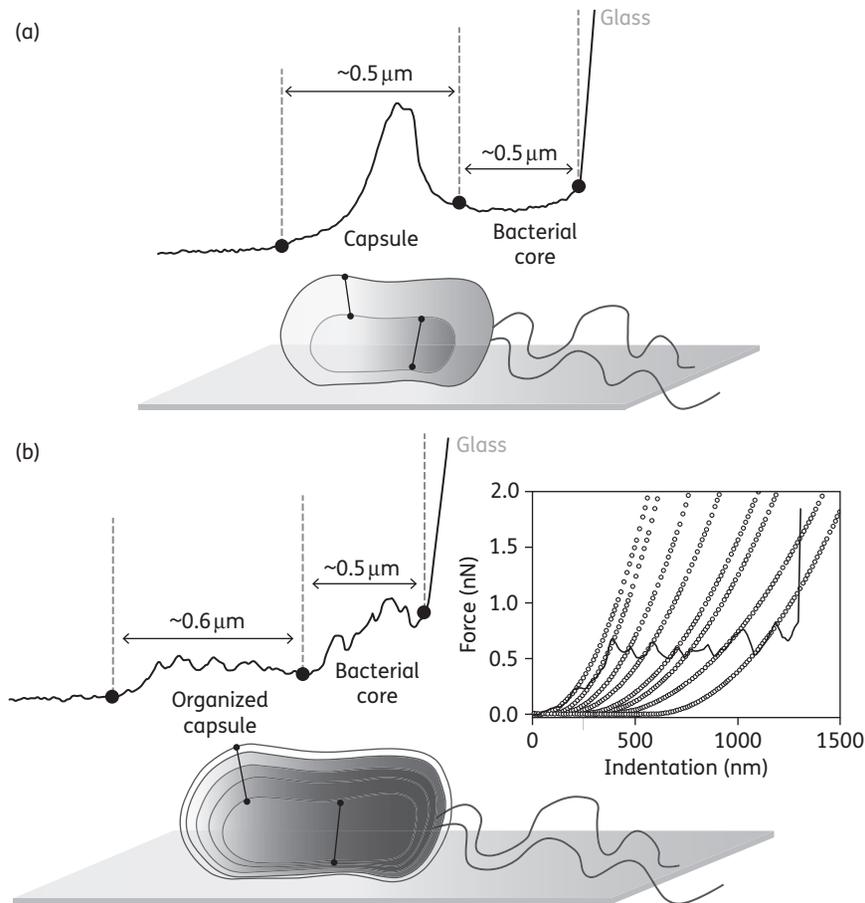


Figure 6. Schematic representation of the hypothesis formulated on capsular architecture. (a) Capsule organization of *K. pneumoniae* ATCC 700603. (b) Capsule organization of colistin-resistant *K. pneumoniae*. The graphic in (b) shows an indentation curve recorded on the top of a colistin-resistant *K. pneumoniae* cell in native conditions (grey line); spikes were fitted using the Hertz model.

nanomechanical data also show that the stiffness of the capsule of the colistin-resistant strain increases upon treatment with colistin.

Discussion

Resistance to colistin is no longer a threat; it is unfortunately a sad reality that modifies the treatment options of patients infected with Gram-negative bacteria (e.g. *Pseudomonas aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* and *Escherichia coli*) already resistant to multiple antibiotics. Although the precise mechanism of action of colistin is still the subject of much discussion, the main mechanism of resistance characterized so far involves the addition of the L-Ara4N moiety to lipid A.¹⁹ In addition, it has been demonstrated that synthesis of the L-Ara4N moiety is strongly dependent on the two-component systems PmrA/PmrB and PhoP/PhoQ.^{20,21} Many publications concerned with colistin resistance have clearly shown the pivotal role of these two-component systems in such a mechanism, and it has been demonstrated that these systems are overexpressed in *K. pneumoniae* after exposure to polymyxins.⁴⁰ More recent studies have also highlighted the impact of mutations in the *pmrA* and *pmrB* genes^{41–43} and the *phoP* and *phoQ* genes.⁴¹ As previous studies have also pointed out the possible role of genes involved in the constitutive synthesis of LPS,⁴⁴ we were also interested in the expression of three target genes: *lpxA*, *lpxC* and *msbA*. To determine which of these systems were involved in the colistin-resistant phenotype of the KpATCCm strain, we therefore decided to study the expression of the following nine genes: *lpxA*, *lpxC*, *msbA*, *pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *phoP*, *phoQ* and *arnT*. Our results demonstrated that, whatever the strain considered (i.e. colistin-susceptible KpATCC or colistin-resistant KpATCCm) the expression of these genes was never modified. We also investigated the expression of these genes under colistin pressure in order to determine the impact of colistin concentration on gene expression. Again, we did not observe any changes in gene expression in KpATCCm under colistin pressure, unlike the previous observations of Kim et al.⁴⁰ Therefore, we decided to look for another mechanism of resistance, which led us to investigate the *mgrB* gene, a recently described factor of colistin resistance. This gene in *K. pneumoniae* encodes a transmembrane protein that exerts negative feedback on the PhoP/PhoQ regulatory system.²³ It was recently discovered that the *mgrB* gene could be mutated by insertional inactivation (e.g. by an IS5-like element and other ISs) in *K. pneumoniae* after colistin exposure.^{19,23,24} Indeed, we could identify an insertion in the *mgrB* gene in KpATCCm, but not in KpATCC. The size of this insertion, which we evaluated to be ~1000 bp, corroborates the size suggested by Olaitan et al.¹⁹ Therefore, we can confidently assume that, in KpATCCm, the mutation/inactivation of *mgrB* causes the inactivation of the PhoP/PhoQ and PmrA/PmrB two-component systems, and of the *arnBCADTEF* operon, which is in accordance with previous results obtained by Lipka and Goulian.⁴⁵

This first approach led to the understanding of the genetic cause of the colistin resistance of KpATCCm. It was now of great interest to be able to make the link between these genetic data and the structure and nanomechanical properties of the capsules of the two different strains. Combining these two approaches is not common in the literature,⁴⁶ and allowed us in this study to

unravel the ‘outside’ modifications of the capsule caused by an ‘inside’ gene mutation.

As mentioned earlier, the described mechanism of action of colistin is to interact, due to its strong positive charge, with LPS molecules present on the outer membrane of Gram-negative bacteria, inducing changes in membrane permeability and therefore leading to cell death.^{15,47} However, the exact mechanism by which colistin induces bacterial death is still unknown. Some studies have shown that multiple cell targets might be involved, as polymyxin-mediated killing takes place prior to an increase in membrane permeability.^{48,49} Also, colistin has been shown to be effective against mycobacterial species, which have a cell wall based on mycolic acid instead of LPS.⁵⁰ Thus, LPS might not be the only target of colistin; phospholipids might also be a target. However, in the case of capsulated bacteria, colistin has to interact first with capsular polysaccharides before it can pass through the capsule to reach LPS on the outer membrane, and then the phospholipids of the cytoplasmic membrane. The bacteria are killed as a result of the formation of ion channels, transmembrane pores or membrane ruptures of the cytoplasmic membrane.^{48,51}

In our case, we worked on *K. pneumoniae*, a capsulated bacterial species. We compared the capsule organization of a strain susceptible to colistin with a strain resistant to colistin, KpATCCm.

Among others, Campos et al.⁵² and Llobet et al.⁵³ have also shown that capsular polysaccharides in *K. pneumoniae* are involved in polymyxin resistance, providing a protective shield against polymyxin interactions with the cell surface,⁵² or by binding colistin, thereby reducing the amount of colistin reaching the cell surface.⁵³ However, the amount of capsule polysaccharides must reach a threshold value in order to confer resistance to colistin. Other colistin resistance mechanisms have also been described, such as LPS modification, changes in the negative charge of the outer membrane, and efflux pump systems.¹¹

In this study, we observed a previously undescribed capsule phenotype that probably contributes to colistin resistance and can be linked to *mgrB* inactivation. Indeed, as can be seen in Figure 6, force curves recorded on the susceptible strain showed a spike corresponding to the contact and indentation of the AFM tip into the capsular polysaccharide. As the force applied was high, the AFM tip penetrated the capsule (0.5 μm) and then the bacterial core (0.5 μm) before reaching the PEI coating on the glass slide. Similar experiments conducted on bacteria and eukaryotic cells have shown that it is possible to derive, from the force curves obtained from such experiments, the architecture of the different compartments of the cells traversed.^{54–56} In the case of the colistin-resistant strain, the extend force curves presented a first spike followed by several condensed spikes over a distance of 0.6 μm before reaching a second spike. Figure 6(b) presents our interpretation of such force curves. The tip first touches and indents into the capsule, but soon meets another layer of polysaccharides, which is broken with a smaller force (small spike), and then another layer, and so on before reaching the bacterial cell. The bacterial core is then traversed for a distance of 0.5 μm by the AFM tip before it reaches the glass slide again. The fact that the force curves showed several ruptures after the first spike allowed us to hypothesize that the capsule is in fact multilayered. To reinforce this hypothesis, an indentation curve recorded on top of a single live cell in native conditions was analysed (graphic in Figure 6b). Every spike observed on this indentation curve was fitted using the Hertz model (open circles). For every fit,

approximately the same stiffness value was extracted (20 kPa), letting us postulate that each small spike corresponds to the rupture of a layer of polysaccharide. Since KpATCCm is resistant to colistin (MIC=16 mg/L) compared with *K. pneumoniae* ATCC 700603 (MIC=0.5 mg/L), this multilayered structure of the capsule could be a key factor in colistin resistance in KpATCCm. However, colistin still interacts with the capsular polysaccharides of the KpATCCm strain. Indeed, studies have shown that capsular polysaccharides can differ in chemical composition. Being positively charged, colistin binds to anionic capsules, but not to cationic or uncharged ones.⁵³ In our case, the nanomechanical data indicate that the capsule of KpATCCm becomes harder (stiffness increases) with increasing concentration of colistin and its organization as several superposed layers is lost. Therefore, colistin has an effect on the nanomechanical properties of the capsule, leading us to think that colistin still interacts with the capsule, but, because of its organization, cannot penetrate it to reach the cytoplasmic membrane of the bacterium.

To conclude, this study describes for the first time, as far as we know, imaging of the capsule of living cells of *K. pneumoniae* by AFM. It also allowed us to show that colistin was able to remove the capsule of a colistin-susceptible strain, but not that of a colistin-resistant strain. Results of force spectroscopy experiments led us to hypothesize a model of colistin resistance based on the nanoarchitecture of the capsule. The colistin-resistant strain presents a well-organized multilayered capsule that may interact with colistin. These results, combined with the genetic data obtained in the first part of the study, showed that inactivation of the *mgrB* gene had direct consequences on the organization of the capsule of the colistin-resistant strain. Our hypothesis for future studies is that the multilayered capsule does not let colistin penetrate to the cell wall to reach its targets. Additional AFM experiments and genetic studies on clinical isolates of colistin-susceptible and -resistant *K. pneumoniae* are needed to further investigate the morphology of the capsule, the impact of colistin exposure on these isolates and, ultimately, the mechanisms of colistin resistance during therapy.

Acknowledgements

E. D. is a researcher of the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). We thank Marion Grare for performing antibiograms on the two strains used, and Mark D. Adams (Craig Venter Institute, La Jolla, CA, USA) and Jean-Marc Rolain (URMITE CNRS IRD UMR 6236, Marseille, France) for helpful discussions.

Funding

This work has been supported by a grant from 'Young Scientist Program' of ANR (Agence Nationale de la Recherche), project ANR-11-JSV5-001-01, n° (SD) 30 02 43 31. C. F. is supported by a grant from 'Direction Générale de l'Armement' (DGA) for her 3 year PhD study.

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Table S1 and Figure S1 are available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

References

- Keynan Y, Rubinstein E. The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. *Int J Antimicrob Agents* 2007; **30**: 385–9.
- Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 1998; **11**: 589–603.
- Gupta A, Ampofo K, Rubenstein D *et al.* Extended spectrum β lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a review of the literature. *J Perinatol* 2003; **23**: 439–43.
- Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of Gram-negative pathogens. *Korean J Intern Med* 2012; **27**: 128–42.
- Jacoby GA, Sutton L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; **35**: 164–9.
- Perez F, Endimiani A, Hujer KM *et al.* The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol* 2007; **7**: 459–69.
- Rasheed JK, Anderson GJ, Yigit H *et al.* Characterization of the extended-spectrum β -lactamase reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 2382–8.
- Pasteran F, Veliz O, Rapoport M *et al.* Sensitive and specific modified Hodge test for KPC and metallo- β -lactamase detection in *Pseudomonas aeruginosa* by use of a novel indicator strain, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 4301–3.
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 969–76.
- Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA *et al.* Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 2013; **13**: 785–96.
- Ah Y-M, Kim A-J, Lee J-Y. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents* 2014; **44**: 8–15.
- Vaara M. Novel derivatives of polymyxins. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 1213–9.
- Koch-Weser J, Sidel VW, Federman EB *et al.* Adverse effects of sodium colistimethate. Manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. *Ann Intern Med* 1970; **72**: 857–68.
- Nation RL, Li J. Colistin in the 21st century. *Curr Opin Infect Dis* 2009; **22**: 535–43.
- Yahav D, Farbman L, Leibovici L, Paul M. Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clin Microbiol Infect* 2012; **18**: 18–29.
- Velkov T, Thompson PE, Nation RL *et al.* Structure–activity relationships of polymyxin antibiotics. *J Med Chem* 2010; **53**: 1898–916.
- Zhang L, Dhillon P, Yan H *et al.* Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 3317–21.
- Velkov T, Roberts KD, Nation RL *et al.* Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. *Future Microbiol* 2013; **8**: 711–24.
- Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Antimicrob Resist Chemother* 2014; **5**: 643.
- Raetz CRH, Whitfield C. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem* 2002; **71**: 635–700.
- Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaiou DK. Resistance to polymyxins: mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist Updat* 2010; **13**: 132–8.
- Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; **67**: 593–656.

- 23 Cannatelli A, D'Andrea MM, Giani T et al. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 5521–6.
- 24 Poirel L, Jayol A, Bontron S et al. The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2015; **70**: 75–80.
- 25 Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett* 1986; **56**: 930–4.
- 26 Müller DJ, Dufrière YF. Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface. *Trends Cell Biol* 2011; **21**: 461–9.
- 27 Formosa C, Grare M, Duval RE et al. Nanoscale effects of antibiotics on *P. aeruginosa*. *Nanomedicine* 2012; **8**: 12–6.
- 28 Formosa C, Grare M, Jauvert E et al. Nanoscale analysis of the effects of antibiotics and CX1 on a *Pseudomonas aeruginosa* multidrug-resistant strain. *Sci Rep* 2012; **2**: 575.
- 29 Formosa C, Schiavone M, Martin-Yken H et al. Nanoscale effects of caspofungin against two yeast species, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 3498–506.
- 30 El-Kirat-Chatel S, Beaussart A, Alsteens D et al. Nanoscale analysis of caspofungin-induced cell surface remodelling in *Candida albicans*. *Nanoscale* 2013; **5**: 1105–15.
- 31 Soon RL, Nation RL, Harper M et al. Effect of colistin exposure and growth phase on the surface properties of live *Acinetobacter baumannii* cells examined by atomic force microscopy. *Int J Antimicrob Agents* 2011; **38**: 493–501.
- 32 Soon RL, Nation RL, Hartley PG et al. Atomic force microscopy investigation of the morphology and topography of colistin-heteroresistant *Acinetobacter baumannii* strains as a function of growth phase and in response to colistin treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 4979–86.
- 33 Mortensen NP, Fowlkes JD, Sullivan CJ et al. Effects of colistin on surface ultrastructure and nanomechanics of *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Langmuir* 2009; **25**: 3728–33.
- 34 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically—Eighth Edition: Approved Standard M07-A8*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2009.
- 35 Francius G, Tesson B, Dague E et al. Nanostructure and nanomechanics of live *Phaeodactylum tricornutum* morphotypes. *Environ Microbiol* 2008; **10**: 1344–56.
- 36 Hutter JL, Bechhoefer J. Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev Sci Instrum* 1993; **64**: 1868–73.
- 37 Hertz H. Ueber die Berührung fester elastischer Körper. *J Reine Angew Math* 1881; **92**: 156–71.
- 38 Arnoldi M, Fritz M, Bäuerlein E et al. Bacterial turgor pressure can be measured by atomic force microscopy. *Phys Rev E* 2000; **62**: 1034–44.
- 39 Chopinet L, Formosa C, Rols MP et al. Imaging living cells surface and quantifying its properties at high resolution using AFM in QI™ mode. *Micron* 2013; **48**: 26–33.
- 40 Kim SY, Choi HJ, Ko KS. Differential expression of two-component systems, pmrAB and phoPQ, with different growth phases of *Klebsiella pneumoniae* in the presence or absence of colistin. *Curr Microbiol* 2014; **69**: 37–41.
- 41 Olaitan AO, Diene SM, Kempf M et al. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: an epidemiological and molecular study. *Int J Antimicrob Agents* 2014; **44**: 500–7.
- 42 Cannatelli A, Pilato VD, Giani T et al. In vivo evolution to colistin resistance by PmrB sensor kinase mutation in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* is associated with low-dosage colistin treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 4399–403.
- 43 Jayol A, Poirel L, Brink A et al. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; **58**: 4762–6.
- 44 Raetz CRH, Reynolds CM, Trent MS et al. Lipid A modification systems in Gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem* 2007; **76**: 295–329.
- 45 Lippa AM, Goulian M. Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. *PLoS Genet* 2009; **5**: e1000788.
- 46 Schiavone M, Sieczkowski N, Castex M et al. Effects of the strain background and autolysis process on the composition and biophysical properties of the cell wall from two different industrial yeasts. *FEMS Yeast Res* 2015; **15**: 1–11.
- 47 Bergen PJ, Landersdorfer CB, Zhang J et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 'old' polymyxins: what is new? *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; **74**: 213–23.
- 48 Mogi T, Kita K. Gramicidin S and polymyxins: the revival of cationic cyclic peptide antibiotics. *Cell Mol Life Sci* 2009; **66**: 3821–6.
- 49 Hale JD, Hancock RE. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007; **5**: 951–9.
- 50 David HL, Rastogi N. Antibacterial action of colistin (polymyxin E) against *Mycobacterium aurum*. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; **27**: 701–7.
- 51 Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 2005; **3**: 238–50.
- 52 Campos MA, Vargas MA, Regueiro V et al. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* 2004; **72**: 7107–14.
- 53 Llobet E, Tomás JM, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology* 2008; **154**: 3877–86.
- 54 Liu H, Wen J, Xiao Y et al. In situ mechanical characterization of the cell nucleus by atomic force microscopy. *ACS Nano* 2014; **8**: 3821–8.
- 55 Obataya I, Nakamura C, Han S et al. Nanoscale operation of a living cell using an atomic force microscope with a nanoneedle. *Nano Lett* 2005; **5**: 27–30.
- 56 Suo Z, Avcı R, Deliorman M et al. Bacteria survive multiple puncturings of their cell walls. *Langmuir ACS J Surf Colloids* 2009; **25**: 4588–94.

Résistance à la colistine chez *Klebsiella pneumoniae*... Sommes-nous capables de détecter rapidement l'émergence de mutants résistants au sein d'une population bactérienne ?

Contexte

Une des recommandations du rapport O'Neill pour lutter (plus efficacement) contre la résistance aux anti-infectieux résiderait dans le développement de nouveaux outils diagnostiques, sous-entendu des outils plus performants que ceux dont nous disposons actuellement (O'Neill 2016).

Un des problèmes fréquemment rencontrés en antibiothérapie est la sélection de mutants résistants au cours d'un traitement chez un patient. Cette sélection peut s'expliquer par un défaut dans la dose efficace d'antibiotique à apporter au patient. En effet, pour qu'un traitement antibiotique soit efficace il est vital de respecter la posologie (dose, durée) propre à chaque antibiotique. Le non-respect de cette règle d'or (arrêt intempestif du traitement, non-respect du nombre de prise...) amène à une diminution de la concentration efficace nécessaire à l'élimination de la souche bactérienne pathogène et de consort à une possible apparition de mutants résistants (Figure 32).

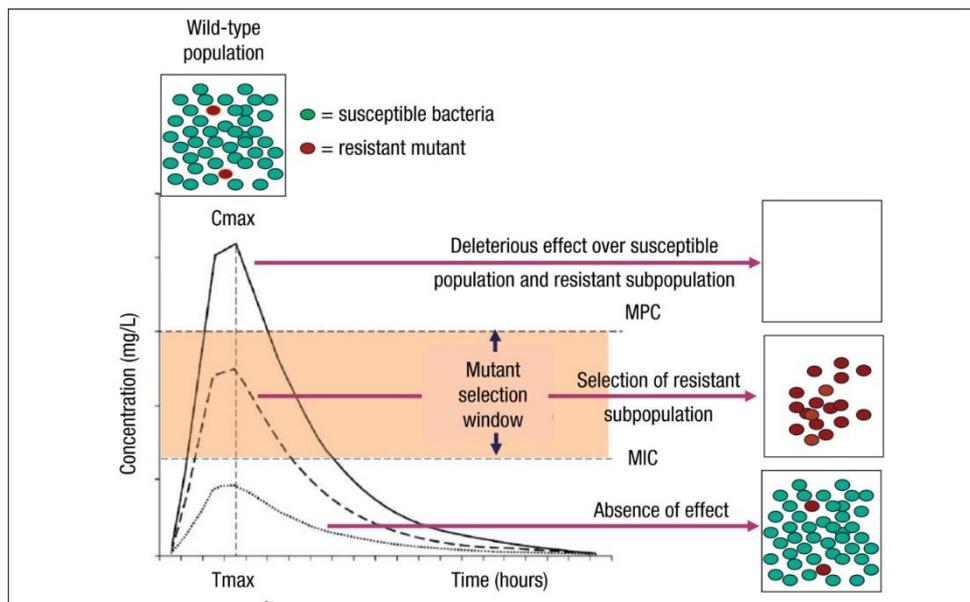


Figure 32 : Relation entre la concentration en antibiotique et la sélection de bactéries résistantes au sein d'une population. (Canton et al., 2013).

Cette problématique est d'autant plus vraie dans le cas de la colistine. En effet, la colistine est un antibiotique réputé pour être difficile à doser, et pour lequel il est difficile d'atteindre et de maintenir une concentration (critique) efficace (C_{max}).

Au final, l'émergence de cette sous-population résistante (même extrêmement minoritaire au départ), l'apparition de cette population « hétérogène », va conduire au fur et à mesure de la durée du traitement, à sa sélection, sa multiplication au sein de la population bactérienne ; pour devenir majoritaire, voire même unique (Figure 32).

La conséquence pour un patient est alors dramatique : si cette sous population bactérienne résistante devient majoritaire, alors le traitement mis en place devient inefficace. Il faut alors augmenter les doses d'antibiotiques (si cela est encore possible) ou, plus sûrement changer de traitement antibiotique, ce qui à moyen terme n'est pas du tout une bonne solution. En effet, si nous changeons « trop facilement » un traitement antibiotique, et que cela devienne une habitude, alors la pression de sélection vis-à-vis de ce nouvel antibiotique augmentera ; et de façon inéluctable des bactéries résistantes à ce nouvel antibiotique apparaîtront... Et la vitesse d'apparition de mécanismes de résistance à cet antibiotique sera proportionnelle à l'intensité de la pression de sélection qui sera exercée sur ce même antibiotique... Plus un antibiotique est utilisé, plus la résistance à cet antibiotique émergera rapidement... C'est un cercle vicieux...

Par contre, une des solutions serait de pouvoir rapidement détecter l'émergence de cette sous population de bactéries résistantes et par conséquent, de pouvoir tout aussi rapidement ajuster la concentration en antibiotique (C_{max}) afin qu'elle reste efficace ; et dans le cas de la colistine, tue les bactéries. Pour détecter cette hétérogénéité de population, la technique classiquement utilisée en Bactériologie est l'analyse de populations, une technique longue et fastidieuse (Vidaillac et al., 2012).

De nombreux travaux ont démontré que l'électrophorèse capillaire était un outil prometteur capable de séparer, d'identifier voire même de quantifier les bactéries. La séparation des bactéries par électrophorèse capillaire est basée sur la propension des cellules bactériennes à se comporter comme des particules colloïdales chargées négativement du fait de leur taille et de leur charge de surface négative (grâce ou à cause du LPS, en ce qui concerne les BGN). Le mécanisme exact de séparation des bactéries demeure toujours à l'étude, et semble dépendre de la méthode utilisée. Cependant, il est acté que le devenir/comportement des bactéries au sein du capillaire est étroitement lié à leurs propriétés de surface, comme le potentiel zêta.

Comme nous l'avons vu précédemment, le mécanisme de résistance à la colistine est principalement lié à la modification d'expression de gènes qui vont avoir pour conséquence la modification du LPS, par addition des groupements L-Ara4N et/ou PEtN. Au final, ces changements se traduisent par une modification de la charge de surface des bactéries, comme cela a été décrit chez les Entérobactéries. Par conséquent, si nous considérons cette modification de charge comme un élément critique pour détecter la survenue de bactéries résistantes à la colistine ; l'électrophorèse capillaire devrait nous permettre de différencier (rapidement) des souches « colistine-résistante » de leurs souches parentes « colistine-sensible ».

Objectifs

Nous avons donc souhaité tester l'efficacité et la sensibilité de l'électrophorèse capillaire pour la détection de population(s) bactérienne(s) hétérogène(s) (i.e. résistante(s) à la colistine) chez *Klebsiella pneumoniae*.

Méthodes

Nous avons, dans un premier temps, développé et validé une méthode qui nous a permis de séparer et d'identifier spécifiquement les 3 espèces de BGN les plus fréquemment retrouvées en pathologie humaine : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae* (RAISIN, 2012).

Puis dans un deuxième temps, à l'aide de la même méthode, nous avons voulu étudier/séparer des souches sensibles de souches résistantes à la colistine, issues de la même espèce : *K. pneumoniae*.

Résultats

En cultivant l'isolat clinique KP1 de *K. pneumoniae* avec des concentrations sub-inhibitrices de colistine, nous avons sélectionné la souche résistante KP1m comme décrit précédemment (Vidaillac et al., 2012). En effet, nous avons démontré la présence dans des cultures de KP1m, de plusieurs sous populations de résistance hétérogène à la colistine (Vidaillac et al., 2012).

En utilisant l'électrophorèse capillaire, nous avons réalisé une analyse comparative des souches KP1 et KP1m (Figure 33). Les électrophorégrammes obtenus pour KP1 montrent un seul pic, tandis que nous avons détectés deux pics bien séparés pour KP1m.

En nous appuyant sur les résultats obtenus par Vidaillac et coll., le premier pic observé pour la souche KP1m pourrait correspondre à une sous-population de *K. pneumoniae* sensible à la

colistine, par comparaison aux profils électrophorétiques obtenus pour KP1 ; tandis que le second pic correspondrait à une sous-population résistante à la colistine (Figure 33).

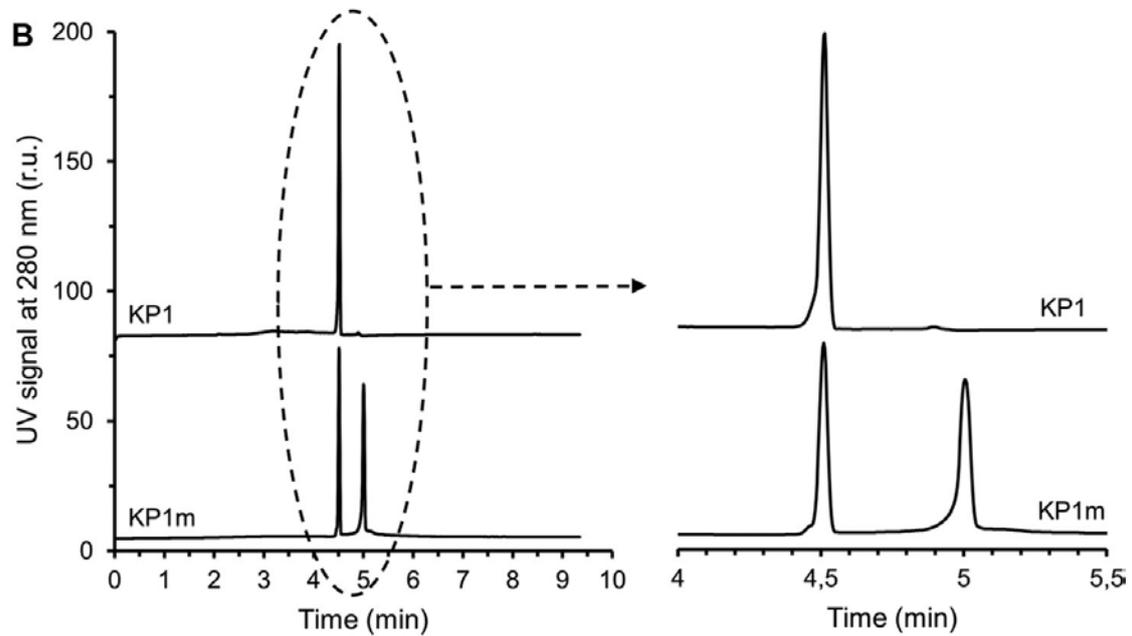


Figure 33 : Profils électrophorétiques de souches de *K. pneumoniae* sensible ou résistante à la colistine.

Electrophorégrammes obtenus pour une souche *K. pneumoniae* « colistine-sensible » (KP1) et son mutant « colistine-résistant » dérivé (KP1m). Nous pouvons observer l'apparition d'un deuxième pic caractéristique dans le cas de la souche résistante à la colistine (Sautrey et al., 2015).

Discussion/Conclusion

Nous avons démontré que l'électrophorèse capillaire était un outil diagnostique capable de détecter en quelques minutes, la co-existence de différentes sous populations bactériennes au sein d'une population de *K. pneumoniae*.

Publication n°3

Sautrey G., Duval R.E., Chevalley A., Fontanay S., Clarot I.

Capillary electrophoresis for fast detection of heterogeneous population in colistin-resistant
Gram-negative bacteria.

Electrophoresis (2015) 36, 2630-2633.

Guillaume Sautrey^{1,2}
 Raphaël E. Duval^{1,2,3}
 Alicia Chevalley^{1,2}
 Stéphane Fontanay^{1,2,3}
 Igor Clarot^{1,2}

¹CNRS, SRSMC, UMR 7565,
 Vandœuvre-lès-Nancy, France

²Faculté des Sciences et
 Technologies, Université de
 Lorraine, SRSMC, UMR 7565,
 Vandœuvre-lès-Nancy, France

³ABC Platform, Nancy, France

Received February 4, 2015

Revised June 10, 2015

Accepted June 16, 2015

Short Communication

Capillary electrophoresis for fast detection of heterogeneous population in colistin-resistant Gram-negative bacteria

It has been shown that diverse strains of bacteria can be separated according to their characteristic surface properties by means of CE. We employed here this analytical technique to the study of colistin-resistance in Gram-negative bacteria, which involves the selection of mutants with modified outer membrane composition resulting in changes of surface cell properties. In the same way as with molecular entities, we performed firstly the validation of an ITP-based CE method for three common pathogenic Gram-negative bacteria namely *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*. Secondly, we compared the electrophoretic profiles of bacterial samples from a colistin-susceptible clinical isolate of *K. pneumoniae* and from the corresponding colistin-resistant derivative. By a simple CE run taking a few minutes, the coexistence of several bacterial subpopulations in the colistin-resistant derivative was clearly evidenced. This work encourages further research that would allow applications of CE in clinical laboratory for a daily monitoring of bacterial population in cared patients when “last-chance” colistin treatment is initiated against multidrug-resistant bacteria.

Keywords:

CE / Colistin-resistance / Gram-negative bacteria / Isotachopheresis / Method validation
 DOI 10.1002/elps.201500064

The “old” colistin known a renewed interest in therapeutic and becomes the last resort antibiotic to fight multidrug-resistant Gram-negative bacteria, notably *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, and *Klebsiella pneumoniae* [1]. This polycationic amphiphile acts by disruption of the bacterial membrane initiated through interactions with negatively charged lipopolysaccharides (LPS) abundantly present at the outer membrane at the surface of these bacteria [2]. Unfortunately, the therapeutic dosage in colistin is delicate due to significant nephro- and neuro-toxicities, and suboptimal doses promote the selection of colistin-resistant mutants [3]. This, in addition of existing resistances to usual antibiotics, can lead to a therapeutic dead end. In order to optimize efficiently the chemotherapy, the possible emergence of colistin-resistant strains must be therefore rapidly evidenced especially as colistin-resistance seems be favorable to some antimicrobial combinations [4]. But, the time required for isolation and characterization of pathogens by classical procedures is too long to address this need [4, 5].

It has been shown that CE is a promising tool for separation, identification and quantification of living bacteria [6, 7]. Potential clinical applications have been proven in the fields of diagnosis [8–11], sterility testing [12–14], or antibiotic activity [15, 16]. Since the pioneering works of Ebersole and McCormick [17], Armstrong et al. reported the first example of molecule-like bacteria analysis by CE with high speed, efficiency, and reproducibility [18]. They have used dissolved poly(ethylene oxide) in the BGE or isoelectric focusing in order to emphasize the differential in mobility of bacteria and to control cells aggregation and capillary wall adsorption. Peer groups have proposed other methods involving also BGE-additives and focusing techniques as well as capillary wall coating and monolith-filled capillary [19–24]. The last advance in the method development has been recently provided by Oukacine et al., reporting a very simple and fast isotachopheretic methodology of bacteria analysis in a bare capillary without BGE-additives [25].

The separation of bacteria in CE is based on the propensity of bacterial cells to behave as negatively charged colloidal particles due to their micrometric scale and characteristic surface components such as LPS in Gram-negative bacteria [6, 7]. The exact mechanism of bacteria separation remain under investigation and depend to the method employed [26–30]. However, it is assumed that the behavior of bacterial cells in the capillary is linked to their surface properties like zeta potential [30]. The colistin-resistance results mainly from the mutation of genes encoding specific protein systems involved in the production of LPS [31]. The consequences are changes

Correspondence: Dr. Igor Clarot, SRSMC, UMR 7565, Faculté des Sciences et Technologies BP70239, CNRS-Université de Lorraine, Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, 54506, France
E-mail: igor.clarot@univ-lorraine.fr

Abbreviations: CFU, colony forming unit; LBE, leading-background electrolyte; LPS, lipopolysaccharide; TBE, terminating-background electrolyte

Table 1. Sensitivity and statistical *F*-test on linearity of the method for *K. pneumoniae* (KP), *P. aeruginosa* (PA), and *E. coli* (EC)

Bacteria	Slope (A) ± SD (mL/CFU.min)	Intercept (B) ± SD (r.u.)	R ²	F regression	F lack of fit	LOD/LOQ (CFU/mL)
KP	$5.92 \times 10^{-4} \pm 1.67 \times 10^{-5}$	-2128 ± 860	0.998	1324	1.25	$4.8/14.4 \times 10^6$
PA	$2.73 \times 10^{-4} \pm 1.21 \times 10^{-5}$	-2499 ± 792	0.998	548	1.50	$9.6/28.7 \times 10^6$
EC	$1.59 \times 10^{-4} \pm 4.80 \times 10^{-6}$	-191 ± 248	0.998	1315	1.92	$5.1/15.4 \times 10^6$
				F value	F value	
				0.05	0.05	
Theoretical value				4.67	3.71	

Table 2. Evaluation of accuracy and precision of the method for *K. pneumoniae* (KP), *P. aeruginosa* (PA), and *E. coli* (EC)

Bacteria	Real concentration (CFU/mL)	Calculated concentration (CFU/mL)	Accuracy (%)	RSD run-to-run (%)	RSD day-to-day (%)
KP	10.00×10^7	$9.88 \pm 0.78 \times 10^7$	98.86	8.20	n.d.
	5.00×10^7	$5.30 \pm 0.15 \times 10^7$	94.01	3.10	7.24
	1.00×10^7	$1.09 \pm 0.03 \times 10^7$	90.04	4.33	n.d.
PA	10.00×10^7	$10.09 \pm 0.73 \times 10^7$	99.09	7.92	n.d.
	5.00×10^7	$4.76 \pm 0.86 \times 10^7$	95.17	2.23	6.06
	2.00×10^7	$2.15 \pm 0.02 \times 10^7$	92.46	1.39	n.d.
EC	10.00×10^7	$10.18 \pm 0.79 \times 10^7$	98.20	7.88	n.d.
	5.00×10^7	$4.57 \pm 0.11 \times 10^7$	91.45	2.37	7.23
	1.00×10^7	$1.08 \pm 0.03 \times 10^7$	92.30	3.15	n.d.

in membrane composition [31, 32] that modify the surface properties of bacterial cells as shown in *K. pneumoniae* [33]. Colistin-susceptible strains and their colistin-resistant derivative should be therefore differentiated in CE. As far as we know, this hypothesis has never been explored. We performed firstly the validation of the last-born method of Oukacine et al. for three common pathogenic Gram-negative bacteria namely *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *K. pneumoniae*. Secondly, the colistin-resistant derivative of a clinical isolate of *K. pneumoniae* was selected in vitro by exposure to colistin. Electrophoregrams were collected from cultures of colistin-susceptible and -resistant derivative in order to examine the impact of colistin-resistance on the electrophoretic profiles of bacteria.

Boric acid ≥99.5% was obtained from Carlo Erba (Val de Reuil, France). Other reagents and colistin sulfate (Ref C4461-1G) were from Sigma Aldrich (Saint Louis, USA). Ultrapure water was obtained in a Purelab Ultra MKII system from Elga (Le Plessis Robinson, France).

E. coli ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603, and *P. aeruginosa* ATCC 27853 were from Fisher Scientific (SAS, Illkirch, France). The clinical isolate of *K. pneumoniae* (KP1) and its colistin-resistant derivative (KP1m) were from the ABC Platform® Bugs Bank Collection (ABC Platform®, Université de Lorraine, Nancy, France). The strain KP1m was obtained by in vitro selection and all bacteria were cultivated and quantified as described elsewhere [4].

CE experiments were performed on a Beckman P/ACE 5500 model (Beckman, Fullerton, USA) equipped with a UV detector ($\lambda = 280$ nm). Capillary temperature was controlled by coolant at 25.0°C. A fused-silica capillary (Polymicro Technologies, Caudebec les Elboeuf, France) 75 μ m id with a total length of 37 cm (effective length 30 cm) was employed. All solutions were filtrated before use with an Alltech

(Tampleuve, France) regenerated cellulose filter (0.45 μ m pore size). Leading- and terminating-background electrolytes (LBE and TBE, respectively) were prepared as described by Oukacine et al. [25]. The LBE was composed of 4.5 mM Tris + 50 mM boric acid + 3.31 mM HCl while the TBE was composed of 4.5 mM Tris + 50 mM boric acid. Bacteria were isolated from overnight culture (10^8 – 10^9 colony forming unit (CFU)/mL) by centrifugation (4000 g, 5 min) and washed twice with LBE. Appropriate dilutions in LBE given calibration solutions. The samples were injected in the hydrodynamic forward mode (10 s under pressure 0.5 psi), and the voltage applied was 10 kV (normal polarity). Before each injection, the capillary was successively rinsed with 0.1 M sodium hydroxide (2 min), ultrapure water (2 min), and LBE (2 min).

The electrophoretic method was validated for *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *K. pneumoniae* in term of specificity, linearity, and sensitivity (LOD and LOQ), as well as accuracy and precision (repeatability [run-to-run] and intermediate precision [day-to-day]) [34]. All injections were performed in triplicate.

A blank analysis injecting LBE was performed to check the specificity of the method (Fig. 1A). A weak interference peak was observed at similar migration time for both *Enterobacteriaceae*: *E. coli* and *K. pneumoniae*. No interferences were noticed in the case of *P. aeruginosa*.

The linearity study was made by preparing five calibration samples in triplicate ($n = 15$) from 1.00 to 10.00×10^7 CFU/mL. The validity of linear models (corrected area = $A[\text{cells}] + B$) was assessed using classical *F*-test ($n = 3$ per point, $\alpha = 5\%$). Results were summarized in Table 1 and indicate good linearity whatever the bacteria under study ($R^2 = 0.998$). Interestingly, the slope of calibration curves (A) was strain dependent. Due to the interferences observed

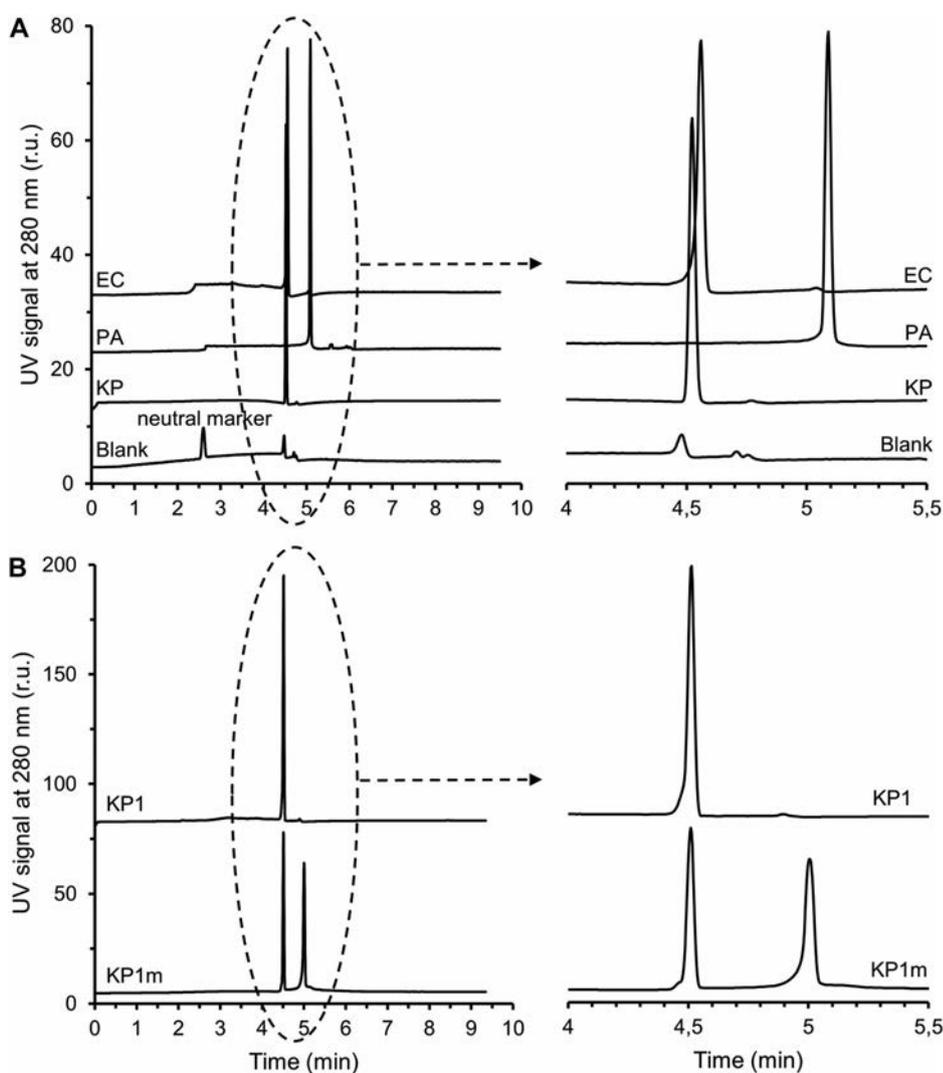


Figure 1. Analysis by CE of bacterial suspensions in LBE using an isotachophoretic-based method. (A) Typical electrophoregrams obtained for LBE supplemented with benzyl alcohol 0.1% v/v as neutral marker at $t_m = 2.56$ min (blank) and for samples prepared from cultures of *K. pneumoniae* (KP), *P. aeruginosa* (PA), *E. coli* (EC). (B) Typical electrophoregrams obtained for a clinical isolate of *K. pneumoniae* (KP1) and for its colistin-resistant derivative (KP1m). Conditions: fused-silica capillary 75 μ m id, 37 cm total length (30 cm effective length), cooled at 25°C. LBE (anode): Tris 4.5 mM + boric acid 50 mM + HCl 3.31 mM. TBE (cathode): Tris 4.5 mM + boric acid 50 mM. Injection 10 s, 0.5 psi. $V = +10$ kV. Detection at 280 nm.

for *E. coli* and *K. pneumoniae*, the calculation of LOD and LOQ given in Table 1 for sensitivity evaluation was based on the SD of the response (SD on B) and A [34].

The precision of the method was expressed as the RSD on (i) the run-to-run variation ($n = 3$) with bacterial samples at 1.00, 5.00, and 10.00 $\times 10^7$ CFU/mL during one day, (ii) the day-to-day variation for three consecutive days (three injections per day of freshly prepared samples, $n = 9$) with bacterial samples at 5.00 $\times 10^7$ CFU/mL. In Table 2, it can be noticed a good precision of the method, notably at bacterial concentration lower than 10 $\times 10^7$ CFU/mL (RSD <5%). The accuracy of the method (recovery of real and calculated concentrations from calibration curve) was tested with bacterial samples at 1.00, 5.00, and 10.00 $\times 10^7$ CFU/mL. As shown in Table 2, the accuracy was excellent with samples at 10 $\times 10^7$ CFU/mL (>98%) and remained satisfactory for lower concentrations (>90%).

Using subinhibitory concentrations of colistin in cultures of a clinical isolate of *K. pneumoniae* (KP1), the colistin-

resistant derivative KP1m was selected as described previously [4]. Vidailiac et al. demonstrated the presence in KP1m cultures of several subpopulations heterogeneously resistant to colistin. Hence, using the validated CE method, we performed a comparative analysis of KP1 and KP1m samples (Fig. 1B). The electrophoregrams obtained with KP1 showed a single peak while two well-separate peaks were detected with KP1m. According to the study of Vidailiac et al., the first peak observed here in CE analysis of KP1m could be attributed to a colistin-susceptible population of *K. pneumoniae* by comparison with the electrophoregrams obtained for KP1, and the second one to a colistin-resistant mutant. The colistin-resistance in these bacterial species can result in modification of the outer membrane composition at the surface of the bacteria, notably at the LPS and capsule polysaccharide level [31, 32]. These modifications are responsible of important changes in physicochemical surface characteristics like zeta potential [33], affecting bacterial cells behavior during electrophoretic process [30], which may explain the suggested

separation of subpopulations in KP1m samples. Of course, we are aware that each peak observed with KP1m is not necessarily pure and representative of two distinct subpopulations [35]. However, the formation of two narrow sample zones during CE of KP1m reflects clearly the heterogeneity of population in the bacterial sample.

In conclusion, we showed here that the coexistence of several subpopulations in a colistin-resistant derivative of *K. pneumoniae* can be evidenced in a few minutes using a validated CE method. Further investigations on this emergence of heterogeneous population will be done with other Gram-negative bacterial strains. Moreover, the isolation and characterization (e.g. antibiogram testing) of each bacterial peak detected could be informative on the colistin-resistance mechanisms in Gram-negative bacteria, and should allow finally to distinguish colistin-resistant strains (or subpopulations) from susceptible ones. We expect hence to extend the application scope of CE in the daily monitoring of bacterial population in colistin-treated patients. More generally, this work supports that CE could be used in studies of the impact of environmental stress in bacteria as well as other phenomena affecting or involving the surface chemistry of bacteria.

Financial support was provided by the French Ministry of Higher Education (MRES), the French National Scientific Center (CNRS) and Region Lorraine.

The authors have declared no conflict of interest.

References

- [1] Bergen, P. J., Landersdorfer, C. B., Lee, H. J., Li, J., Nation, R. L., *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2012, 25, 626–633.
- [2] Velkov, T., Roberts, K. D., Nation, R. L., Thompson, P. E., Li, J., *Future Microbiol.* 2013, 8, 711–724.
- [3] Lim, L. M., Ly, N., Anderson, D., Yang, J. C., Macander, L., Jarkowski III, A., Forrest, A., Bulitta, J. B., Tsuji, B. T., *Pharmacotherapy* 2010, 30, 1279–1291.
- [4] Vidailiac, C., Benichou, L., Duval, R. E., *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012, 56, 4856–4861.
- [5] Stinson, S. C., *Chem. Eng. News* 1999, 77, 36–38.
- [6] Kłodzińska, E., Buszewski, B., *Anal. Chem.* 2009, 81, 8–15.
- [7] Subirats, X., Blaas, D., Kenndler, E., *Electrophoresis* 2011, 32, 1579–1590.
- [8] Jackowski, M., Szeliga, J., Kłodzińska, E., Buszewski, B., *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 391, 2153–2160.
- [9] Szeliga, J., Jackowski, M., Kłodzińska, E., Buszewski, B., Kupczyk, W., *BMC Res. Notes* 2011, 4, 467–479.
- [10] Kłodzińska, E., Kubczyk, W., Jackowski, M., Buszewski, B., *Electrophoresis* 2013, 34, 3206–3213.
- [11] Song, L., Li, W., Li, G., Wei, D., Ge, P., Li, G., Zheng, F., Sun, X., *J. Chromatogr. B* 2013, 935, 32–35.
- [12] Bao, Y., Lantz, A. W., Armstrong, D. W., *Pharmacoepial Forum* 2010, 36, 1798–1805.
- [13] Lantz, A. W., Bao, Y., Armstrong, D. W., *Anal. Chem.* 2007, 79, 1720–1724.
- [14] Yu, L., Li, S. F., *J. Chromatogr. A* 2007, 1161, 308–313.
- [15] Kłodzińska, E., Jaworski, M., Kubczyk, W., Jackowski, M., Buszewski, B., *Electrophoresis* 2012, 33, 3095–3100.
- [16] Oukacine, F., Romestand, B., Goodall, D. M., Massiera, G., Garrelly, L., Cottet, H., *Anal. Chem.* 2012, 84, 3302–3310.
- [17] Ebersole, R. C., McCormick, R. M., *Nat. Biotechnol.* 1993, 11, 1278–1282.
- [18] Armstrong, D. W., Schulte, G., Schneiderheinze, J. M., Westenberg, D. J., *Anal. Chem.* 1999, 71, 5465–5469.
- [19] Buszewski, B., Szumski, M., Kłodzińska, E., Dahm, H., *J. Sep. Sci.* 2003, 26, 1045–1049.
- [20] Kourkine, I. V., Ristic-Petrovic, M., Davis, E., Ruffulo, C. G., Kapsalis, A., Barron, A. E., *Electrophoresis* 2003, 24, 655–661.
- [21] Buszewski, B., Kłodzińska, E., *Electrophoresis* 2008, 29, 4177–4184.
- [22] Bao, Y., Lantz, A. W., Crank, J. A., Huang, J., Armstrong, D. W., *Electrophoresis* 2008, 29, 2587–2592.
- [23] Tong, M. Y., Jiang, C., Armstrong, D. W., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2010, 53, 75–80.
- [24] Phung, S. C., Nai, Y. H., Powell, S. M., Macka, M., Breadmore, M. C., *Electrophoresis* 2013, 34, 1657–1662.
- [25] Oukacine, F., Garrelly, L., Romestand, B., Goodall, D. M., Zou, T., Cottet, H., *Anal. Chem.* 2011, 83, 1571–1578.
- [26] Armstrong, D. W., Girod, M., He, L., Rodriguez, M. A., Wei, W., Zheng, J., Yeung, E. S., *Anal. Chem.* 2002, 74, 5523–5530.
- [27] Zheng, J., Yeung, E. S., *Anal. Chem.* 2003, 75, 818–824.
- [28] Petr, J., Ryparová, O., Znaležiona, J., Maier, V., Ševčík, J., *Electrophoresis* 2009, 30, 3863–3869.
- [29] Szumski, M., Kłodzińska, E., Buszewski, B., *Microchim. Acta* 2009, 164, 287–291.
- [30] Kłodzińska, E., Szumski, M., Dziubakiewicz, E., Hryniewicz, K., Skwarek, E., Janusz, W., Buszewski, B., *Electrophoresis* 2010, 31, 1590–1596.
- [31] Olaitan, A. O., Morand, S., Rolain, J.-M., *Front. Microbiol.* 2014, 5, 643–660.
- [32] Helander, I. M., Kato, Y., Kilpelainen, I., Kostianen, R., Lindner, B., Nummila, K., Sugiyama, T., Yokochi, T., *Eur. J. Biochem.* 1996, 237, 272–278.
- [33] Velkov, T., Deris, Z. Z., Huang, J. X., Azad, M. A. K., Butler, M., Sivanesan, S., Kaminskas, L. M., Dong, Y.-D., Boyd, B., Baker, M. A., Cooper, M. A., Nation, R. L., Li, J., *Innate Immun.* 2014, 20, 350–363.
- [34] ICH Guidelines Q2(R1): *Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Ref. CPMP/ICH/381/95.*
- [35] Hagg, M., Kaiser, V., Schmidtkunz, C., Welsch, T., *Electrophoresis* 2009, 30, 396–402.

CONCLUSION GENERALE

Au final, que pouvons-nous conclure sur la résistance à la colistine ?

En premier lieu la résistance à la colistine n'est pas un phénomène nouveau, contrairement à ce que l'on pourrait croire. En effet, nous pouvons citer, à titre d'exemple, les travaux de Muyembe et collaborateurs qui, dès le début des années 1970, démontraient la résistance naturelle à la colistine chez *Edwardsiella tarda* (Muyembe et al., 1973).

Au cours de cette même décennie, plusieurs études ont utilisé la colistine (et plus globalement les polymyxines) pour sélectionner des mutants et étudier les modifications induites au niveau des membranes bactériennes principalement chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Vaara et al., 1979). C'est d'ailleurs à partir de cette époque que le genre *Salmonella* est devenu le modèle de choix pour étudier et caractériser *in vitro*, le mécanisme de résistance à la colistine, aux polymyxines ou autres PAM... De fait, il n'est pas surprenant de constater que le gène *pmrA* fut identifié dès 1978 par Mäkelä et collaborateurs (Mäkelä et al., 1978) ; puis les autres suivirent...

Il est quand même intéressant de noter que d'un point de vue *in vivo*, je dirai même chez l'Homme ; la résistance à la colistine n'a pas été identifiée/étudiée en premier chez des Entérobactéries, non... Mais chez *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* (Gilad et al., 2005 ; Gales et al., 2006).

Notons quand même que plusieurs auteurs s'accordent sur le fait que la résistance à la colistine chez les animaux est restée longtemps ignorée malgré un usage intensif de cet antibiotique depuis des décennies dans l'élevage (Kempf et al., 2016) ; et que la prise de conscience de la résistance à la colistine chez les animaux d'élevage n'est que très récente avec la découverte du plasmide *mcr-1*... chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium... entre autres... (Liu et al., 2016). D'ailleurs des études rétrospectives ont fini par démontrer que la résistance à la colistine retrouvée chez des isolats bactériens provenant d'animaux, était bien plus ancienne (Shen et al., 2016).

En ce qui concerne l'épidémiologie de la résistance à la colistine ; la situation est-elle grave ? désespérée ?

Il est indéniable que le nombre de bactéries résistantes à la colistine augmente (cf. § « Epidémiologie de la résistance à la colistine, p52). Même si les taux de résistance à la colistine varient en fonction des espèces bactériennes considérées, avec des grandes différences entre chaque espèce ; l'inquiétude provient sans aucun doute de Entérobactéries. En effet, chez les espèces bactériennes de cette famille, la situation est préoccupante, surtout si nous considérons les espèces *Klebsiella pneumoniae* ou *Escherichia coli*... Toutefois, je pense que le principal

problème auquel nous sommes confrontés, concernant la résistance à la colistine, est la découverte d'un mécanisme de résistance plasmidique : le plasmide pHNSHP45, porteur du gène *mcr-1* (Liu et al., 2016). Cette découverte est à mon avis, le véritable signal d'alarme dont il nous faut bien saisir la portée. Certes, cela signifie que maintenant la résistance à la colistine est transférable d'une bactérie à une autre : horizontalement et verticalement ! En outre, *mcr-1* n'est plus le seul et unique gène plasmidique. Depuis, d'autres gènes ont été découverts : *mcr-2*, toujours en 2016 (Xavier et al., 2016) ; *mcr-3*, *mcr-4* et même *mcr-5* en 2017 (Yin et al., 2017 ; Caratolli et al., 2017 ; Borowiak et al., 2017)... et l'on compte déjà plusieurs variants génétiques pour certains gènes. Actuellement 12 variants ont été identifiés pour le gène *mcr-1*, notés *mcr-1.1* à *mcr-1.12* (Carretto et al., 2018)... Bref, nous devons faire face à une véritable guerre des clones !!

“A new hope” !?...or “β-lactams strike back” (Zasowski et al., 2015)

Depuis peu, deux nouvelles spécialités ont été approuvées par l'ANSM : le Zerbaxa® et le Zavicefta®.

Le Zerbaxa® est une association entre le ceftolozane (une C3G) et le tazobactam (un inhibiteur de β-lactamases), ce qui lui confère un spectre antibactérien assez large : *Pseudomonas aeruginosa*, les entérobactéries responsables d'infections communautaires (*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella* spp...) et sur les entérobactéries productrices de céphalosporinases responsables d'infections nosocomiales (*Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, et *Serratia marcescens*...). En revanche il est moins actif sur les souches de *Klebsiella pneumoniae* productrices de β-lactamase à spectre étendu (BLSE) et les souches du genre *Enterobacter* résistantes à la ceftazidime (HAS, 2016a).

Il a obtenu une AMM en juillet 2016 pour le traitement, chez l'adulte :

- des infections intra-abdominales compliquées ;
- des pyélonéphrites aiguës ;
- des infections urinaires compliquées.

Le Zavicefta® est une association entre la ceftazidime (C3G) et l'avibactam (un inhibiteur de β-lactamases, non-β-lactamine). L'avibactam est un inhibiteur de la classe des diazabicyclooctanones, qui possède une activité inhibitrice plus large que les inhibiteurs de β-lactamase « classiques ». Il inhibe les β-lactamases des classes Ambler A et C et certaines enzymes de classe D, dont les β-lactamases à spectre étendu (BLSE), les carbapénémases KPC

et OXA-48 et les enzymes AmpC. Par contre, il est sans effet sur les enzymes de classe B (métaallo- β -lactamases) et n'est pas capable d'inhiber de nombreuses enzymes de classe D.

Cette association vise donc à rétablir l'activité de la ceftazidime sur certains BGN (EBLSE, *Pseudomonas aeruginosa*) en neutralisant un certain nombre de β -lactamases (HAS, 2016b).

Il a obtenu une AMM en juin 2016 pour le traitement, chez l'adulte :

- Infections intra-abdominales compliquées,
- Infections des voies urinaires compliquées, dont les pyélonéphrites,
- Pneumonies nosocomiales, dont les pneumonies acquises sous ventilation mécanique.

Le Zavicefta® est également indiqué dans le traitement des infections causées par des BGN chez des patients adultes pour qui les options thérapeutiques sont limitées (i.e. résistant à la colistine).

Ces deux spécialités s'inscrivent dans une politique/stratégie de préservation des carbapénèmes. Elles représentent de nouvelles options thérapeutiques très intéressantes qui vont permettre une meilleure prise en charge des infections causées par des BGN MDR, voire XRD ; mais il ne s'agit en aucun cas de nouvelles molécules, *sensus stricto*.

En effet, il convient de rester prudent car ces antibiotiques appartiennent tous deux à la famille des β -lactamines. Pour la ceftazidime, il s'agit même d'une « ancienne » molécule, puisqu'elle a obtenu son AMM en juin 1985, est sortie de la réserve hospitalière 2004, puis rendue disponible en ville mars 2007. Et je ne souhaite pas ici faire état de la résistance à la Ceftazidime... et les erreurs 10 fois, 100 fois répétées sur le juste usage des antibiotiques et les nombreux plans nationaux « antibiotiques » dont les succès sont loin des espoirs qu'ils avaient suscités.

Finir sur une note optimiste !

La guerre est-elle perdue ? Non. Je me refuse à croire que la guerre qui nous oppose à la résistance aux anti-infectieux soit perdue. Il faut continuer la lutte qui passe par une meilleure connaissance des mécanismes d'action des agents anti-infectieux, des mécanismes de résistance des agents infectieux (le cas de la résistance à la colistine nous montre bien toute la diversité et toutes les ressources d'adaptation dont disposent les bactéries), un usage meilleur et plus juste des antibiotiques, changer les mentalités par rapport aux antibiotiques ; et aussi et surtout la promotion de la recherche et du développement de nouveaux anti-infectieux... car nous avons (et nous aurons toujours) besoin de nouveaux antibactériens...

BIBLIOGRAPHIE

- Abraham N., et Kwon D.H. (2009). A single amino acid substitution in PmrB is associated with polymyxin B resistance in clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 298, 249-254. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01720.x
- Agero Y., Torpdahl M., Zachariassen C., Seyfarth A., Hammerum A.M., Nielsen, E.M. (2012). Tentative colistin epidemiological cut-off value for *Salmonella* spp. *Foodborne Pathog. Dis.* 9, 367–369. doi: 10.1089/fpd.2011.1015
- Aguirre A., Lejona S., Vescovi E.G., Soncini F.C. (2000). Phosphorylated PmrA interacts with the promoter region of *ugd* in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Bacteriol.* 182, 3874-3876. doi: 10.1128/JB.182.13.38743876.2000
- Ah Y.M., Kim A.J., Lee J.Y. (2014). Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 44, 8-15. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.02.016>.
- AMR. Review on Antimicrobial Resistance. 2016. <https://amr-review.org/>
- Antoniadou A., Kontopidou F., Poulakou G., Koratzanis E., Galani I., Papadomichelakis E., Kopterides P., Souli M., Armaganidis A., Giamarellou H. (2007). Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 786-790. <https://doi.org/10.1093/jac/dk1562>.
- Aquilini E., Merino S., Knirel Y.A., Regue M., Tomas J.M. (2014). Functional identification of *Proteus mirabilis* *eptC* gene encoding a core lipopolysaccharide phosphoethanolamine transferase. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 6689-6702. doi: 10.3390/ijms15046689
- Arduino SM, Quiroga MP, Ramirez MS, Merkier AK, Errecalde L, Di Martino A, Smayevsky J, Kaufman S, Centron D. (2012). Transposons and integrons in colistin-resistant clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* with epidemic or sporadic behaviour. *J. Med. Microbiol.* 61, 1417-1420. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.038968-0>.
- Barchiesi J., Espariz M., Checa S.K., Soncini F.C. (2009). Downregulation of RpoN-controlled genes protects *Salmonella* cells from killing by the cationic antimicrobial peptide polymyxin B. *FEMS Microbiol. Lett.* 291, 73-79. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01437.x
- Barrow K., et Kwon D.H. (2009). Alterations in two-component regulatory systems of *phoPQ* and *pmrAB* are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of

- Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 5150-5154. doi: 10.1128/AAC.00893-09
- Basu S., Radziejewska-Lebrecht J., Mayer H. (1986). Lipopolysaccharide of *Providencia rettgeri*. Chemical studies and taxonomical implications. *Arch. Microbiol.* 144, 213-218. doi: 10.1007/BF00410949
- Bialvaei A.Z., et Samadi Kafil H. (2015). Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Curr. Med. Res. Opin.* 31, 707-721. <https://doi.org/10.1185/03007995.2015.1018989>.
- Biswas S., Brunel J.M., Dubus J.C., Reynaud-Gaubert M., Rolain J.M. (2012). Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 10, 917-934. doi: 10.1586/eri.12.78
- Bogdanovich T., Adams-Haduch J.M., Tian G.B., Nguyen M.H., Kwak E.J., Muto C.A., Doi Y. (2011). Colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to the international epidemic clone ST258. *Clin. Infect. Dis.* 53, 373-376. <https://doi.org/10.1093/cid/cir401>.
- Boll M., Radziejewska-Lebrecht J., Warth C., Krajewska-Pietrasik D., Mayer H. (1994). 4-Amino-4-deoxy-L-arabinose in LPS of enterobacterial R-mutants and its possible role for their polymyxin reactivity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 8, 329-341.
- Borowiak M., Fischer J., Hammerl J.A., Hendriksen R.S., Szabo I., Malorny B. (2017). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J Antimicrob Chemother.* 72, 3317-3324. doi: 10.1093/jac/dkx327.
- Boucher H.W., Talbot G.H., Benjamin D.K. Jr, Bradley J., Guidos R.J., Jones R.N., Murray B.E., Bonomo R.A., Gilbert D.; Infectious Diseases Society of America. (2013). 10 x '20 Progress--development of new drugs active against gram-negative bacilli: an update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 56, 1685-94. doi:10.1093/cid/cit152.
- Bratu S., Tolaney P., Karumudi U., Quale J., Mooty M., Nichani S., Landman D. (2005). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 128-132. <https://doi.org/10.1093/jac/dki175>.
- Campos M.A., Vargas M.A., Regueiro V., Llompert C.M., Alberti S., Bengoechea J.A. (2004). Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* 72, 7107-7114. doi:10.1128/IAI.72.12.7107-7114.2004

- Cannatelli A., D'Andrea M.M., Giani T., Di P.V., Arena F., Ambretti S., Gaibani P., Rossolini G.M. (2013). In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 5521-5526. doi: 10.1128/AAC.01480-13
- Cannatelli A., Di Pilato V., Giani, T., Arena F., Ambretti S., Gaibani P., D'Andrea M.M., Rossolini G.M. (2014b). In vivo evolution to colistin resistance by PmrB sensor kinase mutation in KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* associated with low-dosage colistin treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 4399-4403. doi: 10.1128/AAC.02555-14
- Cannatelli A., Giani T., D'Andrea M.M., Di Pilato V., Arena F., Conte V., Tryfinopoulou K., Vatopoulos A., Rossolini G.M. ; COLGRIT Study Group. (2014a). MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5696-5703. doi:10.1128/AAC.03110-14
- Cantón R., Horcajada J.P., Oliver A., Garbajosa P.R., Vila J. (2013). Inappropriate use of antibiotics in hospitals: the complex relationship between antibiotic use and antimicrobial resistance. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 31, 3-11. doi:10.1016/S0213-005X(13)70126-5.
- Capone A., Giannella M., Fortini D., Giordano A., Meledandri M., Ballardini M., Venditti M., Bordi E., Capozzi D., Balice M.P., Tarasi A., Parisi G., Lappa A., Carattoli A., Petrosillo N. (2013). High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, E23-E30. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12070>.
- Carattoli A., Villa L., Feudi C., Curcio L., Orsini S., Luppi A., Pezzotti G., Magistrali C.F. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill.* 22, pii: 30589. doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589.
- Carretto E., Brovarone F., Nardini P., Russello G., Barbarini D., Pongolini S., Gagliotti C., Carattoli A., Sarti M. (2018). Detection of mcr-4 positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in clinical isolates of human origin, Italy, October to November 2016. *Euro Surveill.* 23(2). doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.2.17-00821.

- Chen S., Hu F., Zhang X., Xu X., Liu Y., Zhu D., Wang H. (2011). Independent emergence of colistin-resistant Enterobacteriaceae clinical isolates without colistin treatment. *J. Clin. Microbiol.* 49, 4022-4023. <https://doi.org/10.1128/JCM.01233-11>.
- Cheng H.Y., Chen Y.F., Peng H.L. (2010). Molecular characterization of the PhoPQ-PmrD-PmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *J. Biomed. Sci.* 17:60. doi: 10.1186/14230127-17-60
- Chiu S.K., Wu T.L., Chuang Y.C., Lin J.C., Fung C.P., Lu P.L., Wang J.T., Wang L.S., Siu L.K., Yeh K.M. (2013). National surveillance study on carbapenem non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: the emergence and rapid dissemination of KPC-2 carbapenemase. *PLoS One.* 8, e69428. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069428>.
- Cizmeci Z., Aktas E., Otlu B., Acikgoz O., Ordekci S. (2017). Molecular characterization of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae yields increasing rates of NDM-1 carbapenemases and colistin resistance in an OXA-48- endemic area. *J. Chemother.* 29, 344-350. doi: 10.1080/1120009X.2017.1323149.
- Clements A., Tull D., Jenney A.W., Farn J.L., Kim S.H., Bishop R.E., McPhee J.B., Hancock R.E., Hartland E.L., Pearse M.J., Wijburg O.L., Jackson D.C., McConville M.J., Strugnell R.A. (2007). Secondary acylation of *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide contributes to sensitivity to antibacterial peptides. *J. Biol. Chem.* 282, 15569-15577. doi: 10.1074/jbc.M701454200
- Coornaert A., Lu A., Mandin P., Springer M., Gottesman S., Guillier M. (2010). MicA sRNA links the PhoP regulon to cell envelope stress. *Mol. Microbiol.* 76, 467-479. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07115.x
- de Jong A., Thomas V., Simjee S., Godinho K., Schiessl B., Klein U., Butty P., Vallé M., Marion H., Shryock T.R. (2012). Pan-European monitoring of susceptibility to human-use antimicrobial agents in enteric bacteria isolated from healthy food-producing animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 638-651. doi:10.1093/jac/dkr539
- Di Pilato V., Arena F., Tascini C., Cannatelli A., Henrici De Angelis L., Fortunato S., Giani T., Menichetti F., Rossolini G.M. (2016). mcr-1.2, a new mcr variant carried on a transferable plasmid from a colistin-resistant KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strain of sequence type 512. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 5612-5615. doi:10.1128/AAC.01075-16
- Diene S.M., Merhej V., Henry M., El F.A., Roux V., Robert C., Azza S., Gavory F., Barbe V., La Scola B., Raoult D., Rolain J.M. (2013). The rhizome of the multidrug-resistant

- Enterobacter aerogenes genome reveals how new "killer bugs" are created because of a sympatric lifestyle. *Mol. Biol. Evol.* 30, 369-383. doi:10.1093/molbev/mss236
- Dobias J., Poirel L., Nordmann P. (2017). Cross-resistance to human cationic antimicrobial peptides and to polymyxins mediated by the plasmid-encoded MCR-1? *Clin. Microbiol. Infect.* 23, 676.e1-676.e5. doi:10.1016/j.cmi.2017.03.015.
- Dortet L., Bonnin R., Jousset A., Gauthier L., Naas T. (2016). Émergence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries : une brèche dans le dernier rempart contre la pan-résistance ! *Journal des Anti-Infectieux.* 18, 139-159. doi:10.1016/j.antinf.2016.09.003
- Drancourt M. Klebsiella. p1011-1014. In *Précis de bactériologie clinique 2^{ème} édition*. Eds Jean Freney, François Renaud, Roland Leclercq, Philippe Riegel. Editions ESKA – Alexandre Lacassagne ; 1764 p.
- Du H., Chen L., Tang Y.W., Kreiswirth B.N. (2016). Emergence of the mcr-1 colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Lancet Infect. Dis.* 16, 287-288. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00056-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00056-6).
- EMEA. (2002). Colistin: Summary report (1), EMEA/MRL/016/95-FINAL. London: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Veterinary Medicinal Products.
- Ernst R.K., Guina T., Miller S.I. (2001). Salmonella Typhimurium outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. *Microbes Infect.* 3, 1327-1334.
- EUROSTAT. Demographic Balance. 2016. http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/File:Demographic_balance,_2016_%28thousands%29.png
- Falagas M.E., et Kasiakou S.K. (2005). Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.* 40, 1333-1341.
- Falagas M.E., et Bliziotis I.A. (2007). Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Int. J. Antimicrob. Agents.* 29, 630-636.
- Falagas M.E., et Michalopoulos A. (2006). Polymyxins: old antibiotics are back. *Lancet* 367, 633-634. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68241-X
- Falagas M.E., Rafailidis P.I., Matthaiou D.K. (2010). Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist. Updat.* 13, 132-138. doi:10.1016/j.drug.2010.05.002
- Falgenhauer L., Waezsada S.E., Yao Y., Imirzalioglu C., Kasbohrer A., Roesler U., Michael G.B., Schwarz S., Werner G., Kreienbrock L., Chakraborty T. (2016). Colistin resistance gene mcr-1 in extended-spectrum betalactamase-producing and carbapenemase-

- producing Gram-negative bacteria in Germany. *Lancet Infect. Dis.* 16, 282-283. doi:10.1016/S1473-3099(16)00009-8.
- FDA. Drug approvals and Databases. (2017a). <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/default.htm>
- FDA. FDA Approved Drugs for Infections and Infectious Diseases. (2017b). <https://www.centerwatch.com/drug-information/fda-approved-drugs/therapeutic-area/25/infections-and-infectious-diseases>
- Gaibani P., Lombardo D., Lewis R.E., Mercuri M., Bonora S., Landini M.P., Ambretti S. (2014). In vitro activity and post-antibiotic effects of colistin in combination with other antimicrobials against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1856-1865. doi:10.1093/jac/dku065
- Gales A.C., Jones R.N., Sader H.S. (2006). Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clin Microbiol Infect.* 12, 315-321.
- Gales A.C., Jones R.N., Sader H.S. (2011). Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2070-2074. doi:10.1093/jac/dkr239.
- Garza-Ramos U., Barrios H., Reyna-Flores F., Sanchez-Perez A., Tamayo-Legorreta E., Ibarra-Pacheco A., Salazar-Salinas J., Nunez-Ceballos R., Silva-Sanchez J. (2014). Characteristics of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST258) clinical isolates from outbreaks in 2 Mexican medical centers. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 79, 483-485. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2014.05.010.
- Giani T., Arena F., Vaggelli G., Conte V., Chiarelli A., Henrici De Angelis L., Fornaini R., Grazzini M., Niccolini F., Pecile P., Rossolini G.M. (2015). Large nosocomial outbreak of colistin-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* traced to clonal expansion of an mgrB deletion mutant. *J. Clin. Microbiol.* 53, 3341-3344. doi:10.1128/JCM.01017-15
- Gilad J., Eskira S., Riesenberk K., Schlaeffer F., Hyam E., Borer A. (2005). Emergence of nosocomial colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*, abstr. K-1292, p. 333. Abstr. 45th Annu. Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. American Society for Microbiology, Washington, DC.

- Grare M. (2009). De la genèse d'une nouvelle classe d'antibactériens à base de polyphénols cycliques de type calixarène : études moléculaire(s), cellulaires(s) et structurale(s) en vue de l'identification des cibles d'action : le cas du para-guanidinoéthylcalix[4]arène. Thèse d'Université. 308 p. http://docnum.univ-lorraine.fr/public/SCD_T_2009_0138_GRARE.pdf
- Guckes K.R., Kostakioti M., Breland E.J., Gu A.P., Shaffer C.L., Martinez C.R. III, Hultgren S.J., Hadjifrangiskou M. (2013). Strong cross-system interactions drive the activation of the QseB response regulator in the absence of its cognate sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 16592-16597. doi:10.1073/pnas.1315320110
- Gunn J.S. (2001). Bacterial modification of LPS and resistance to antimicrobial peptides. *J. Endotoxin. Res.* 7, 57-62. doi:10.1177/096805190100700 11001
- Gunn J.S. (2008). The *Salmonella PmrAB* regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends Microbiol.* 16, 284-290. doi:10.1016/j.tim.2008.03.007
- Gunn J.S., et Miller S.I. (1996). PhoP-PhoQ activates transcription of pmrAB, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. *J. Bacteriol.* 178, 6857-6864.
- Gunn J.S., Lim K.B., Krueger J., Kim K., Guo L., Hackett M., Miller S.I. (1998). PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Mol. Microbiol.* 27, 1171-1182. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00757.x
- Gunn J.S., Ryan S.S., Van Velkinburgh J.C., Ernst R.K., Miller S.I. (2000). Genetic and functional analysis of a PmrA-PmrB-regulated locus necessary for lipopolysaccharide modification, antimicrobial peptide resistance, and oral virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect. Immun.* 68, 6139-6146. doi:10.1128/IAI.68.11.6139-6146.2000
- Guo L., Lim K.B., Gunn J.S., Bainbridge B., Darveau R.P., Hackett M., Miller S.I. (1997). Regulation of lipid A modifications by *Salmonella typhimurium* virulence genes phoP-phoQ. *Science.* 276, 250-253. doi:10.1126/science.276.5310.250
- Haciseyitoglu D., Dokutan A., Abulaila A., Erdem F., Cag Y., Ozer S., Aktas Z. (2017). The First Enterobacter cloacae Co-Producing NDM and OXA-48 Carbapenemases and Interhospital Spread of OXA-48 and NDM-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. *Clin. Lab.* 63, 1213-1222. doi:10.7754/Clin.Lab.2017.170120.
- Hancock R.E. (1997). Peptide antibiotics. *Lancet.* 349, 418-422.

- HAS, 2016a. https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-14850_ZERBAXA_PIC_INS_Avis3_CT14850.pdf
- HAS, 2016b. https://www.has-sante.fr/portail/upload/docs/evamed/CT-15531_ZAVICETFA_PIC_INS_Avis2_CT15531.pdf
- Hayakawa K., Marchaim D., Divine G.W., Pogue J.M., Kumar S., Lephart P., Risko K., Sobel J.D., Kaye K.S. (2012). Growing prevalence of *Providencia stuartii* associated with the increased usage of colistin at a tertiary health care center. *Int. J. Infect. Dis.* 16, e646-e648. doi:10.1016/j.ijid.2012.05.1029
- Helander I.M., Kato Y., Kilpelainen I., Kostianen R., Lindner B., Nummila K., Sugiyama T., Yokochi T. (1996). Characterization of lipopolysaccharides of polymyxin-resistant and polymyxin-sensitive *Klebsiella pneumoniae* O3. *Eur. J. Biochem.* 237, 272-278. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.0272n.x
- Helander I.M., Kilpelainen I., Vaara M. (1994). Increased substitution of phosphate groups in lipopolysaccharides and lipid A of the polymyxin-resistant pmrA mutants of *Salmonella typhimurium*: a ³¹P-NMR study. *Mol. Microbiol.* 11, 481-487. doi:10.1111/j.1365-2958.1994.tb00329.x
- Herrera C.M., Hankins J.V., Trent M.S. (2010). Activation of PmrA inhibits LpxT-dependent phosphorylation of lipid A promoting resistance to antimicrobial peptides. *Mol. Microbiol.* 76, 1444-1460. doi:10.1111/j.13652958.2010.07150.x
- Högberg L.D., Heddini A., Cars O. (2010). The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 509-515. doi:10.1016/j.tips.2010.08.002
- Jacquier H., Le Monnier A., Carbonnelle E., Corvec S., Illiaquer M., Bille E., Zahar J.R., Jauréguy F., Fihman V., Tankovic J., Cattoir V. ; Gmc Study Group. (2012). In vitro antimicrobial activity of "last-resort" antibiotics against unusual nonfermenting Gram-negative bacilli clinical isolates. *Microb. Drug Resist.* 18, 396-401. doi:10.1089/mdr.2011.0195
- Jayol A., Nordmann P., Brink A., Poirel L. (2015). Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 2780-2784. doi:10.1128/AAC.05055-14
- Jayol A., Poirel L., Brink A., Villegas M.V., Yilmaz M., Nordmann P. (2014). Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 4762-4766. doi:10.1128/AAC.00084-14

- Jayol A., Poirel L., Dortet L., Nordmann P. (2016). National survey of colistin resistance among carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and outbreak caused by colistin-resistant OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*, France, 2014. *Euro Surveill.* 21, 30339. doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.37.30339
- Jayol A., Saly M., Nordmann P., Ménard A., Poirel L., Dubois V. (2017). *Hafnia*, an enterobacterial genus naturally resistant to colistin revealed by three susceptibility testing methods. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 2507-2511. doi:10.1093/jac/dkx154.
- Jiang S.S., Lin T.Y., Wang W.B., Liu M.C., Hsueh P.R., Liaw S.J. (2010a). Characterization of UDP-glucose dehydrogenase and UDP-glucose pyrophosphorylase mutants of *Proteus mirabilis*: defectiveness in polymyxin B resistance, swarming, and virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 2000-2009. doi:10.1128/AAC.01384-09
- Jiang S.S., Liu M.C., Teng L.J., Wang W.B., Hsueh P.R., Liaw S.J. (2010b). *Proteus mirabilis* pmrI, an RppA-regulated gene necessary for polymyxin B resistance, biofilm formation, and urothelial cell invasion. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 1564-1571. doi:10.1128/AAC.01219-09
- Johansen H.K., Moskowitz S.M., Ciofu O., Pressler T., Hoiby N. (2008). Spread of colistin resistant non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* among chronically infected Danish cystic fibrosis patients. *J. Cyst. Fibros.* 7, 391-397. doi:10.1016/j.jcf.2008.02.003
- Johnson A.P., Uttley A.H., Woodford N., George R.C. (1990). Resistance to vancomycin and teicoplanin: an emerging clinical problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 280-291.
- Jones J.W., Shaffer S.A., Ernst R.K., Goodlett D.R., Turecek F. (2008). Determination of pyrophosphorylated forms of lipid A in Gram-negative bacteria using a multivariate mass spectrometric approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 12742-12747. doi:10.1073/pnas.0800445105
- Kaca W., Radziejewska-Lebrecht J., Bhat U.R. (1990). Effect of polymyxins on the lipopolysaccharide-defective mutants of *Proteus mirabilis*. *Microbios.* 61, 23-32.
- Kato A., Chen H.D., Latifi T., Groisman E.A. (2012). Reciprocal control between a bacterium's regulatory system and the modification status of its lipopolysaccharide. *Mol. Cell.* 47, 897-908. doi:10.1016/j.molcel.2012.07.017
- Kato A., Latifi T., Groisman E.A. (2003). Closing the loop: the PmrA/PmrB two-component system negatively controls expression of its posttranscriptional activator PmrD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 4706-4711. doi:10.1073/pnas.0836837100
- Kawasaki K., China K., Nishijima M. (2007). Release of the lipopolysaccharide deacylase PagL from latency compensates for a lack of lipopolysaccharide aminoarabinose modification-

- dependent resistance to the antimicrobial peptide polymyxin B in *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* 189, 4911-4919. doi:10.1128/JB.00451-07
- Kawasaki K., Ernst R.K., Miller S.I. (2005). Inhibition of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lipopolysaccharide deacylation by aminoarabinose membrane modification. *J. Bacteriol.* 187, 2448-2457. doi:10.1128/JB.187.7.24482457.2005
- Kazmierczak M.J., Wiedmann M., Boor K.J. (2005). Alternative sigma factors and their roles in bacterial virulence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 527-543. doi:10.1128/MMBR.69.4.527-543.2005
- Kempf I., Fleury M.A., Drider D., Bruneau M., Sanders P., Chauvin C., Madec J.Y., Jouy E. (2013). What do we know about resistance to colistin in Enterobacteriaceae in avian and pig production in Europe? *Int. J. Antimicrob. Agents* 42, 379-383. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.06.012
- Kempf I., Jouy E., Chauvin C. (2016). Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. *Int J Antimicrob Agents.* 48, 598-606. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.09.016.
- Kilic A., et Baysallar M. (2015). The First *Klebsiella pneumoniae* Isolate Co-Producing OXA-48 and NDM-1 in Turkey. *Ann. Lab. Med.* 35, 382-383. doi:10.3343/alm.2015.35.3.382
- Kim S.H., Jia W., Parreira V.R., Bishop R.E., Gyles C.L. (2006). Phosphoethanolamine substitution in the lipid A of *Escherichia coli* O157: H7 and its association with PmrC. *Microbiology* 152, 657-666. doi:10.1099/mic.0. 28692-0
- Kim S.Y., Choi H.J., Ko K.S. (2014). Differential expression of twocomponent systems, pmrAB and phoPQ, with different growth phases of *Klebsiella pneumoniae* in the presence or absence of colistin. *Curr. Microbiol.* 69, 37-41. doi:10.1007/s00284-014-0549-0
- Kluytmans J. (2017). Plasmid-encoded colistin resistance: mcr-one, two, three and counting. *Euro Surveill.* 22, pii: 30588. doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30588.
- Kontopidou F., Plachouras D., Papadomichelakis E., Koukos G., Galani I., Poulakou G., Dimopoulos G., Antoniadou A., Armaganidis A., Giamarellou H. (2011). Colonization and infection by colistin-resistant Gram-negative bacteria in a cohort of critically ill patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, E9-11. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03649.x.
- Kontopoulou K., Protonotariou E., Vasilakos K., Kriti M., Koteli A., Antoniadou E., Sofianou D. (2010). Hospital outbreak caused by *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 beta-lactamase resistant to colistin. *J. Hosp. Infect.* 76, 70-73. doi:10.1016/j.jhin.2010.03.021.

- Kox L.F., Wosten M.M., Groisman E.A. (2000). A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system. *EMBO J.* 19, 1861-1872. doi:10.1093/emboj/19.8.1861
- Lacour S., Bechet E., Cozzone A.J., Mijakovic I., Grangeasse C. (2008). Tyrosine phosphorylation of the UDP-glucose dehydrogenase of *Escherichia coli* is at the crossroads of colanic acid synthesis and polymyxin resistance. *PLoS One.* 3, e3053. doi:10.1371/journal.pone.0003053
- Lacour S., Doublet P., Obadia B., Cozzone A.J., Grangeasse C. (2006). A novel role for protein-tyrosine kinase Etk from *Escherichia coli* K-12 related to polymyxin resistance. *Res. Microbiol.* 157, 637-641. doi:10.1016/j.resmic.2006.01.003
- Lee H., Hsu F.F., Turk J., Groisman E.A. (2004). The PmrA-regulated pmrC gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. *J. Bacteriol.* 186, 4124-4133. doi:10.1128/JB.186.13.4124-4133.2004
- Li J., Nation R.L., Turnidge J.D., Milne R.W., Coulthard K., Rayner C.R., Paterson D.L. (2006). Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect. Dis.* 6, 589-601.
- Lin Q.Y., Tsai Y.-L., Liu M.-C., Lin W.-C., Hsueh P.-R., Liaw S.-J. (2014). *Serratia marcescens* arn, a PhoP-regulated locus necessary for polymyxin B resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5181-5190. doi: 10.1128/AAC.00013-14
- Lippa A.M., et Goulian M. (2009). Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. *PLoS. Genet.* 5, e1000788. doi:10.1371/journal.pgen.1000788
- Lippa A.M., et Goulian M. (2012). Perturbation of the oxidizing environment of the periplasm stimulates the PhoQ/PhoP system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 194, 1457-1463. doi:10.1128/JB.06055-11
- Liu B.T., Song F.J., Zou M., Hao Z.H., Shan H. (2017). Emergence of colistin resistance gene mcr-1 in *Cronobacter sakazakii* producing NDM-9 and *Escherichia coli* from the same animal. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e01444-16. doi:10.1128/AAC.01444-16.
- Liu Y.Y., Wang Y., Walsh T.R., Yi L.X., Zhang R., Spencer J., Doi Y., Tian G., Dong B., Huang X., Yu L.F., Gu D., Ren H., Chen X., Lv L., He D., Zhou H., Liang Z., Liu J.H., Shen J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* 16, 161-168. doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7.

- Llobet E., Campos M.A., Gimenez P., Moranta D., Bengoechea J.A. (2011). Analysis of the networks controlling the antimicrobial-peptidedependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence factors. *Infect. Immun.* 79, 3718-3732. doi:10.1128/IAI.05226-11
- Llobet E., Tomas J.M., Bengoechea J.A. (2008). Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. *Microbiology* 154, 3877-3886. doi:10.1099/mic.0.2008/022301-0
- López-Camacho E., Gómez-Gil R., Tobes R., Manrique M., Lorenzo M., Galván B., Salvarelli E., Moatassim Y., Salanueva I.J., Pareja E., Codoñer F.M., Alvarez-Tejado M., Garcillán-Barcia M.P., De la Cruz F., Mingorance J. (2013). Genomic analysis of the emergence and evolution of multidrug resistance during a *Klebsiella pneumoniae* outbreak including carbapenem and colistin resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 632-636. doi:10.1093/jac/dkt419
- Loutet S.A., et Valvano M.A. (2011). Extreme antimicrobial peptide and polymyxin B resistance in the genus *Burkholderia*. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 1, 6. doi:10.3389/fcimb.2011.00006
- Mäkelä P.H., Sarvas M., Calcagno S., Lounatmaa K. (1978). Isolation and genetic characterization of polymyxin-resistant mutants of *Salmonella*. *FEMS Microbiol. Lett.* 3:323-326.
- Mamma C., Bonura C., Di Bernardo F., Aleo A., Fasciana T., Sodano C., Saporito M.A., Verde M.S., Tetamo R., Palma D.M. (2011). Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. *Euro Surveill.* 17, pii: 20248.
- Marchaim D., Chopra T., Pogue J.M., Perez F., Hujer A.M., Rudin S., Endimiani A., Navon-Venezia S., Hothi J., Slim J., Blunden C., Shango M., Lephart P.R., Salimnia H., Reid D., Moshos J., Hafeez W., Bheemreddy S., Chen T.Y., Dhar S., Bonomo R.A., Kaye K.S. (2011). Outbreak of colistin-resistant, carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in metropolitan Detroit, Michigan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 593-599. <https://doi.org/10.1128/AAC.01020-10>
- Martis N., Leroy S., Blanc V. (2014). Colistin in multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* blood-stream infections: a narrative review for the clinician. *J. Infect.* 69, 1-12. doi:10.1016/j.jinf.2014.03.001
- McCoy A.J., Liu H., Falla T.J., Gunn J.S. (2001). Identification of *Proteus mirabilis* mutants with increased sensitivity to antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2030-2037. doi: 10.1128/AAC.45.7.20302037.2001

- Meletis G., Oustas E., Botziori C., Kakasi E., Koteli A. (2015). Containment of carbapenem resistance rates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in a Greek hospital with a concomitant increase in colistin, gentamicin and tigecycline resistance. *New Microbiol.* 38, 417-421.
- Merkier A.K., Rodriguez M.C., Togneri A., Brengi S., Osuna C., Pichel M., Cassini M.H., Serratia marcescens Argentinean Collaborative Group, Centrón D. (2013). Outbreak of a cluster with epidemic behavior due to *Serratia marcescens* after colistin administration in a hospital setting. *J. Clin. Microbiol.* 51, 2295-2302. doi:10.1128/JCM.03280-12
- Mezzatesta M.L., Caio C., Gona F., Cormaci R., Salerno I., Zingali T., Denaro C., Gennaro M., Quattrone C., Stefani S. (2014). Carbapenem and multidrug resistance in Gram-negative bacteria in a single centre in Italy: considerations on in vitro assay of active drugs. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 44, 112-116. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.04.014.
- Mezzatesta M.L., Gona F., Caio C., Petrolito V., Sciortino D., Sciacca A., Santangelo C., Stefani S. (2011). Outbreak of KPC-3-producing, and colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* infections in two Sicilian hospitals. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1444-1447. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03572.x.
- Miller A.K., Brannon M.K., Stevens L., Johansen H.K., Selgrade S.E., Miller S.I., Høiby N., Moskowitz S.M. (2011). PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 5761-5769. doi:10.1128/AAC.05391-11
- Mitrophanov A.Y., Jewett M.W., Hadley T.J., Groisman, E.A. (2008). Evolution and dynamics of regulatory architectures controlling polymyxin B resistance in enteric bacteria. *PLoS Genet.* 4, e1000233. doi:10.1371/journal.pgen.1000233
- Moffatt J.H., Harper M., Harrison P., Hale J.D., Vinogradov E., Seemann T., Henry R., Crane B., St Michael F., Cox A.D., Adler B., Nation R.L., Li J., Boyce J.D. (2010). Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 4971-4977. doi:10.1128/AAC.00834-10
- Monaco M., Giani T., Raffone M., Arena F., Garcia-Fernandez A., Pollini S., Grundmann H., Pantosti A., Rossolini G.M. (2014). Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. *Euro Surveill.* 19, 20939. doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.42.20939.

- Moon K., et Gottesman S. (2009). A PhoQ/P-regulated small RNA regulates sensitivity of *Escherichia coli* to antimicrobial peptides. *Mol. Microbiol.* 74, 1314-1330. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06944.x
- Morales A.S., Fragoso de A.J., de Moura Gomes V.T., Reis Costa A.T., dos Prazeres Rodrigues D., Porfida Ferreira T.S., de Lima Filsner P.H., Felizardo M.R., Micke Moreno A. (2012). Colistin resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains isolated from swine in Brazil. *ScientificWorldJournal.* 2012, 109795. doi:10.1100/2012/109795
- Mulvey M.R., Mataseje L.F., Robertson J., Nash J.H., Boerlin P., Toye B., Irwin R., Melano R.G. (2016). Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect. Dis.* 16, 289-290. doi:10.1016/S1473-3099(16)00067-0
- Murray S.R., Ernst R.K., Bermudes D., Miller S.I., Low K.B. (2007). *pmrA* (Con) confers *pmrHFIJKL*-dependent EGTA and polymyxin resistance on *msbB* *Salmonella* by decorating lipid A with phosphoethanolamine. *J. Bacteriol.* 189, 5161-5169. doi:10.1128/JB.01969-06
- Muyembe T., Vandepitte J., Desmyter J. (1973). Natural colistin resistance in *Edwardsiella tarda*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4, 521-524. doi:10.1128/AAC.4.5.521
- Neonakis I.K., Samonis G., Messaritakis H., Baritaki S., Georgiladakis A., Maraki S., Spandidos D.A. (2010). Resistance status and evolution trends of *Klebsiella pneumoniae* isolates in a university hospital in Greece: ineffectiveness of carbapenems and increasing resistance to colistin. *Chemotherapy.* 56, 448-452. doi:10.1159/000320943.
- Nikaido H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 593-656. doi:10.1128/MMBR.67.4.593656.2003
- Nordmann P., Lienhard R., Kieffer N., Clerc O., Poirel L. (2016). Plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* in bacteremia in Switzerland. *Clin. Infect. Dis.* 62, 1322-1323. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw124>.
- Nummila K., Kilpelainen I., Zahringer U., Vaara M., Helander I.M. (1995). Lipopolysaccharides of polymyxin B-resistant mutants of *Escherichia coli* are extensively substituted by 2-aminoethyl pyrophosphate and contain aminoarabinose in lipid A. *Mol. Microbiol.* 16, 271-278. doi:10.1111/j.13652958.1995.tb02299.x
- O'Neill J. (2016). Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. The Review on Antimicrobial Resistance. pp84. https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf

- Olaitan A.O., Diene S.M., Gupta S.K., Adler A., Assous M.V., Rolain J.M. (2014a). Genome analysis of NDM-1 producing *Morganella morganii* clinical isolate. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 12, 1297-1305. doi:10.1586/14787210. 2014.944504
- Olaitan A.O., Diene S.M., Kempf M., Berrazeg M., Bakour S., Gupta S.K., Thongmalayvong B., Akkhavong K., Somphavong S., Paboriboune P., Chaisiri K., Komalamisra C., Adelowo O.O., Fagade O.E., Banjo O.A., Oke A.J., Adler A., Assous M.V., Morand S., Raoult D., Rolain J.M. (2014b). Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: an epidemiological and molecular study. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 44, 500-507. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.07.020
- Olaitan A.O., Morand S., Rolain, J.M. (2014c). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol.* 5, 643. doi:10.3389/fmicb.2014.00643
- OMS. (2014). WHO's first global report on antibiotic resistance reveals serious, worldwide threat to public health. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/en/>
- OMS. (2017a). L'OMS publie une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/fr/>
- OMS. (2017b). Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf
- Padilla E., Llobet E., Domenech-Sanchez A., Martinez-Martinez L., Bengoechea J.A., Alberti, S. (2010). *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 177-183. doi:10.1128/AAC.00715-09
- Parisi S.G., Bartolini A., Santacatterina E., Castellani E., Ghirardo R., Berto A., Franchin E., Menegotto N., De Canale E., Tommasini T., Rinaldi R., Basso M., Stefani S., Palu G. (2015). Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* strains producing carbapenemases and increase of resistance to colistin in an Italian teaching hospital from January 2012 to December 2014. *BMC Infect. Dis.* 15, 244. doi:10.1186/s12879-015-0996-7

- Pena I., Picazo J.J., Rodriguez-Avial C., Rodriguez-Avial I. (2014). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 43, 460-464. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.01.021
- Perez L.R. (2015). Evaluation of polymyxin susceptibility profile among KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* using Etest and MicroScan Walk-Away automated system. *APMIS*. 123, 951-954. doi:10.1111/apm.12438
- Poirel L., et Nordmann P. (2016). Plasmid-encoded colistin resistance: the animal world as the culprit? *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2326-2327. doi:10.1093/jac/dkw074
- Poirel L., Jayol A., Bontron S., Villegas M.V., Ozdamar M., Türkoglu S., Nordmann P. (2015). The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 75-80. doi:10.1093/jac/dku323
- Poirel L., Jayol A., Nordmann P. (2017). Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 557-596. doi:10.1128/CMR.00064-16
- Poirel L., Kieffer N., Brink A., Coetze J., Jayol A., Nordmann P. (2016b). Genetic features of MCR-1-producing colistin-resistant *Escherichia coli* isolates, South Africa. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 4394-4397. doi:10.1128/AAC.00444-16
- Poirel L., Kieffer N., Liassine N., Thanh D., Nordmann P. (2016a). Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Lancet Infect. Dis.* 16, 281. doi:10.1016/S1473-3099(16)00006-2
- PPD. (2010). Pathogen Profile Dictionary. Gram-negative bacteria. The Journal of Undergraduate Biological Studies. <http://www.ppdictionary.com/gnbac.htm>
- Quesada A., Porrero M.C., Téllez S., Palomo G., García M., Domínguez L. (2015). Polymorphism of genes encoding PmrAB in colistin-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 71-74. doi:10.1093/jac/dku320
- Raetz C.R., et Whitfield C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 635-700.
- Raetz C.R., Reynolds C.M., Trent M.S., Bishop R.E. (2007). Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 295-329. doi:10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803
- Reynolds C.M., Kalb S.R., Cotter R.J., Raetz, C.R. (2005). A phosphoethanolamine transferase specific for the outer 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid residue of *Escherichia coli*

- lipopolysaccharide. Identification of the eptB gene and Ca²⁺ hypersensitivity of an eptB deletion mutant. *J. Biol. Chem.* 280, 21202-21211. doi:10.1074/jbc.M500964200
- Reynolds C.M., Ribeiro A.A., McGrath S.C., Cotter R.J., Raetz C.R., Trent M.S. (2006). An outer membrane enzyme encoded by *Salmonella typhimurium* lpxR that removes the 3'-acyloxyacyl moiety of lipid A. *J. Biol. Chem.* 281, 21974-21987. doi:10.1074/jbc.M603527200
- Roland K.L., Martin L.E., Esther C.R., Spitznagel J.K. (1993). Spontaneous pmrA mutants of *Salmonella typhimurium* LT2 define a new two-component regulatory system with a possible role in virulence. *J. Bacteriol.* 175, 4154-4164.
- Rozalski A., Sidorczyk Z., Kotelko K. (1997). Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 65-89.
- Rubin E.J., Herrera C.M., Crofts A.A., Trent M.S. (2015). PmrD is required for modifications to *Escherichia coli* endotoxin that promote antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 2051-2061. doi:10.1128/AAC.05052-14
- Samonis G., Korbila I.P., Maraki S., Michailidou I., Vardakas K.Z., Kofteridis D., Dimopoulou D., Gkogkozotou V.K., Falagas M.E. (2014). Trends of isolation of intrinsically resistant to colistin Enterobacteriaceae and association with colistin use in a tertiary hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol Infect. Dis.* 33, 1505-1510. doi:10.1007/s10096-014-2097-8
- Sampson T.R., Liu X., Schroeder M.R., Kraft C.S., Burd E.M., Weiss D.S. (2012). Rapid killing of *Acinetobacter baumannii* by polymyxins is mediated by a hydroxyl radical death pathway. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 5642-5649. doi:10.1128/AAC.00756-12
- Sassera D., Comandatore F., Gaibani P., D'Auria G., Mariconti M., Landini M.P., Sambri V., Marone P. (2014). Comparative genomics of closely related strains of *Klebsiella pneumoniae* reveals genes possibly involved in colistin resistance. *Ann. Microbiol.* 64, 887-890. doi:10.1007/s13213-013-0727-5
- Shen Z., Wang Y., Shen Y., Shen J., Wu C. (2016). Early emergence of mcr-1 in *Escherichia coli* from food-producing animals. *Lancet Infect. Dis.* 16, 293. doi:10.1016/S1473-3099(16)00061-X
- Sherman E.X., Hufnagel D.A., Weiss D.S. (2016). MCR-1 confers cross-resistance to lysozyme. *Lancet Infect. Dis.* 16, 1226-1227. doi:10.1016/S1473-3099(16)30395-4.
- Sidorczyk Z., Zahringer U., Rietschel E.T. (1983). Chemical structure of the lipid A component of the lipopolysaccharide from a *Proteus mirabilis* Re-mutant. *Eur. J. Biochem.* 137, 15-22. doi: 10.1111/j.1432-1033.1983.tb07789.x

- SIGMA. (2008). Lipopolysaccharides. *Glycobiology Analysis Manual*, 2nd Edition. <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/glycobiology/lipopolysaccharides.html>
- Snesrud E., He S., Chandler M., Dekker J.P., Hickman A.B., McGann P., Dyda F. (2016). A model for transposition of the colistin resistance gene *mcr-1* by IS*Apl1*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 6973-6976. doi:10.1128/AAC.01457-16
- Snitkin E.S., Zelazny A.M., Thomas P.J., Stock F., NISC Comparative Sequencing Program Group, Henderson D.K., Palmore T.N., Segre J.A. (2012). Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing. *Sci. Transl. Med.* 4, 148ra116. doi:10.1126/scitranslmed.3004129
- Srinivasan V.B., et Rajamohan G. (2013). KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 4449-4462. doi:10.1128/AAC.02284-12
- Stein A., et Raoult D. (2002). Colistin: an antimicrobial for the 21st century? *Clin. Infect. Dis.* 35, 901-902. doi:10.1086/342570
- Stojanoski V., Sankaran B., Prasad B.V., Poirel L., Nordmann P., Palzkill T. (2016). Structure of the catalytic domain of the colistin resistance enzyme MCR-1. *BMC Biol.* 14, 81. doi:10.1186/s12915-016-0303-0
- Suh J.Y., Son J.S., Chung D.R., Peck K.R., Ko K.S., Song J.H. (2010). Nonclonal emergence of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from blood samples in South Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 560-562. doi:10.1128/AAC.00762-09
- Sun S., Negrea A., Rhen M., Andersson, D.I. (2009). Genetic analysis of colistin resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2298-2305. doi:10.1128/AAC.01016-08
- Sutherland C.A., et Nicolau D.P. (2015). Susceptibility profile of ceftolozane/tazobactam and other parenteral antimicrobials against *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa* from U.S. hospitals. *Clin. Ther.* 37, 1564-1571. doi:10.1016/j.clinthera.2015.05.501
- Tamayo R., Choudhury B., Septer A., Merighi M., Carlson R., Gunn, J.S. (2005a). Identification of *cptA*, a *PmrA*-regulated locus required for phosphoethanolamine modification of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium lipopolysaccharide core. *J. Bacteriol.* 187, 3391-3399. doi:10.1128/JB.187.10.3391-3399.2005

- Tamayo R., Prouty A.M., Gunn, J.S. (2005b). Identification and functional analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium PmrA-regulated genes. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 43, 249-258. doi:10.1016/j.femsim.2004.08.007
- Tan T.Y., et Ng S.Y. (2006). The in-vitro activity of colistin in Gram-negative bacteria. *Singapore Med. J.* 47, 621-624.
- Thanh D.P., Tuyen H.T., Nguy T., Nguyen E.T., The H.C., Wick R.R., Thwaites G., Baker S., Holt K.E. (2016). Inducible colistin resistance via a disrupted plasmidborne *mcr-1* gene in a 2008 Vietnamese *Shigella sonnei* isolate. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2314-2317. doi:org/10.1093/jac/dkw173
- Theuretzbacher U. (2015). Recent FDA Antibiotic Approvals: Good News and Bad News. http://cddep.org/blog/posts/recent_fda_antibiotic_approvals_good_news_and_bad_news#sthash.y6q3VHz.dpbs
- Tijet N., Sheth P.M., Lastovetska O., Chung C., Patel S.N., Melano R.G. (2014). Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae in Ontario, Canada, 2008-2011. *PLoS One.* 9, e116421. doi:10.1371/journal.pone.0116421
- Tóth A., Damjanova I., Puskás E., Jánvári L., Farkas M., Dobák A., Böröcz K., Pászti J. (2010). Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 765-769. doi:10.1007/s10096-010-0921-3
- Touze T., Tran A.X., Hankins J.V., Mengin-Lecreulx D., Trent M.S. (2008). Periplasmic phosphorylation of lipid A is linked to the synthesis of undecaprenyl phosphate. *Mol. Microbiol.* 67, 264-277. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.06044.x
- Tran A.X., Lester M.E., Stead C.M., Raetz C.R., Maskell D.J., McGrath S.C., Cotter R.J., Trent M.S. (2005). Resistance to the antimicrobial peptide polymyxin requires myristoylation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* lipid A. *J. Biol. Chem.* 280, 28186-28194. doi: 10.1074/jbc.M505020200
- Trémolières F., Garraffo R., Lortholary O. (2005). Nécessité d'approches alternatives dans les stratégies d'évaluation des nouveaux antibiotiques antibactériens. *Med. Mal. Infect.* 35, S3: S229-S235.
- Trent M.S., Pabich W., Raetz C.R., Miller S.I. (2001a). A PhoP/PhoQ induced Lipase (PagL) that catalyzes 3-O-deacylation of lipid A precursors in membranes of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 276, 9083-9092. doi:10.1074/jbc.M010730200

- Trent M.S., Ribeiro A.A., Lin S., Cotter R.J., Raetz C.R. (2001b). An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *J. Biol. Chem.* 276, 43122-43131. doi: 10.1074/jbc.M106961200
- Vaara M., Vaara T., Jensen M., Helander I., Nurminen M., Rietschel E.T., Mäkelä P.H. (1981). Characterization of the lipopolysaccharide from the polymyxin-resistant pmrA mutants of *Salmonella typhimurium*. *FEBS Lett.* 129, 145-149. doi:10.1016/0014-5793(81)80777-6
- Vaara M., Vaara T., Sarvas M. (1979). Decreased binding of polymyxin by polymyxin-resistant mutants of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 139, 664-667.
- Velkov T., Deris Z.Z., Huang J.X., Azad M.A.K., Butler M., Sivanesan S., Kaminskas L.M., Dong Y.D., Boyd B., Baker M.A., Cooper M.A., Nation R.L., Li J. (2013a). Surface changes and polymyxin interactions with a resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Innate Immun.* 20, 350-363. doi:10.1177/1753425913 493337
- Velkov T., Soon R.L., Chong P.L., Huang J.X., Cooper M.A., Azad M.A., Baker M.A., Thompson P.E., Roberts K., Nation R.L., Clements A., Strugnell R.A., Li J. (2013b). Molecular basis for the increased polymyxin susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* strains with under-acylated lipid A. *Innate Immun.* 19, 265-277. doi:10.1177/1753425912459092
- Velkov T., Thompson P.E., Nation R.L., Li J. (2010). Structure - activity relationships of polymyxin antibiotics. *J. Med. Chem.* 53, 1898-1916.
- Vinogradov E., Lindner B., Seltmann G., Radziejewska-Lebrecht J., Holst, O. (2006). Lipopolysaccharides from *Serratia marcescens* possess one or two 4-amino-4-deoxy-L-arabinopyranose 1-phosphate residues in the lipid A and Dglycero-D-talo-oct-2-ulopyranosonic acid in the inner core region. *Chemistry.* 12, 6692-6700. doi:10.1002/chem.200600186
- Walkty A., DeCorby M., Nichol K., Karlowsky J.A., Hoban D.J., Zhanel G.G. (2009). In vitro activity of colistin (polymyxin E) against 3,480 isolates of Gram-negative bacilli obtained from patients in Canadian hospitals in the CANWARD study, 2007-2008. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4924-4926. doi:10.1128/AAC.00786-09
- Wang W.B., Chen I.C., Jiang S.S., Chen H.R., Hsu C.Y., Hsueh P.R., Hsu W.B., Liaw S.J. (2008). Role of RppA in the regulation of polymyxin b susceptibility, swarming, and virulence factor expression in *Proteus mirabilis*. *Infect. Immun.* 76, 2051-2062. doi:10.1128/IAI.01557-07

- Weiss J., Victor M., Cross A.S., Elsbach P. (1982). Sensitivity of K1-encapsulated *Escherichia coli* to killing by the bactericidal/permeability increasing protein of rabbit and human neutrophils. *Infect. Immun.* 38, 1149-1153.
- Weterings V., Zhou K., Rossen J.W., van Stenis D., Thewessen E., Kluytmans J., Veenemans J. (2015). An outbreak of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Netherlands (July to December 2013), with inter-institutional spread. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 1647-1655. doi:10.1007/s10096-015-2401-2
- Winfield M.D., et Groisman E.A. (2004). Phenotypic differences between *Salmonella* and *Escherichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 17162-17167. doi:10.1073/pnas.0406038101
- Wosten M.M., et Groisman E.A. (1999). Molecular characterization of the PmrA regulon. *J. Biol. Chem.* 274, 27185-27190. doi:10.1074/jbc.274.38.27185
- Xavier B.B., Lammens C., Ruhai R., Kumar-Singh S., Butaye P., Goossens H., Malhotra-Kumar S. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill.* 21, 30280. doi:10.2807/1560-7917.ES.21.27.30280
- Yan A., Guan Z., Raetz C.R. (2007). An undecaprenyl phosphateaminoarabinose flippase required for polymyxin resistance in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 282, 36077-36089. doi:10.1074/jbc.M706172200
- Yao X., Doi Y., Zeng L., Lv L., Liu J.H. (2016). Carbapenem-resistant and colistin-resistant *Escherichia coli* co-producing NDM-9 and MCR-1. *Lancet Infect. Dis.* 16, 288-289. doi:10.1016/S1473-3099(16)00057-8
- Yethon J.A., Gunn J.S., Ernst R.K., Miller S.I., Laroche L., Malo D., Whitfield C. (2000). *Salmonella enterica* serovar typhimurium waaP mutants show increased susceptibility to polymyxin and loss of virulence In vivo. *Infect. Immun.* 68, 4485-4491. doi:10.1128/IAI.68.8.4485-4491.2000
- Yin W., Li H., Shen Y., Liu Z., Wang S., Shen Z., Zhang R., Walsh T.R., Shen J., Wang Y. (2017). Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *MBio.* 8, pii: e00543-17. doi:10.1128/mBio.00543-17
- Yu Z., Qin W., Lin J., Fang S., Qiu J. (2015). Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. *Biomed. Res. Int.* 2015, 679109. doi:10.1155/2015/679109
- Zagorianou A., Sianou E., Iosifidis E., Dimou V., Protonotariou E., Miyakis S., Roilides E., Sofianou D. (2012). Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-

- producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010. *Euro Surveill.* 17, 20088.
- Zasowski E.J., Rybak J.M., Rybak M.J. (2015). The β -Lactams Strike Back: Ceftazidime-Avibactam. *Pharmacotherapy.* 35, 755-770. doi:10.1002/phar.1622.
- Zhong L.L., Zhang Y.F., Doi Y., Huang X., Zhang X.F., Zeng K.J., Shen C., Patil S., Xing Y., Zou Y., Tian G.B. (2017). Coproduction of MCR-1 and NDM-1 by colistin-resistant *Escherichia coli* isolated from a healthy individual. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e01962-16. doi:10.1128/AAC.01962-16
- Zhou Z., Ribeiro A.A., Lin S., Cotter R.J., Miller S.I., Raetz C.R. (2001). Lipid A modifications in polymyxin-resistant *Salmonella typhimurium*: PMRA-dependent 4-amino-4-deoxy-L-arabinose, and phosphoethanolamine incorporation. *J. Biol. Chem.* 276, 43111-43121. doi:10.1074/jbc.M106960200

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 26 février 2018

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**

présenté par : Raphaël DUVAL

Sujet : La lutte contre la résistance aux anti-infectieux :
Exemple des polymyxinesJury :

Président : Mme Francine PAULUS, MCF

Directeur : Mme Béatrice DEMORE, MCU-PH

Juges : Mme Chantal FINANCE, Doyen Honoraire
Mme Marion GRARE, MCU-PH

Vu,

Nancy, le 06 février 2018

Le Président du Jury

Directeur de Thèse



Mme PAULUS



Mme DEMORE

Vu et approuvé,

Nancy, le 9.02.2018

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Lorraine,
Francine PAULUS

Vu,

Nancy, le 22 FEV. 2018

Le Président de l'Université de Lorraine,


Pierre MUTZENHARDT

N° d'enregistrement : 10183

