



**Étude de la résistance aux B-lactamines chez
Streptococcus pneumoniae, Escherichia coli, Klebsiella
pneumoniae et Pseudomonas aeruginosa par des
approches omiques**

Thèse

Jessica El Khoury

Doctorat en microbiologie-immunologie
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada

© Jessica El Khoury, 2019



**Étude de la résistance aux β -lactamines chez
Streptococcus pneumoniae, *Escherichia coli*,
Klebsiella pneumoniae et *Pseudomonas aeruginosa*
par des approches omiques**

Thèse

Jessica El Khoury

Doctorat en Microbiologie-Immunologie
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Sous la direction de :

Marc Ouellette, directeur de recherche

Québec, Canada

© Jessica El Khoury, 2019

Résumé

La résistance croissante et alarmante aux antimicrobiens chez de nombreuses bactéries pathogènes humaines telles que *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* représente un problème majeur de santé publique. Ce problème est aggravé par l'apparition de souches multirésistantes et par le nombre limité d'antibiotiques en développement. Il devient donc impératif de s'affairer à protéger l'efficacité des molécules disponibles. Par ailleurs, une meilleure compréhension du mode d'action des antibiotiques et de la réponse induite par ceux-ci pourrait être bénéfique pour identifier de nouvelles cibles bactériennes pour le développement d'adjuvants chimio-thérapeutiques.

Notre étude de la réponse transcriptomique par la technique d'ARN-Seq de trois souches de *S. pneumoniae* sensibles à la pénicilline (PEN) a montré un nouveau lien entre le métabolisme de la glutamine et la sensibilité à la PEN. En effet, les gènes des opérons *glnRA* et *glnPQ* impliqués dans la synthèse et l'absorption de la glutamine étaient parmi les gènes les plus sous-exprimés chez les trois souches traitées avec la PEN. Nous avons aussi détecté une augmentation des concentrations intracellulaires de la glutamine à la suite du traitement à la PEN. En outre, l'inhibition chimique de la glutamine synthétase codée par *glnA* sensibilise *S. pneumoniae* à la PEN, et ceci a aussi été observé chez des isolats cliniques résistants à la PEN. En résumé, une combinaison d'études transcriptomique et métabolomique a démontré que la PEN interfère avec le métabolisme de la glutamine, suggérant des stratégies qui pourraient être exploitées en bithérapie.

Chez les bactéries à Gram négatif, la résistance aux carbapénèmes devient de plus en plus menaçante pour la santé mondiale. L'efficacité de l'imipénème (IMP) diminue avec l'apparition de la résistance. Notre criblage chimio-génomique chez *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* a mis en évidence des réponses communes et spécifiques à l'IMP à chaque espèce. Une analyse comparative de 145 mutants a montré que les gènes les plus mutés codaient pour des protéines impliquées dans la biogenèse de la membrane et de l'enveloppe cellulaires, la transcription et la transduction de signal.

Nos résultats ont montré que le gène *rpoD* codant pour un facteur sigma d'ARN polymérase était muté chez les trois espèces et le rôle de ce gène dans la résistance a été validé expérimentalement chez *E. coli*. En outre, de nombreux gènes codant pour des amidases, transférases et transglycosidases ont conféré un faible niveau de résistance aux entérobactéries, alors que les mutations d'OprD étaient fréquentes chez *P. aeruginosa*, mais divers systèmes de transduction de signal à deux composants étaient également susceptibles d'être impliqués dans la résistance à l'IMP. De façon intéressante, certains gènes identifiés tels que *rpoD*, *slt* codant pour une transglycosylase lytique, ainsi que les histidines kinases sont déjà envisagés comme des cibles thérapeutiques prometteuses.

Finalement, cette étude a confirmé le pouvoir de diverses approches omiques quant à la compréhension des modes d'action des antibiotiques et à la prédiction des mécanismes de résistance développés contre eux. Ceci nous permettra de mettre en place des stratégies pour protéger l'efficacité des antibiotiques actuellement utilisés mais aussi celle de nouvelles molécules développées.

Table des matières

Résumé.....	ii
Table des matières	iv
Liste des figures	vii
Liste des abréviations et des sigles	viii
Remerciements.....	xi
Avant-propos.....	xv
Introduction – Le remède miracle « The Magic Bullet ».....	1
Chapitre 1 – Quatre bactéries pathogènes prioritaires.....	7
1.1. Bactéries à Gram négatif ou positif.....	7
1.2. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	8
1.2.1. Bactériologie et identification	8
1.2.2. Infections et épidémiologie	9
1.2.3. Génome et virulence.....	10
1.2.4. Vaccins.....	11
1.3. <i>Escherichia coli</i>	13
1.3.1. Bactériologie et identification	13
1.3.2. Génome, virulence et pathogénicité	13
1.3.3. Épidémiologie	15
1.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
1.4.1. Bactériologie et identification	15
1.4.2. Génome, virulence et pathogénicité	16
1.4.3. Épidémiologie	17
1.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
1.5.1. Bactériologie et identification	18
1.5.2. Génome, virulence et pathogénicité	19
1.5.3. Épidémiologie	21
Chapitre 2 - Les antibiotiques : classification et modes d'action.....	22
2.1. Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne.....	23
2.2. Déstabilisation de la structure des membranes.....	24
2.3. Inhibition de la réplication de l'ADN.....	24
2.4. Inhibition de la transcription de l'ARN.....	25
2.5. Inhibition de la synthèse protéique	25
2.6. Blocage des voies métaboliques.....	27
2.7. Production (ou pas) de dérivés réactifs de l'oxygène.....	27
Chapitre 3 - Les antibiotiques : mécanismes de résistance.....	30
3.1. La résistance intrinsèque.....	30
3.2. La résistance acquise	31

3.2.1.	Stratégies génétiques	31
3.2.2.	Stratégies moléculaires.....	34
3.3.	La résistance adaptative	42
Chapitre 4 - La classe des β-lactamines : gagnante ou vaincue ?.....		43
4.1.	Le peptidoglycane	44
4.1.1.	Structure et composition.....	44
4.1.2.	Synthèse du peptidoglycane	44
4.1.3.	Hydrolyse du peptidoglycane	48
4.1.4.	Recyclage du peptidoglycane	52
4.2.	Le mode d'action des β-lactamines.....	54
4.2.1.	Les β -lactamines et leurs cibles primaires	54
4.2.2.	Une mort cellulaire lytique	56
4.2.3.	Une mort cellulaire non-lytique	56
4.2.4.	L'induction de la réponse SOS par les β -lactamines	57
4.3.	Les mécanismes de résistance à la pénicilline chez <i>S. pneumoniae</i>	58
4.3.1.	Altérations des PLPs	58
4.3.2.	Divers mécanismes.....	58
4.4.	Les mécanismes de résistance aux carbapénèmes chez les bactéries à Gram négatif.....	60
4.4.1.	Destruction de l'antibiotique par les β -lactamases	60
4.4.2.	OprD et imipénème chez <i>P. aeruginosa</i>	65
4.4.3.	Combinaison de plusieurs mutations chez <i>E. coli</i>	66
Chapitre 5 - Les approches « omiques » et la résistance.....		68
5.1.	Le séquençage de génome de la première génération.....	70
5.2.	Le séquençage de la nouvelle génération	71
5.2.1.	Le séquençage d'Illumina	72
5.2.2.	Le séquençage d'ARN à haut débit « ARN-Seq »	74
5.3.	Métabolomique.....	78
5.3.1.	La régulation métabolique de la résistance aux antibiotiques	78
5.3.2.	Étude du métabolome.....	79
5.4.	La mutagenèse chimique couplée au SNG : « Mut-Seq »	80
5.4.1.	Taux et types de mutations chez les bactéries	81
5.4.2.	Les agents mutagènes	82
5.4.3.	Analyse des données de « Mut-Seq »	83
Chapitre 6 – Problématique, hypothèses et objectifs		86
6.1.	Problématique	86
6.2.	Hypothèses	86
6.3.	Objectifs	88
Chapitre 7 - La pénicilline induit des altérations du métabolisme de la glutamine chez <i>Streptococcus pneumoniae</i>		89
7.1.	Résumé	89
7.2.	Abstract.....	90

7.3. Article.....	91
Chapitre 8 – Criblage chimiogénomique de la résistance à l'imipénème chez des bactéries à Gram négatif.....	136
8.1. Résumé.....	136
8.2. Abstract.....	137
8.3. Article.....	138
Chapitre 9 – Discussion générale	182
9.1. Réponse transcriptomique de <i>S. pneumoniae</i> à la pénicilline	182
9.1.1. La pénicilline et le métabolisme de la glutamine	183
9.1.2. La pénicilline et le système à deux composants CiaRH	186
9.1.3. Perspectives.....	188
9.2. Étude de la résistance à l'imipénème par Mut-Seq chez trois bactéries à Gram négatif.....	189
9.2.1. Réponses communes aux trois espèces	190
9.2.2. Un lien entre certains gènes mutés et la division cellulaire	192
9.2.2. La résistance à l'imipénème et les systèmes à deux composants	195
9.2.3. Perspectives.....	196
Conclusion	200
Bibliographies	202
Annexes.....	224

Liste des figures

Figure 1. Structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif et des bactéries à Gram positif	8
Figure 2. Progression de la maladie à pneumocoque	10
Figure 3. Les facteurs de virulence de <i>S. pneumoniae</i>.....	11
Figure 4. Les cibles des antibiotiques.....	23
Figure 5. Mécanisme commun de mort cellulaire induite par les antibiotiques bactéricides.....	29
Figure 6. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques	35
Figure 7. Résumé des étapes sélectionnées de la biosynthèse et le recyclage de la paroi cellulaire chez <i>E. coli</i>	53
Figure 8. Structures de la pénicilline, la D-Ala-D-Ala et l'imipénème monohydrate ..	55
Figure 9. Le processus général du séquençage de la nouvelle génération d'Illumina..	74
Figure 10. Les principales étapes de la préparation des bibliothèques pour l'ARN-Seq	77
Figure 11. Mutagenèse par méthanesulfonate d'éthyle.....	83
Figure 12. Le régulon GlnR de <i>S. pneumoniae</i>	184
Figure 13. Schéma de la réaction d'amidation du lipid II par MurT/GatD	185
Figure 14. Pourcentage des mutations appartenant aux catégories fonctionnelles les plus récurrentes des COGs chez <i>E. coli</i>, <i>K. pneumoniae</i> et <i>P. aeruginosa</i>	190
Figure 15. L'effet du traitement à l'imipénème sur la croissance d'<i>E. coli</i> ATCC 25922 WT et des mutants ayant des mutations dans Slt (R475*) ou YceG (Q92*).....	194

Liste des abréviations et des sigles

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARN-Seq	Séquençage de l'acide ribonucléique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
BLSE	β -Lactamases à Spectre Étendu
Cas9	de l'anglais « CRISPR associated protein 9 »
CDC	de l'anglais « Centers for Disease Control »
CHL	Chloramphénicol
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CRE	de l'anglais « Carbapenem-Resistant <i>Enterobacteriaceae</i> »
CRISPR	de l'anglais « Clustered Regularly Interspersed Palindromic Repeats »
D-Glu	acide D-glutamique
DHF	Dihydrofolate
DHFR	Dihydrofolate Réductase
DHPS	Dihydroptéroate Synthase
D-iGln	D-isoglutamine
dNTPs	désoxyribonucléotides triphosphates
DRO	Dérivés Réactifs de l'Oxygène
EAEC	de l'anglais « Enteroaggregative <i>E. coli</i> »
EC	Électrophorèse Capillaire
EHEC	de l'anglais « Enterohaemorrhagic <i>E. coli</i> »
EMS	de l'anglais « Ethyl Methane Sulfonate »
ETEC	de l'anglais « Enterotoxigenic <i>E. coli</i> »
ÉUs	États-Unis
FQ	Fluoroquinolones
GATK	de l'anglais « Genome Analysis Tool Kit »
IATS	de l'anglais « International Antigenic Typing Scheme »
IMP	Imipénème
InDels	Insertions-Deletions
Kan	Kanamycine
Kb	Kilobases
KPC	<i>K. pneumoniae</i> Carbapénémase
L-Ala	L-alanine
LC-MS	de l'anglais « Liquid Chromatography-Mass Spectrometry »
L-Lys	L-Lysine
LPS	Lipopolysaccharide
LTs	de l'anglais « Lytic Transglycosylases »
Mb	Megabase
MBLs	Métallo- β -Lactamases
m-DAP	acide méso-diaminopimélique
MSO	L-Méthionine Sulfoximine

NAG	<i>N</i> -acétylglucosamine
NAM	acide <i>N</i> -acétylmuramique
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PABA	de l'anglais « Para-AminoBenzoic Acid »
PAC	Pneumonies Acquises en Communauté
PAH	Pneumonies Acquises en milieu Hospitalier
PAV	Pneumonies Associées aux Ventilateurs
PCR	de l'anglais « Polymerase Chain Reaction »
PEN	Pénicilline
PG	Peptidoglycane
PLP	Protéines de Liaison à la Pénicilline
qRT-PCR	de l'anglais « Quantitative real-time PCR »
QS	de l'anglais « Quorum Sensing »
R&D	Recherche et Développement
RPKM	de l'anglais « Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads »
SI	Système Immunitaire
SMX	Sulfaméthoxazole
SNG	Séquençage de Nouvelle Génération
SNV	de l'anglais « Single Nucleotide Variant »
STEC	de l'anglais « Shiga toxin-producing <i>E. coli</i> »
TG	Transglycosylase
THF	Tétrahydrofolate
TMP	Triméthoprim
TP	Transpeptidase
WGS	de l'anglais « Whole Genome Sequencing »

La Vie (ou la Thèse)

La vie est une chance, saisis-la

La vie est un rêve, fais-en une réalité

La vie est un défi, fais-lui face

La vie est un devoir, accomplis-le

La vie est un jeu, joue-le

La vie est précieuse, prends-en soin

La vie est amour, jouis-en

La vie est mystère, perce-le

La vie est promesse, remplis-la

La vie est tristesse, surmonte-la

La vie est combat, accepte-le

La vie est une aventure, ose-la

La vie est bonheur, mérite-le

La vie est la vie, défends-la

Extrait de « La vie » - Mère Teresa (1910 – 1997)

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse le Dr Marc Ouellette d'avoir cru en moi et de m'avoir offert l'opportunité de préparer ma thèse au sein de son laboratoire. Au niveau professionnel, j'aimerais vous remercier Dr Ouellette de l'autonomie que vous m'avez accordé et également de vos conseils afin de mener à bien cette thèse. Au niveau personnel, je vous remercie de votre confiance, votre ouverture d'esprit et de vouloir accepter que je travaille à temps partiel au cours de ma thèse comme interprète pour les réfugiés.

J'aimerais également remercier le Dr Phillippe Leprohon de sa grande disponibilité et de m'avoir initiée à la bio-informatique, ainsi que des échanges scientifiques et de son encadrement au début de ma thèse.

Je voudrais exprimer mes vifs remerciements aux membres du jury de ma thèse, le Dr Yves Brun de l'Université de Montréal, ainsi que le Dr Paul H. Roy et le Dr Jacques Corbeil de l'Université Laval d'avoir accepté d'évaluer mon travail, ce fut un grand honneur pour moi. J'aimerais également remercier la Dre Caroline Gilbert, directrice du programme de « Microbiologie-Immunologie » qui tient à s'assurer que les étudiants du programme soient très bien formés. J'adresse aussi mes remerciements aux membres du jury de mon examen pré-doctoral, le Dr. Paul Naccache et le Dr. Adnane Sallam. Finalement, je remercie tous les agents administratifs du Centre de Recherche en Infectiologie et de l'Université Laval qui facilitent nos procédures administratives depuis notre demande de candidature jusqu'à l'obtention de notre diplôme.

Je tiens à remercier le Dr. Michel G. Bergeron de sa passion pour la science qui transparaît à travers son désir de transmettre ses connaissances. Je remercie également les membres de son équipe, plus particulièrement Ève Bérubé et Dominique Boudreau de m'avoir fourni les souches dont j'avais besoin pour mes projets.

Je remercie Nancy Boucher pour la réalisation de l'expérience de la LC-MS et Pier-Luc Plante de ses conseils utiles. Je voudrais remercier également la Dre Isabelle Vincent

de ses conseils sur le protocole d'extraction des métabolites. Je remercie aussi Alexandra Maure que j'ai co-encadrée pendant son stage au sein de notre équipe. Elle était très organisée et elle a très bien initié le projet Mut-Seq.

Ces dernières années étaient chargées de défis, d'émotions et surtout de très belles rencontres. L'aventure a commencé dans mon cher pays le Liban, elle a été de plus en plus enrichie par mon passage de deux ans en France, et elle a poursuivi à Québec au Canada.

Je remercie mes professeurs de l'Université Libanaise, plus particulièrement, le Dr Wissam Medawar et la Dre Majida Jalbout. Je remercie Sara Ammar, ma directrice dans la compagnie pharmaceutique « BPI » où j'ai travaillé comme déléguée médicale au Liban ; son soutien était l'une des clés de ma réussite professionnelle, et l'opportunité qu'elle m'a offert d'accepter que je poursuive mes études tout en continuant à travailler dans son équipe a été sans doute un moment décisif pour ma carrière et mon parcours.

Je voudrais remercier le Dr. Attilio Di Pietro pour m'avoir accueillie au sein de son équipe durant mon stage de Master 2 à Lyon et de m'avoir recommandée auprès du Dr Marc Ouellette. Mon court passage de 6 mois dans le département de R&D au sein d'IMACCESS (Institut Mérieux) était très enrichissant. Je remercie Magalie Bontoux qui m'a aussi aidée à développer des compétences techniques à l'époque.

L'équipe MOU, quelle belle équipe, même s'il y a eu beaucoup de départs et d'arrivées, la belle ambiance était toujours présente. Je désire sincèrement remercier chacun des membres de l'équipe passés et présents. Suzanne Avoine (ou maman Avoine), toujours disponible pour bien gérer les commandes et de s'assurer que le budget est bien maintenu, ce qui sans doute nous fait avancer dans nos projets. Maman Avoine se préoccupait aussi toujours de notre bien-être mental et physique. Hélène Gingras (Gingrita), une vraie machine qui ne s'arrête jamais, une amie formidable qui était aussi ma personne-ressource au niveau technique, une personne généreuse qui veut que tout le monde soit heureux, merci infiniment pour tous les moments qu'on a passés ensemble au labo et en dehors du travail. Dre Marie Plourde (ma grande sœur Québécoise), je me considère très chanceuse de

t'avoir connue, ta forte volonté à combattre la maladie restera à jamais gravée dans ma mémoire ; malgré ton dur combat, tu tenais à prendre de mes nouvelles et à m'encourager durant ma thèse, *Que ton âme repose en paix*. Gaetan Roy, un des piliers du labo, ton sens de l'humour va me manquer, bonne chance pour la suite. Dre Andrienne Lupien, ta présence au début de ma thèse était très importante, on a eu beaucoup d'échanges scientifiques et on a également créé un très bon lien amical. Jade-Eva Potvin (la vieille Egyptienne), la princesse (au bois dormant) du labo, ta danse de joie va me manquer. Dr Christopher Fernandez Prada (mi primo), on a tellement ri ensemble, je te remercie pour les échanges scientifiques et ton amitié, ainsi que celle d'Aida. Dr Kévin Patron (Keviiiiin), on a partagé des moments inoubliables, on était un soutien l'un pour l'autre à tous les niveaux, nos voyages au Canada et aux ÉUs sont un des plus beaux souvenirs de ma vie « icite ». Flora P. Fiorente (FloFlo), merci pour ta bonne humeur contagieuse et surtout d'avoir pris le relais pour la préparation des albums et la photo du calendrier. Marine Queffeuou (l'enfant) merci pour ton optimisme, Sophia Bigot merci d'avoir supporté Clem (lol), Dre Ana-Maria Mejia-Jaramillo et Mathilde C. Flahaut (la plus jeune) merci de votre gentillesse.

J'aimerais également remercier plusieurs personnes du CRI, le Dr Dave Richard de ses conseils pertinents et nos échanges culturels, Dominic Gagnon et sa femme pour les soirées du Nouvel An, Natalia (loca loca) t'étais la meilleure colloc, Éliel Brochu (mon voisin de cub), la Dre Rana Daher, Carole Dumas, la Dre Ouafa Zghidi-Abouزيد, le groupe d'étudiants des « cub », Malika, Joan (capricorne), Karima, Anais, Jehane, Bruno, Olus et Marie-Claude pour les belles soirées/sorties de défoulement. Enfin, Clément (Dr Fage) qui avait besoin de me rappeler tous les jours que je suis Libanaise, merci pour ton amitié fréro.

Please allow me to switch to English for my Indian friends, Dr Arijit Bhattacharya (President), you have always made me laugh « honey », your presence in the lab meant a lot to me on both a professional and personal level, especially while I was working late at night or during the weekend, I never felt alone. You were ALWAYS there. Dr Mansi Sharma, we share a lot in common, especially as expatriates, thank you for your friendship

and support. I would also like to thank Dr Angana Mukherjee and Dr Prasad Padmanabhan for the scientific and professional interaction we had during the last year of my thesis.

Je remercie également mes amis de Québec en dehors du labo, Nahla, Antoine, Noura et Xavier, vous étiez toujours présents durant mes premières années à QC, Alma, Clémence et Sébastien, merci pour tous les moments qu'on a partagés ensemble et pour votre amitié. Un énorme merci à Élvire et Elias, les amis de mes parents à Montréal, ils m'ont traitée comme leur propre fille et ont rendu les périodes des fêtes (Noël et Pâques) beaucoup plus agréables, j'ai vraiment été gâtée chez eux.

Un simple merci ne sera jamais suffisant pour exprimer mes sentiments à ma famille et mes ami(e)s qui malgré la distance je peux toujours compter sur leur soutien moral.

Je remercie d'abord mes amis de Lyon, Kika, Mayouss, Majdy et Lauriane. Mes amis du Liban, Mira M., Hazar, Rita G., Georges (« party ») et Leina (« frankfurter ») pour vos messages d'encouragement et d'avoir toujours cru en moi. Meg (« coffee mate »), toujours présente, une amie sur qui je peux toujours compter, prête à faire un Skype (pour un soutien moral), même s'il est déjà minuit au Liban. Je remercie mes cousines Mira, Lara et Carole, je vous aime beaucoupuuuup.

Mes points faibles, mes deux sœurs, je vous aime infiniment, la distance n'a fait que nous rapprocher encore plus. Paty, le symbole de la tendresse, merci pour ton amour et pour avoir mis au monde « Gio » la source de joie de la famille, je t'aime habibi. Gazo, le symbole de l'ambition, on se parle tous les jours, on est, et on sera toujours présentes l'une pour l'autre.

Finalement, mes parents, Jeanne D'Arc (Jano) et Youssef (Zouzou), le symbole de l'amour inconditionnel, je vous aime très très foouoort, merci pour tous les sacrifices que vous avez faits et que vous continuez de faire pour nous, merci de nous avoir laissées poursuivre nos rêves, même s'ils nous mènent à l'autre bout du monde...

Avant-propos

Le manuscrit présenté au chapitre 7 et intitulé « Penicillin induces alterations in glutamine metabolism in *Streptococcus pneumoniae* » a été publié dans le journal Scientific Reports le 6 novembre 2017. J'ai effectué la sélection des souches cliniques de la banque de souches de l'équipe du Dr. Michel G. Bergeron, l'optimisation des conditions du traitement des différentes souches à la pénicilline (PEN), l'extraction de l'ARN et la préparation des bibliothèques de séquençage, l'analyse bio-informatique des données de l'ARN-Seq et la validation de l'expression des gènes d'intérêt par qRT-PCR, les expériences concernant l'effet de l'addition de la glutamine dans le milieu sur la survie des bactéries traitées par la PEN ainsi que l'effet de l'inhibition de la GlnA par le L-méthionine sulfoximine sur la CMI de la PEN. J'ai optimisé et effectué le protocole d'extraction des métabolites pour l'analyse de la LC-MS qui a été faite par Nancy Boucher. Enfin, j'ai rédigé le manuscrit. Philippe Leprohon a contribué au design expérimental, m'a guidé pour les analyses bioinformatiques et il a révisé le manuscrit. Marc Ouellette a supervisé le projet et révisé le manuscrit.

Le manuscrit présenté au chapitre 8 et intitulé « Chemogenomic screen for imipenem resistance in Gram negative bacteria » sera soumis sous peu pour la publication. J'ai effectué la sélection des mutants de *Pseudomonas aeruginosa* et Alexandra Maure a sélectionné les mutants d'*Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*. Nous avons testé la CMI d'imipénème (IMP) de tous les mutants et extrait les ADNs. J'ai préparé les bibliothèques et analysé les données de séquençage. J'ai ensuite réalisé les validations fonctionnelles, généré tous les « knock-in », testé leur susceptibilité à l'IMP et leur croissance sur gélose et en milieu liquide s'il y a eu lieu. Enfin, j'ai rédigé le manuscrit. Hélène Gingras a confirmé les CMI d'IMP des 145 mutants et a participé au design expérimental de la sélection des mutants par mutagenèse chimique et des « knock-in ». Philippe Leprohon a fourni le pipeline des analyses bio-informatiques et m'a appris à faire les analyses, il a aussi révisé le manuscrit. Marc Ouellette a supervisé le projet et révisé le manuscrit. Il est à noter que la grande taille des tableaux supplémentaires (S2 à S7) ne nous permet pas de les inclure dans un fichier word, ainsi ils seront fournis en annexe dans des fichiers excels.

Introduction – Le remède miracle « The Magic Bullet »

« Le commencement de toute science, c'est l'étonnement de ce que les choses sont ce qu'elles sont »

Aristote (384 av. J.-C. - 322 av. J.-C.)

A l'époque précédant l'introduction des antibiotiques actuellement disponibles, les infections mortelles existaient indubitablement et certaines personnes les survivaient grâce à l'efficacité de la réponse immunitaire innée. Cependant, il est juste de dire que les taux de mortalité dues aux maladies infectieuses étaient amplement plus élevés qu'ils ne sont aujourd'hui. En effet, les anciennes civilisations utilisaient une variété de traitements naturellement disponibles contre les infections, par exemple des herbes, du miel et même des excréments d'animaux (1, 2). Les anciennes civilisations en Egypte, Chine, Serbie, Grèce et Rome appliquaient topiquement la moisissure du pain sur les blessures pour prévenir les infections (3). Même des antibiotiques plus modernes peuvent avoir été disponibles dans les temps anciens. Des traces de tétracyclines ont été détectées dans des squelettes humains excavés en Nubie au Soudan (4).

La possibilité de l'existence de microorganismes a été discutée pendant plusieurs siècles avant leur découverte réelle au 17^{ème} siècle. Les travaux de plusieurs scientifiques ont abouti à une meilleure compréhension de ce monde invisible. Nous citons quelques étapes remarquables dans l'histoire de la microbiologie. D'abord, l'existence d'organismes microscopiques a été découverte entre 1665 et 1683 par Robert Hooke et Antoni van Leeuwenhoek. En 1665, Hooke a présenté dans son ouvrage « *Micrographia* », la première description publiée d'un micro-organisme, le microfungus *Mucor* (5). Plus tard, Leeuwenhoek a observé et décrit des bactéries et des protozoaires microscopiques, il les nomma d'abord « animalcules » (6). Ces révélations importantes ont été rendues possibles par l'ingéniosité de Hooke et Leeuwenhoek dans la fabrication et l'utilisation de microscopes simples permettant de grossir des objets d'environ 25 à 250 fois (5). À la fin des années 1800, Robert Koch et Louis Pasteur ont été capables d'établir l'association entre différentes espèces de bactéries et les maladies par propagation sur des milieux artificiels et chez des animaux (7, 8). La propagation de la gonorrhée et de la syphilis a incité à l'essai de certains traitements comme l'administration, à l'aide des seringues, de métaux lourds tels

que l'arsenic, le bismuth et le mercure mais cela était accompagné d'effets secondaires souvent plus graves que la maladie (3). Rudolf Emmerich et Oscar Loew ont découvert que la bactérie verte (*Pseudomonas aeruginosa*) isolée des bandages des patients blessés inhibait la croissance d'autres microbes. Ils ont cultivé l'organisme par lots et ont utilisé le surnageant comme médicament. Ainsi, la pyocyanase était le premier antibiotique utilisé dans les hôpitaux. Malheureusement, le médicament a été abandonné car son efficacité était sporadique et s'est avéré toxique pour l'homme (9).

L'ère moderne de la chimiothérapie antimicrobienne a vraiment commencé quand Paul Ehrlich a commencé à travailler sur les effets antibactériens des colorants. En 1909, avec son équipe, il a développé le concept du remède miracle ou « The magic bullet », qui consiste à utiliser un produit chimique qui tue d'une manière ciblée les microbes ou les cellules tumorales. L'aboutissement de ce travail était l'arsphénamine (Salvarsan), le premier traitement efficace contre la syphilis et a probablement été le premier agent antimicrobien moderne, même s'il ne s'agissait pas d'un antibiotique au sens strict du terme (10). Après l'arsphénamine, le sulfamidochrysoïdine (Prontosil), un sulfonamide synthétisé par les chimistes du laboratoire Bayer, Josef Klarer et Fritz Mietzsch et testé en 1932 par Gerhard Domagk, fut le deuxième antimicrobien qui a révolutionné la médecine (11).

En 1928, Alexander Fleming remarqua que la croissance des colonies de staphylocoques se développant près d'une colonie de moisissures contaminantes était interrompue. L'année suivante, il a publié un article décrivant la moisissure comme étant *Penicillium notatum* et désignant le composé actif la pénicilline (PEN) (12). Bien que, entre 1870 et 1897, plusieurs chercheurs aient déjà décrits les effets antibactériens de la *Penicillium glaucium* et la *Penicillium notatum* (3), c'était la formidable persistance de Fleming et sa croyance en l'idée qui a fait la différence. Pendant 12 ans après sa première observation, Fleming essayait d'intéresser les chimistes à la résolution des problèmes liés à la purification et la stabilité de la substance active et a fourni la souche *Penicillium* à toute personne qui en faisait la demande (11). Heureusement, dans la même année, en 1940, quand il a finalement abandonné l'idée, une équipe à Oxford dirigée par Howard Florey et Ernest Chain a publié un papier décrivant la purification des quantités de la PEN suffisantes

pour les essais cliniques (13). Leur protocole éventuellement a conduit à la production et à la distribution en masse de la PEN en 1945 (11).

L'introduction en pratique clinique des sulfonamides, la PEN et la streptomycine corrélait avec une baisse des taux de mortalité due aux maladies infectieuses. Par exemple, de 1938 à 1952, ce taux était en baisse rapide aux États-Unis (ÉUs), de 8,2% par an (14). Ainsi, d'autres chercheurs ont emprunté cette voie, ce qui a entraîné la création de plusieurs nouveaux antibiotiques, dont certains ont été utilisés en clinique. La période entre les années 1950 et 1970 était en effet l'âge d'or de la découverte de nouvelles classes d'antibiotiques (11).

Les premiers antibiotiques représentaient des produits des voies métaboliques de bactéries du sol (*p. ex.*, *Streptomyces* et *Bacillus*) ou de champignons (*p. ex.*, *Penicillium*, *Cephalosporium* et *Pleurotus*). L'élucidation de leur structure chimique, qui suivait généralement peu de temps après leur détection, a permis non seulement de les produire de manière synthétique en plus grandes quantités à des moindres coûts, mais aussi d'introduire des modifications changeant les propriétés pharmacologiques de ces agents et parfois aussi d'élargir leur spectre d'activité (15).

L'origine de la résistance bactérienne aux agents antimicrobiens se situe bien avant l'utilisation clinique de ces substances, les bactéries productrices d'antimicrobiens développaient des mécanismes pour contourner les effets inhibiteurs de ces agents. Cependant, la pression sélective accrue imposée par l'utilisation répandue des antibiotiques depuis les années 1950 a nettement accéléré le développement et la propagation de la résistance bactérienne aux agents antimicrobiens (15, 16). D'ailleurs, Fleming était parmi les premiers à mettre en garde contre la résistance potentielle à la PEN si elle est utilisée pour une trop courte durée pendant le traitement (11).

Nous sommes actuellement confrontés à une crise mondiale des antibiotiques en raison de la résistance croissante et alarmante aux antimicrobiens chez de nombreux agents pathogènes humains. En Europe et aux ÉUs, le taux de mortalité due aux infections résistantes aux antimicrobiens est au moins de 50 000 cas chaque année, toutefois plusieurs centaines de milliers d'autres décèdent dans d'autres régions du monde (11). Si aucune

action immédiate n'est entreprise, la valeur estimée du bilan des décès dus à la résistance aux antimicrobiens atteindra les 10 millions d'ici 2050, dépassant ainsi le taux de mortalité, par exemple, du cancer (17) . Les accomplissements en médecine moderne, telles que les chirurgies, la transplantation d'organe, le traitement du bébé prématuré et la chimiothérapie anticancéreuse, que nous prenons aujourd'hui pour acquis, ne serait pas possible sans un traitement efficace contre les infections bactériennes (18). Néanmoins, le problème de la résistance ne se limite certainement pas à la microbiologie clinique. C'est plutôt un problème complexe nécessitant une concertation entre les microbiologistes, les écologistes, les spécialistes des soins de santé, les éducateurs, les organes des pouvoirs législatifs, les agriculteurs, l'industrie pharmaceutique ainsi que les personnes à traiter. En fait, cela devrait préoccuper tout le monde, car au final, il y a toujours une probabilité pour l'un de nous à un moment donné d'être infecté par un agent pathogène résistant aux antibiotiques (11, 19). Le concept de l'approche multisectorielle « Un monde, une santé » reconnaît que la santé des personnes est liée à la santé des animaux et de l'environnement, cette approche est adoptée par plusieurs organismes mondiaux comme l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les centres pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC), l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) et l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) (19). Des campagnes de sensibilisation aux bons usages des antibiotiques se sont avérées utiles mais cela n'élimine pas le besoin du développement d'un nouveau traitement car la résistance est inévitable (16). Ainsi, en 2013, le CDC a publié un rapport sur les menaces induites par la résistance aux antibiotiques aux États-Unis (20), suivi par le rapport de surveillance de la résistance aux antimicrobiens par l'OMS en 2014 (17) et l'évaluation des menaces dues à cette résistance au Canada publiée en 2015 par l'Agence de la santé publique du Canada (21). Ces rapports étaient axés sur les priorités nationales en matière de santé publique afin d'accroître la sensibilisation des scientifiques, des politiques et du public sans inclure des critères spécifiques en matière de recherche et développement (R&D). En 2017 et afin de compléter ce besoin, l'OMS a établi une liste de pathogènes prioritaires pour aider à hiérarchiser les priorités dans le domaine de R&D de nouveaux traitements antimicrobiens efficaces contre les bactéries résistantes (22).

La recherche de nouveaux antibiotiques ou de nouvelles cibles cellulaires essentielles à la survie des agents pathogènes est ainsi impérative. Le taux de réussite dans la découverte de nouveaux antibiotiques en utilisant des approches conventionnelles est limité. En effet, seules deux nouvelles classes d'antibiotiques (oxazolidinone et lipopeptides) sont parvenues à la clinique au cours des 50 dernières années (23). De ce fait, de nombreuses nouvelles stratégies ont été considérées afin de lutter contre la résistance aux antimicrobiens. Certaines de ces stratégies incluent la conception des médicaments en se basant sur des données de la structure de la cible, l'approche génomique, la stratégie anti-virulence, le ciblage des bactéries dites persistentes et la phagothérapie (23).

En attendant la concrétisation de nouveaux traitements, il est impératif de maintenir l'efficacité clinique des molécules disponibles, de contrôler leur utilisation et par conséquent leur longévité. Les approches « Omiques », telles que la génomique, transcriptomique, protéomique et métabolomique se sont avérées utiles pour comprendre d'une façon fondamentale les conséquences du traitement aux antibiotiques. Subséquemment, ceci nous mène à mieux élucider le mode d'action des antimicrobiens et les mécanismes de résistance développés par les bactéries à la suite des traitements.

Au cours de cette thèse, nous avons choisi de nous concentrer sur l'étude de la résistance aux β -lactamines par les approches « Omiques ». Dans cette optique, nous avons choisi la bactérie à Gram positif, *Streptococcus pneumoniae* pour sa résistance à la PEN et les bactéries à Gram négatif *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *P. aeruginosa* pour leurs résistances aux carbapénèmes plus particulièrement à l'imipénème (IMP), tous des pathogènes prioritaires faisant partie de la liste de l'OMS.

Je ferai une présentation générale des quatre bactéries et l'impact de leur résistance aux antibiotiques au niveau clinique. Par la suite je discuterai des différentes classes d'antibiotiques, leurs modes d'action et les mécanismes de résistance en mettant l'accent sur des exemples spécifiques de nos quatre bactéries. Le mode d'action des β -lactamines, une brève présentation des étapes de la synthèse et le recyclage du peptidoglycane (PG) ; leur cible primaire ; ainsi que les mécanismes de résistance développés par nos bactéries d'intérêt contre la PEN (pour *S. pneumoniae*) et l'IMP (pour les trois bactéries

à Gram négatif) seront détaillés. Enfin, les différentes approches « Omiques » utilisées au cours de cette thèse, les technologies de séquençage et leurs rôles dans l'étude de la résistance aux antibiotiques seront élaborés.

Chapitre 1 – Quatre bactéries pathogènes prioritaires

« Ce ne sont pas les espèces les plus fortes qui survivent, ni les plus intelligentes, mais celles qui savent le mieux s'adapter au changement »

Charles Darwin (1809-1882)

1.1. Bactéries à Gram négatif ou positif

En 1884, Hans Christian Gram a inventé une technique de coloration pour distinguer deux groupes majeurs de bactéries. Ainsi, les bactéries qui conservaient le cristal violet sont des bactéries à Gram positif les autres sont des bactéries à Gram négatif. La base de cette coloration à Gram réside dans les différences fondamentales de la structure de l'enveloppe bactériennes entre les deux groupes (24) (Figure 1).

L'enveloppe des bactéries à Gram négatif se constitue de trois couches principales : 1) la membrane externe, 2) la paroi formée du PG, et 3) la membrane cytoplasmique ou interne. Les deux membranes délimitent un compartiment cellulaire aqueux appelé le périplasma. La membrane externe est une caractéristique spécifique des bactéries à Gram négatif, celle-ci étant absente chez les bactéries à Gram positif. La membrane externe constitue une barrière protectrice de la cellule bactérienne. C'est une bicouche lipidique, contenant des phospholipides confinés à son feuillet interne alors que son feuillet externe est composé de glycolipides, principalement le lipopolysaccharide (LPS) (24). Ce dernier est constitué de trois parties : 1) l'antigène O (ou polysaccharide O) qui permet le sérogroupage des bactéries, 2) le domaine core oligosaccharidique, et 3) le lipide A qui sert à ancrer le LPS dans la membrane bactérienne et est responsable d'une grande partie de la toxicité des bactéries (25). Les protéines constituant la membrane externe se divisent en deux classes : 1) les lipoprotéines servant à attacher la membrane externe à la paroi bactérienne ainsi qu'à assurer la rigidité des deux structures (26), et 2) les protéines transmembranaires entre autres les porines permettant le passage des molécules hydrophiles tels que les mono et disaccharides, les acides aminés, les vitamines et certains antibiotiques (27).

La paroi bactérienne est formée du PG et du périplasma. Chez les bactéries à Gram positif, la couche du PG est plus épaisse que celle des bactéries à Gram négatif afin de compenser l'absence de la membrane externe et son rôle indirect dans la stabilisation de la membrane interne. Notons aussi la présence des acides téichoïques spécifiques des bactéries à Gram positif (24). La synthèse du PG sera discutée dans le chapitre 4. La plupart des bactéries à Gram positif ne semblent pas posséder un espace périplasmique clairement défini mais des études de cryo-microscopie électronique ont démontré sa présence chez *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* (28, 29).

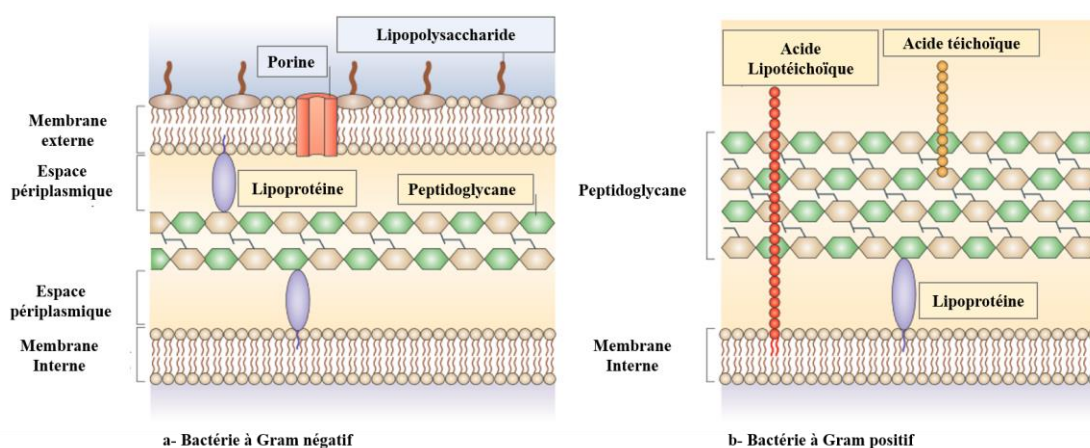


Figure 1. Structure de la paroi cellulaire des bactéries à Gram négatif et des bactéries à Gram positif

Adaptée de Brown L. *et al.* (30).

1.2. *Streptococcus pneumoniae*

1.2.1. Bactériologie et identification

En 1881, Louis Pasteur en France et George M. Sternberg aux États-Unis ont indépendamment isolé le même organisme pathogène nommé microbe septicémique de la salive par Pasteur et *Micrococcus pasteurii* par Sternberg. En 1926, Julius Albert Fraenkel l'a appelé pneumococcus car il provoquait des maladies pulmonaires. En 1929, dû à sa forme diplocoque, il a été nommé *Diplococcus pneumoniae*. Enfin depuis 1974,

Streptococcus pneumoniae est le nom adopté pour décrire cette bactérie en raison de sa croissance en chaînes de cocci en milieu liquide (31).

S. pneumoniae fait partie de l'embranchement taxonomique des Firmicutes, de la classe des Bacilli, de l'ordre des Lactobacillales et de la famille des *Streptococcaceae*. C'est une bactérie à Gram positif, souvent diplocoques en forme de lancette. Elle est anaérobie facultative et est identifiée par les caractéristiques de croissance suivantes : 1) alpha-hémolyse sur gélose au sang, 2) sensibilité à l'optochine, 3) absence de catalase, et 4) solubilité dans les sels biliaires (32, 33). Un ou plusieurs de ces tests peuvent ne pas être concluants et d'autres tests phénotypiques tels que l'agglutination avec des anticorps contre les antigènes pneumococques polysaccharidiques ou des tests génotypiques peuvent être nécessaires pour la distinguer des isolats des streptocoques oraux étroitement apparentés (34, 35).

1.2.2. Infections et épidémiologie

Les infections à pneumocoques se produisent dans le monde entier et sont plus fréquentes chez les jeunes enfants, les personnes âgées et les personnes immunodéprimées. *S. pneumoniae* colonise les voies respiratoires supérieures - en particulier le nasopharynx, et est capable d'y résider de manière asymptomatique. Sa migration vers des tissus et des organes stériles est la principale cause de toutes les maladies à pneumocoque telles que la méningite, la bactériémie, la pneumonie, l'otite moyenne aiguë et la sinusite (36) (Figure 2). Récemment, l'IVAC « International Vaccin Access Center » en collaboration avec plusieurs instituts de santé publique ont conduit une étude basée sur des données d'estimation fournies par l'OMS et la MCEE « Maternal and Child Epidemiology Estimation ». Ils ont estimé qu'en 2015, une moyenne de 3,7 millions d'épisodes à pneumocoques graves dont en moyenne 294 000 cas de décès ont eu lieu chez les enfants de moins de cinq ans dans le monde (37). En outre, le Fonds des Nations unies pour l'enfance (Unicef) a déclaré qu'en 2016, la pneumonie représentait 16% des décès (880 000 cas) observés chez les jeunes enfants de moins de cinq ans dans le monde. Il est à noter que *Haemophilus influenzae* de type b, le virus respiratoire syncytial (VRS) et la grippe peuvent également causer une pneumonie, mais la pneumonie à pneumocoque est la plus répandue.

Cette dernière entraîne environ 300 000 à 600 000 hospitalisations chez les personnes âgées chaque année aux États-Unis avec des taux de survie réduits (33).

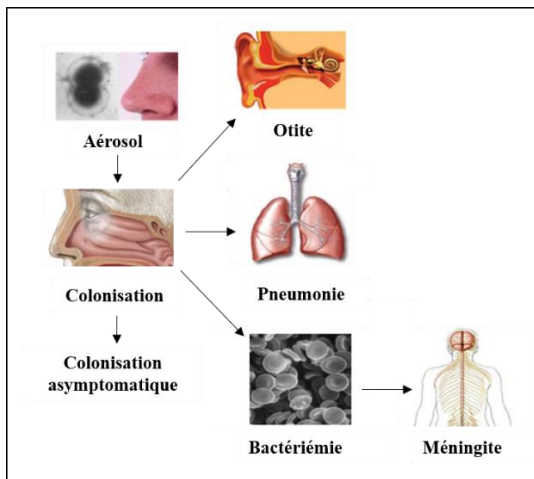


Figure 2. Progression de la maladie à pneumocoque

Adaptée de Henriques-Normark B. et Tuomanen EI. (36).

1.2.3. Génome et virulence

S. pneumoniae est un organisme qui présente une grande diversité génomique. Environ 4000 génomes de *S. pneumoniae* ont déjà été séquencés, d'une longueur d'environ 2 à 2,2 millions de nucléotides. Plus de 2000 gènes ont été annotés, mais de nouveaux gènes sont encore régulièrement découverts. Sa virulence se développe grâce à sa capacité à acquérir du nouveau matériel génétique par transformation et recombinaison. Elle exprime une grande variété de protéines et de toxines contribuant à sa pathogénèse. Ces facteurs de virulence fonctionnent en empêchant la réponse du système immunitaire (SI) de l'hôte, en évitant ses mécanismes de défense, ou par contact direct avec les tissus de l'hôte et ses récepteurs de surface, qui interfèrent à leur tour avec l'activation du SI de l'hôte et la clairance bactérienne. L'infectivité de *S. pneumoniae* est ainsi directement liée au SI de l'hôte (33). Parmi les nombreux facteurs de virulence nous citons la capsule et ceux qui sont considérés comme des pistes d'investigation pour le développement de nouveaux vaccins antipneumococciques telles que la pneumolysine, la protéine de surface PspA et la protéine de liaison à la choline PcpA (Figure 3) (38).

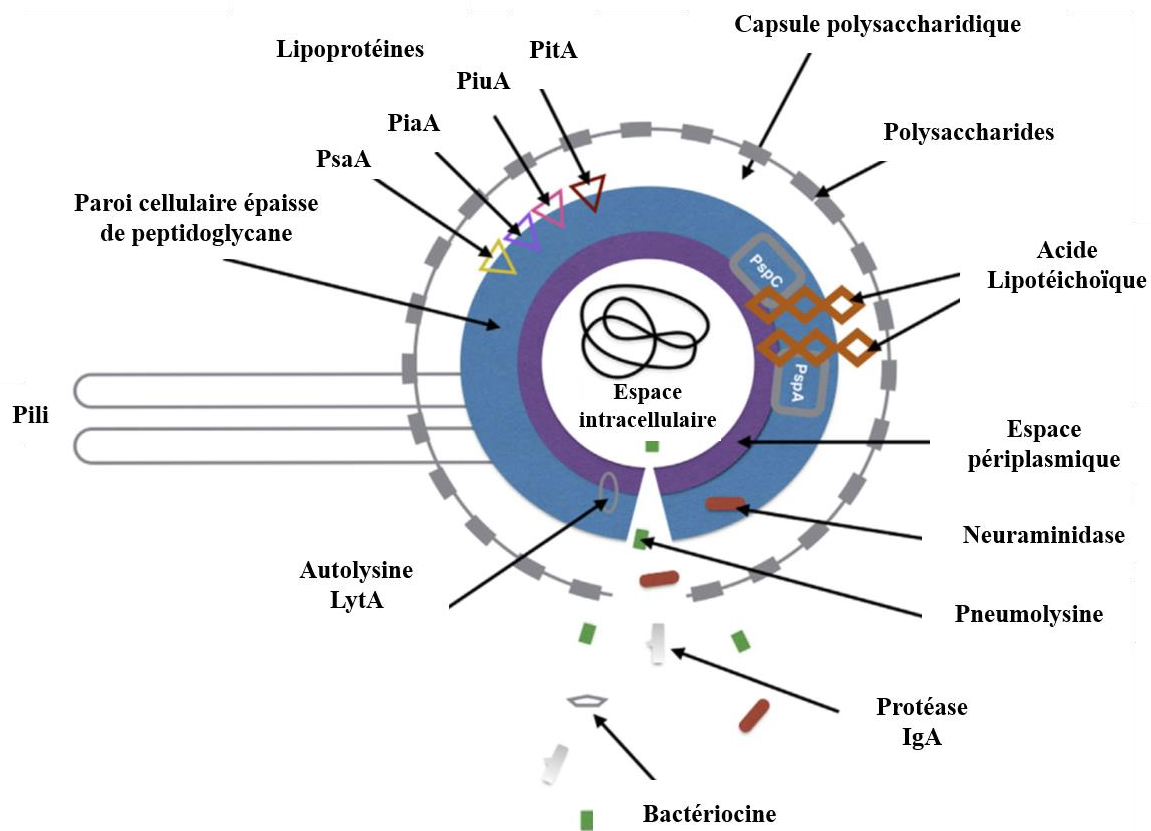


Figure 3. Les facteurs de virulence de *S. pneumoniae*

S. pneumoniae exprime une variété de protéines et de toxines qui stimulent sa pathogénèse. Les principaux facteurs de virulence sont mis en évidence dans la figure. Abréviations: PsaA, adhésine A de surface pneumococcique; PspA, protéine A de surface du pneumocoque; PspC, protéine C de surface du pneumocoque; PiaA, acquisition pneumococcique du fer A; PiuA, absorption pneumococcique de fer A; PitA, transporteur pneumococcique de fer. Adaptée de Brooks LRK. et Mias GI. (33).

1.2.4. Vaccins

La paroi bactérienne de *S. pneumoniae* est généralement entourée par une capsule formée de polysaccharides qui agit comme le facteur de virulence le plus important en protégeant les bactéries contre la destruction par les phagocytes de l'hôte. *S. pneumoniae* est classée par 97 sérotypes différents, en se basant sur une réaction entre la capsule

polysaccharidique et son anticorps spécifique. Certains sérotypes ont tendance à coloniser le nasopharynx de manière asymptomatique alors que d'autres sont associés à une maladie invasive (39). Les vaccins antipneumococciques offrant une protection spécifique du sérotype ont été développés afin qu'ils préviennent les maladies causées par les sérotypes les plus pertinents cliniquement. Ainsi, deux formulations vaccinales sont disponibles, soient le PNEUMOVAX[®] 23, un vaccin polysaccharidique (VP) couvrant 23 sérotypes (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19F, 19A, 20, 22F, 23F, 33F) et Prevnar[®] 13 (VPC13) qui est un vaccin polysaccharidique conjugué à une protéine diphtérique couvrant 13 sérotypes (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F). PNEUMOVAX[®] 23 a été introduit sur le marché en 1983, il est recommandé pour tous les adultes de 65 ans et plus et pour les personnes de deux ans ou plus présentant un risque accru de maladie. Cependant, il est très peu immunogène chez les enfants âgés de moins de 2 ans car il induit une réponse immunitaire indépendante des cellules T. En 2000, Prevnar[®] 7 qui contenait 7 sérotypes a été d'abord introduit au marché mais dû à l'émergence de maladies causées par des sérotypes non inclus dans le vaccin, le VPC 13 a été développé et introduit sur le marché en 2010. Cette deuxième formule induit une réponse immunitaire dépendante des cellules T et est ainsi efficace pour les enfants de moins de deux ans (38, 40).

La prévention par ces vaccins ciblant la capsule a sûrement permis le ralentissement de la propagation de plusieurs sérotypes importants au niveau épidémiologique, mais a aussi permis l'émergence de sérotypes non inclus dans ces vaccins. En outre, ces vaccins n'ont eu que peu d'effet sur les taux de résistance aux antibiotiques qui a continué à croître (41) à un point qui a incité l'OMS à inclure *S. pneumoniae* dans sa liste de pathogènes prioritaires pour sa résistance à la PEN (22).

1.3. *Escherichia coli*

1.3.1. Bactériologie et identification

Theodor Escherich a isolé une variété de bactéries à partir d'échantillons fécaux de nourrissons en utilisant ses propres méthodes de culture d'anaérobie et la technique de coloration de Gram et il a nommé le bacille commun du côlon *Bacterium coli commune*. En 1919 Aldo Castellani et Albert John Chalmers ont proposé le nom d'*Escherichia coli*, mais il n'a été officiellement reconnu qu'en 1958 (42).

E. coli fait partie de l'embranchement taxonomique des Proteobacteria, de la classe des Gammaproteobacteria, de l'ordre des Enterobacterales et de la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est un bacille à Gram négatif, anaérobie facultatif, lactose et indole positif, oxydase négatif et n'hydrolyse pas le L-pyrrolidonyl- β -naphthylamide (43).

1.3.2. Génome, virulence et pathogénicité

E. coli est une bactérie commensale qui a comme niche principale la couche muqueuse du côlon des vertébrés (mammifères et oiseaux). En effet, elle colonise le tractus gastro-intestinal de nourrissons humains quelques heures après la naissance. Sa niche écologique secondaire est l'eau et les sédiments. Les souches commensales d'*E. coli* causent rarement des maladies, sauf chez les hôtes immunodéprimés ou lorsque les barrières gastro-intestinales normales sont franchies, comme dans le cas d'une péritonite (44, 45).

L'importante plasticité du génome est la clé de la grande variabilité observée chez *E. coli*. Son pangénome est l'ensemble de son génome de base et son génome flexible. La taille des génomes d'*E. coli* varie entre 4,6 et 5,7 Mb. Cette variabilité est due à des modifications du contenu du génome en raison de l'acquisition de l'information génétique par transfert horizontal de gènes, perte de gènes, ainsi que d'autres modifications génomiques comme les réarrangements de l'ADN et les mutations ponctuelles. Ainsi, certaines souches d'*E. coli* peuvent acquérir des facteurs de virulence spécifiques qui leur

confèrent une capacité accrue à s'adapter à de nouvelles niches et leur permet de provoquer un large spectre de maladies (45).

Les souches d' *E. coli* pathogènes sont regroupées en pathotypes selon les signes cliniques observés chez les malades. Elles peuvent provoquer des infections intestinales ou extra-intestinales.

Les agents pathogènes intestinaux responsables de différents types de diarrhée se divisent en six catégories : 1) les *E. coli* entéro-toxinogènes (ETEC), 2) les *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC) ou STEC pour « Shiga toxin-producing *E. coli* », 3) les *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC), 4) les *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC), 5) les *E. coli* entéro-aggrégatives (EAEC), et 6) les *E. coli* entéro-invasive (EIEC) (44).

Les pathotypes impliqués dans des infections extra-intestinales sont appelés ExPEC. Les infections urinaires (cystites et pyélonéphrites) causées par *E. coli* uropathogène sont les infections extra-intestinales les plus courantes. Dans ce type d'infection, la bactérie se lie aux cellules urothéliales des voies urinaires en utilisant des fimbriae de type 1 pour coloniser la vessie. L'attachement déclenche ensuite l'apoptose et l'exfoliation des cellules épithéliales de la vessie. Dans la cystite, les fimbriae de type 1 sont continuellement exprimés et l'infection se limite au foyer. Dans la pyélonéphrite, l'expression des fimbriae de type 1 est désactivée, ce qui permet à l'organisme de monter à travers l'uretère jusqu'aux reins où il peut s'attacher par les fimbriae P aux récepteurs sur l'épithélium des reins, qui finit par être endommagé par l'hémolysine et d'autres produits bactériens (44). Les ExPEC sont également fréquemment associés à des infections d'origine abdominale et pelvienne, y compris, sans toutefois s'y limiter, des infections des voies biliaires, une péritonite infectieuse et une maladie inflammatoire pelvique. Moins souvent, ils sont associés à des infections de la peau et des tissus mous, à une méningite néonatale, à une pneumonie d'origine hospitalière et à une septicémie (44).

1.3.3. Épidémiologie

Les divers pathotypes d'*E. coli* tendent à être des groupes clonaux caractérisés par des antigènes communs O (somatiques, LPS) et H (flagellaire) qui définissent leurs sérogroupes (antigène O uniquement) ou sérotypes (antigènes O et H) (44). La souche *E. coli* O157:H7 est une souche appartenant au groupe des bactéries *E. coli* (STEC) produisant la toxine Shiga. Chaque année aux États-Unis, les infections à *E. coli* causent environ 265 000 maladies et environ 100 décès. Environ 40% de ces infections sont causées par *E. coli* O157:H7. Les 60% restants des cas d'infection à *E. coli* sont causés par une infection à *E. coli* productrice de toxine Shiga non-O157:H7 (46). Au niveau mondial, ETEC était la huitième cause de mortalité par diarrhée en 2016 parmi tous les groupes d'âge, représentant une moyenne de 51 186 décès et environ 3,2% de décès par diarrhée. ETEC était responsable d'environ 4,2% des décès par diarrhée chez les enfants de moins de 5 ans (47). *E. coli* O157:H7 est le sérotype le plus important pour la santé publique mais d'autres sérotypes tel que *E. coli* O104:H4 ont été la cause d'épidémies survenues en 2011 en Europe centrale, principalement en Allemagne. *E. coli* O104:H4 contient des facteurs de virulence de deux pathotypes EAEC et EHEC. *E. coli* O25b:H4/ST131, une souche ExPec multirésistante, causant un large spectre de maladies principalement des infections des voies urinaires, est largement distribuée en Europe (48).

1.4. *Klebsiella pneumoniae*

1.4.1. Bactériologie et identification

Klebsiella pneumoniae a été décrite pour la première fois en 1882 par Carl Friedländer en tant que bactérie isolée des poumons de patients décédés d'une pneumonie. À l'origine appelée bacille de Friedländer, ce n'est qu'en 1886 que la bactérie obtienne son nom actuel (49).

K. pneumoniae fait partie de l'embranchement taxonomique des Proteobacteria, de la classe des Gammaproteobacteria, de l'ordre des Enterobacterales et de la famille des *Enterobacteriaceae*. C'est un bacille à Gram négatif, encapsulé, produisant des capsules

mucoïdes sur un milieu solide, non mobile, anaérobie facultatif, oxydase négatif, et qui fermente le lactose (50).

1.4.2. Génome, virulence et pathogénicité

K. pneumoniae est fréquemment trouvée dans l'eau, les eaux usées, le sol et sur les surfaces végétales. L'environnement sert probablement de réservoir d'acquisition humaine de cette espèce, sous forme de colonisation ou d'infection. Une fois acquise, *K. pneumoniae* colonise les surfaces muqueuses chez les humains, y compris le nasopharynx et le tractus gastro-intestinal. Ces bactéries peuvent être trouvées sur la peau, mais sont considérées comme transitoires sur ce site plutôt que colonisantes.

K. pneumoniae est associée à un large spectre d'infections, telles que l'infection des voies urinaires, la pneumonie, l'infection intra-abdominale, l'infection sanguine, la méningite et les abcès à pyogènes du foie (51). Les pneumonies causées par *K. pneumoniae* peuvent être divisées en deux grandes catégories: les pneumonies acquises en communauté (PAC) et les pneumonies acquises en milieu hospitalier (PAH). Cette dernière est définie comme une pneumonie survenant 48 heures après l'hospitalisation. Les espèces de *Klebsiella* sont également une cause majeure de pneumonies associées aux ventilateurs (PAV) chez les patients des unités de soins intensifs, et les PAVs sont responsables pour 83% des pneumonies contractées en milieu hospitalier. Les infections urinaires associées au cathéter sont une autre infection causée par *K. pneumoniae*. Les souches de *K. pneumoniae* classiques infectent les personnes immunodéprimées et les personnes souffrant de diabète ou de tumeurs malignes. Cependant, des souches de *K. pneumoniae* hypervirulente peuvent provoquer de graves infections chez des personnes en bonne santé. Cette virulence supplémentaire est en corrélation avec l'acquisition de plasmides de 200 à 220 kb contenant des gènes qui augmentent la production de capsules et codent pour des sidérophores (52).

Des variations dans le génome accessoire peuvent moduler le risque de progression à la maladie. En effet, les génomes de *K. pneumoniae* comprennent généralement entre 5000 et 6000 gènes, le génome central est actuellement estimé à 2000

gènes cela signifie que la majorité du génome est composé de gènes qui varient entre les isolats formant le génome accessoire. Les gènes accessoires peuvent être acquis en raison de transfert horizontal de gènes entre espèces bactériennes. Ceux-ci comprennent les gènes codés chromosomiquement et les gènes sur les plasmides. Ces gènes peuvent encoder des facteurs de virulence spécifiques mais également divers enzymes et mécanismes résistants aux antibiotiques. Ainsi, ces gènes peuvent aider les isolats à s'adapter à des sites spécifiques d'infection ou de colonisation (50).

Les facteurs de virulence de *K. pneumoniae* sont codés par des gènes dans les génomes de base et accessoires. Les facteurs de virulence bien établis chez *K. pneumoniae* sont les suivants: capsule, LPS, sidérophores et pili. L'utilisation de l'allantoïne, des systèmes d'absorption du fer, des pompes à efflux et un système de sécrétion de type VI ont été plus récemment identifiés comme des facteurs de virulence (50).

Sur la base de tests sérologiques, 77 types capsulaires ont été identifiés. Les variations dans les structures de l'antigène O du LPS fournissent diverses « sérotypes O ». *K. pneumoniae* comprend neuf principaux sérotypes O ; trois d'entre eux, O1, O2 et O3, sont responsables de presque 80% de toutes les infections à Klebsiella (50).

1.4.3. Épidémiologie

Deux types principaux de résistance aux antibiotiques ont été fréquemment observés chez *K. pneumoniae*. L'un des mécanismes implique l'expression de β -lactamases à spectre étendu (BLSE), qui rendent les bactéries résistantes aux céphalosporines et aux monobactames. L'autre mécanisme de résistance, qui est encore plus troublant, est l'expression des carbapénémases par *K. pneumoniae*, qui confère aux bactéries une résistance à la quasi-totalité des β -lactames disponibles, y compris les carbapénèmes. Le premier cas de *K. pneumoniae* exprimant une carbapénémase a été identifié en Caroline du Nord en 1996. Ce type de carbapénémase est appelé KPC. Des carbapénémases supplémentaires, telles que MBL, NDM-1, IMP et VIM, ont depuis été découvertes dans des souches de *K. pneumoniae*. Toutes ces carbapénémases, y compris la KPC, ont été trouvées dans d'autres bactéries et, collectivement, ils contribuent à la présence mondiale

de bactéries résistantes aux carbapénèmes. Quel que soit leur type de carbapénémase, les isolats de *K. pneumoniae* résistants aux carbapénèmes sont appelés CRE (« Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* ») (52). Ces enzymes seront discutées au chapitre 4.

Les infections à *K. pneumoniae* causées par des bactéries productrices de BLSE et résistantes aux carbapénèmes ont des taux de morbidité et de mortalité nettement plus élevés que les infections par des bactéries non résistantes. Des travaux publiés par le CDC en 2013 démontrent la fréquence et la gravité des infections de ces souches. Les souches productrices de BLSE ont été à l'origine de 23% des infections nosocomiales à *K. pneumoniae* aux États-Unis, soit l'équivalent de 17 000 infections, et ont entraîné 1100 décès. En même temps, les souches de *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes ont été responsables de 11% des infections nosocomiales à *K. pneumoniae*, soit 7900 infections, et ont entraîné 520 décès (52, 53).

La KPC s'est propagée, entraînant des épidémies en Europe, Asie et Amérique du Sud. Les États-Unis, la Grèce, l'Israël et l'Italie sont considérés comme des pays endémiques et ont connu des épidémies majeures de KPC au cours des dernières années. Des épidémies sont aussi survenues en France, en Espagne, en Allemagne, en Irlande, aux Pays-Bas et à Porto Rico. Le taux de mortalité, allant de 27,8% à 66,7%, attribuable à une infection par *K. pneumoniae* produisant KPC a été rapporté (54).

1.5. *Pseudomonas aeruginosa*

1.5.1. Bactériologie et identification

En 1882, Carl Gessard a isolé *P. aeruginosa* (*Bacillus pyocyaneus*) en essayant de comprendre la source des colorations bleues et vertes sur les bandages des patients (55).

P. aeruginosa fait partie de l'embranchement taxonomique des Proteobacteria, de la classe des Gammaproteobacteria, de l'ordre des Pseudomonadales et de la famille des *Pseudomonadaceae*. C'est un bacille à Gram négatif mobile, oxydase positif, lactose

négatif, produit un certain nombre de pigments : entre autres la pyocyanine (bleu-vert), la pyoverdine (jaune-vert fluorescent) et la pyorubine (brun-rouge) (56).

1.5.2. Génome, virulence et pathogénicité

P. aeruginosa est présente dans le sol, les milieux aquatiques, les plantes ainsi que dans les tissus des animaux. Elle peut être isolée de diverses sources telles que les équipements médicaux, les toilettes et les éviers. *P. aeruginosa* est un organisme pathogène opportuniste qui provoque des maladies tant chez les plantes que chez les animaux, y compris les humains et est une cause majeure des infections acquises en milieu hospitalier. Il provoque des PAH et PAV, des dermatites, des infections gastro-intestinales, urinaires et cutanées, bactériémie, infections des tissus mous, et plusieurs autres infections, en particulier chez les patients atteints de brûlures graves, et les patients immunodéprimés (57). *P. aeruginosa* est la principale cause d'infections respiratoires chez les personnes atteintes de fibrose kystique, ainsi qu'une cause fréquente d'exacerbations chez les personnes atteintes de maladie pulmonaire obstructive chronique avancée (57, 58).

La polyvalence métabolique de *P. aeruginosa* est la clé de sa survie dans divers environnements. C'est une bactérie aérobie qui utilise l'oxygène comme accepteur d'électrons mais, dans des conditions anaérobies, elle peut utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons pour respirer. Elle a des besoins minimaux en nutriments et croît à des températures pouvant atteindre 42°C. En raison de sa diversité métabolique, *P. aeruginosa* peut même se multiplier dans certains désinfectants et métaboliser de nombreux antibiotiques. De plus, en formant des biofilms, *P. aeruginosa* peut coloniser les surfaces des équipements médicaux tels que les cathéters et les bronchoscopes et survivre aux protocoles de désinfection (59).

Le premier génome de *P. aeruginosa* séquencé était celui de la souche PAO1, sa taille est de 6,3 Mb et contient 5570 cadres de lecture ouverts prédits (60). La grande taille du génome de *P. aeruginosa* (5 à 7 Mb) reflète les nombreuses et distinctes familles de gènes qu'il contient incluant des événements de duplication génique. Plus précisément, le génome de *P. aeruginosa* contient un nombre important de gènes codant pour les protéines de la membrane externe impliquées dans l'adhérence, la motilité, l'efflux d'antibiotiques,

l'exportation des facteurs de virulence et la détection environnementale par des systèmes à deux composants. En outre, conformément à la polyvalence métabolique de la bactérie, le génome de *P. aeruginosa* comprend un grand nombre de gènes codant pour des systèmes de transport et des enzymes impliqués dans l'absorption et le métabolisme de nutriments. Le génome de *P. aeruginosa* est une mosaïque composée de séquences génomiques relativement conservées avec du matériel génétique accessoire intercalé. Le génome central constitue environ 90% du génome total et est hautement conservé d'une souche à l'autre. En revanche, le génome accessoire comprend des gènes acquis par transfert horizontal que l'on trouve dans certaines souches de *P. aeruginosa* mais pas dans d'autres. Les éléments génétiques du génome accessoire peuvent coder des propriétés qui contribuent à l'adaptation des souches qui les hébergent à certaines niches (59).

Une fois chez l'homme, *P. aeruginosa* injecte aux cellules hôtes une combinaison de protéines effectrices de sécrétion de type III, perturbe les cascades de transduction du signal des cellules hôtes et induit la mort de celles-ci. D'autres facteurs de virulence bien caractérisés de *P. aeruginosa* comprennent les enzymes sécrétées qui dégradent la matrice extracellulaire de l'hôte, une exotoxine qui inhibe la traduction de l'ARN de la cellule hôte, des adhésines et un flagelle (59).

La communication cellule-cellule, ou « Quorum Sensing (QS) », est un phénomène répandu chez les bactéries, utilisé pour coordonner l'expression des gènes au sein des populations locales. Il permet aux communautés bactériennes de réguler une variété de processus biologiques importants pour l'adaptation bactérienne et la survie. *P. aeruginosa* utilise le QS pour réguler des centaines de gènes en réponse à la taille de la population. La progression de l'infection aiguë à chronique est fortement influencée par l'expression des gènes régulés par le QS. Ces gènes sont principalement impliqués dans la production de facteur de virulence, motilité, développement de biofilms, mécanismes de résistance aux antibiotiques et l'ajustement des voies métaboliques pour les réponses au stress (61).

1.5.3. Épidémiologie

Le système de sérotypage le plus complet pour *P. aeruginosa*, le Schéma Antigénique de Typage International (International Antigenic Typing Scheme (IATS)), comprend 20 sérotypes O standards. Les données épidémiologiques actuelles indiquent que, sur ces 20 sérotypes, IATS-O1, le sérotype 2 (IATS-O2, IATS-O5 et IATS-16), IATS-O6 et IATS-O11 sont responsables de 70% des infections dues à *P. aeruginosa* (62). Les isolats du sérotype O12 multirésistants étaient aussi responsables de plusieurs épidémies (63).

Dans le cadre d'une étude entre 1997 et 2016 conduite par le programme de surveillance antimicrobienne SENTRY, 52 022 isolats internationaux de *P. aeruginosa* ont été étudiés. L'infection la plus courante de laquelle *P. aeruginosa* a été isolée est la pneumonie chez les patients hospitalisés (44,6%) suivie par une infection sanguine (27,9%). La région présentant le pourcentage le plus élevé de phénotypes de multirésistance était l'Amérique latine (41,1%), suivie par l'Europe (28,4%). Les taux de la multirésistance les plus élevés étaient entre 2005 et 2008, mais ils ont diminué au cours de la période la plus récente (64).

Selon le CDC, 51 000 infections par *P. aeruginosa* liées aux soins de santé se produisent chaque année aux États-Unis. Plus de 6000 (13%) d'entre elles sont multirésistantes, et environ 400 décès par an sont attribués à ces infections (65).

Chapitre 2 - Les antibiotiques : classification et modes d'action

« Les hommes peuvent atteindre un but commun sans emprunter les mêmes voies »

Amadou Hampâté Bâ (1901-1991)

Le terme antibiotique a été inventé à partir des mots grecs *anti* « contre » et *biôtikos* « qui concerne la vie », ce qui signifie littéralement « contre la vie ». Comme présenté dans l'introduction, à l'origine, les antibiotiques étaient définis comme des composés organiques produits par un microorganisme et toxiques pour d'autres microorganismes. Cependant, cette définition a été bonifiée pour inclure les antimicrobiens également produits en tout ou en partie par des moyens synthétiques (66). Alors que certains antibiotiques sont capables de tuer complètement les bactéries, d'autres ne peuvent qu'inhiber leur croissance. Ceux qui tuent les bactéries sont appelés bactéricides, tandis que ceux qui inhibent la croissance bactérienne sont appelés bactériostatiques (67). Certains antibiotiques peuvent présenter une activité bactériostatique dans certaines circonstances et une activité bactéricide dans d'autres, où des dommages suffisants à une ou plusieurs voies ou structures cellulaires se produisent de sorte que la réponse bactéricide est déclenchée (67). Dans ce manuscrit, les termes antibiotiques ou agents antimicrobiens seront employés pour désigner les antibactériens.

Il existe plusieurs façons de classer les antibiotiques, mais les systèmes de classification les plus courants reposent sur leurs structures moléculaires, leur mode d'action et leur spectre d'activité (Figure 4), d'autres incluent leur voie d'administration (injectable, orale et topique). Les classes courantes d'antibiotiques à base de structures chimiques ou moléculaires incluent les β -lactamines, les glycopeptides, les macrolides, les tétracyclines, les oxazolidinones, les aminoglycosides, les quinolones, les sulphonamides et les lipopeptides (66).

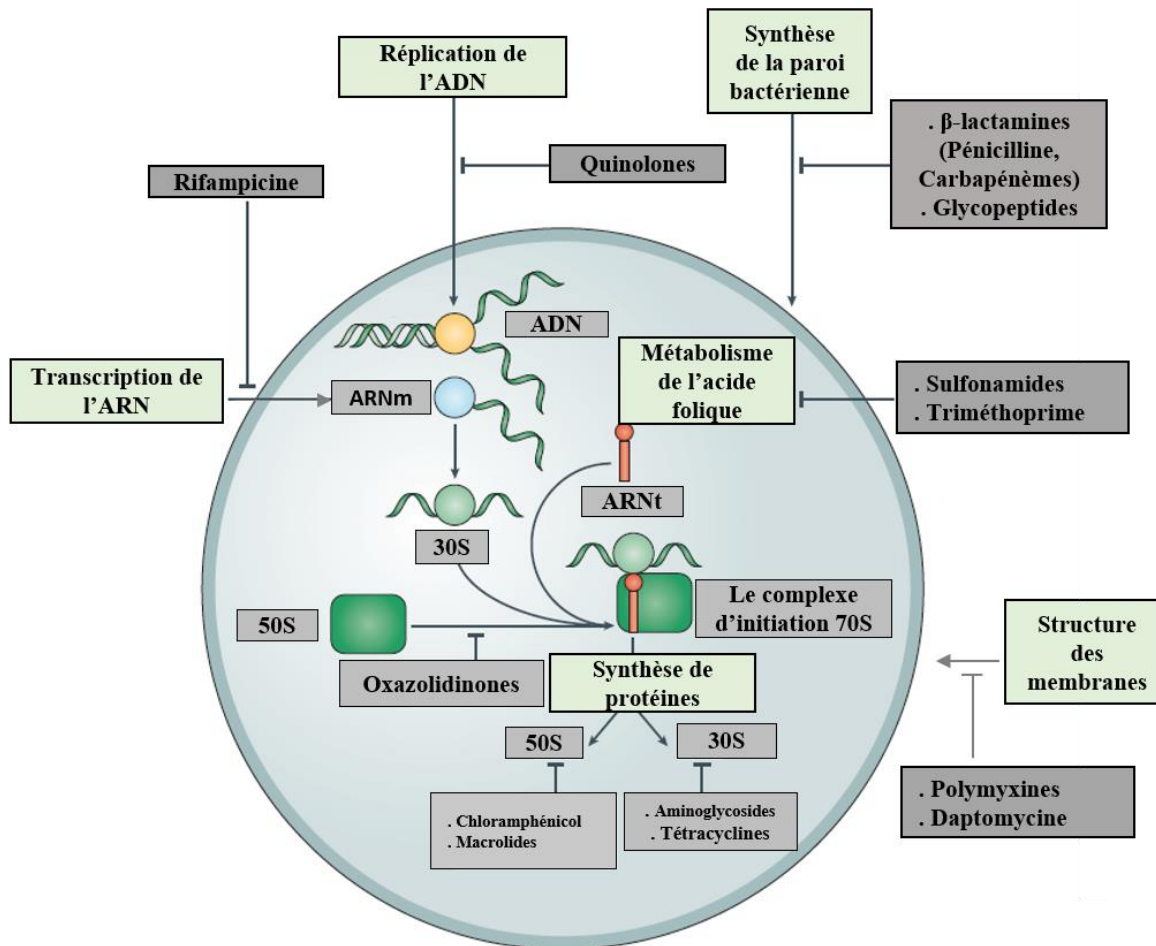


Figure 4. Les cibles des antibiotiques

Adaptée de Lewis K. (68).

2.1. Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne

Les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif ont toutes les deux, au niveau de la structure de leur paroi cellulaire, une couche de PG qui les protège contre la pression osmotique (69). Plusieurs antibiotiques qui affectent les parois des cellules bactériennes inhibent les enzymes ou séquestrent les substrats impliqués dans l'assemblage et la réticulation du PG (69). Les antibiotiques agissant sur la synthèse de la paroi bactérienne feront l'objet du chapitre 4 de cette thèse.

2.2. Déstabilisation de la structure des membranes

Les lipopeptides cycliques représentent une classe prometteuse de produits naturels dotés d'une activité antibactérienne puissante. Ils sont composés d'une queue lipidique liée à un oligopeptide court qui est cyclisé pour former une lactone ou un cycle lactame (70).

Les polymyxines B et les polymyxines E (Colistine) sont produits par *Bacillus polymyxa* et *Bacillus colistinus* respectivement (70). Ils ne sont pas actifs contre les bactéries à Gram positif mais ont une puissante activité bactéricide vis-à-vis de nombreuses bactéries à Gram négatif, y compris *P. aeruginosa* et les entérobactéries (71). Cela s'explique par leur mode d'action qui implique dans un premier temps une interaction spécifique de leur chaîne latérale lipidique et de leur noyau peptidique penta-cationique avec le LPS de la membrane anionique externe existant uniquement chez les bactéries à Gram négatif. Ces interactions perturbent l'intégrité de la membrane, facilitent en outre l'importation des polymyxines et se traduisent par une fuite transitoire d'ions, de molécules et de petites protéines, ce qui aboutit finalement à la mort cellulaire (70).

La daptomycine est un lipopeptide cyclique produit par *Streptococcus roseosporus* et agit contre les bactéries à Gram positif telles que *S. pneumoniae* et *S. aureus*. Son activité bactéricide consiste en premier lieu à sa liaison à la membrane cytoplasmique d'une manière dépendante du calcium suivi par son oligomérisation ce qui conduit à un efflux d'ions potassium de la cellule bactérienne. La perte d'ions potassium induit l'inhibition de la synthèse macromoléculaire menant ainsi à la mort cellulaire (72).

2.3. Inhibition de la réplication de l'ADN

La synthèse de l'ADN, la transcription de l'ARNm et la division cellulaire nécessitent la modulation du superenroulement chromosomique catalysée par les topoisomérases (73). La classe des antimicrobiens quinolones synthétiques, y compris les fluoroquinolones (FQ), cible les complexes ADN – topoisomérases. Ils interfèrent avec le maintien de la topologie chromosomique en ciblant la topoisomérase II (ADN gyrase) et la

topoisomérase IV (Topo IV), en piégeant ces enzymes au stade du clivage de l'ADN et en empêchant le rattachement du brin, induisant ainsi des cassures de l'ADN double brin et l'inhibition de la réplication de l'ADN ainsi que sa synthèse, ce qui aboutit éventuellement à la mort cellulaire (74). Malgré les similitudes fonctionnelles générales entre les deux topoisomérases, leur sensibilité aux quinolones varie selon les espèces bactériennes. Par exemple, plusieurs études ont montré que la Topo IV était la principale cible des quinolones chez les bactéries à Gram positif (*p. ex.*, *S. pneumoniae*) (75), tandis que chez les bactéries à Gram négatif (*p. ex.* *E. coli*), la cible primaire est l'ADN gyrase et la Topo IV est une cible secondaire (76).

2.4. Inhibition de la transcription de l'ARN

La rifamycine est un agent naturel produit par *Streptomyces mediterranei*. La rifamycine et ses dérivés synthétiques (*p. ex.* Rifampicine) inhibent la transcription en se liant spécifiquement à la sous-unité β de l'ARN polymérase. La rifampicine agit contre une variété d'agents pathogènes, y compris les mycobactéries, les coques à Gram positif (notamment les staphylocoques et les streptocoques) et *Clostridium difficile*. Elle est utilisée en association avec un antibiotique β -lactame ou avec la vancomycine pour traiter la méningite causée par des souches *S. pneumoniae* multirésistantes (77). Elle exerce aussi une activité contre certains agents pathogènes à Gram négatif tels que *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Haemophilus influenza* (78).

2.5. Inhibition de la synthèse protéique

La traduction de l'ARN messager (ARNm) en protéines se produit au cours de trois phases séquentielles (initiation, élongation et terminaison) impliquant le ribosome et une multitude de facteurs accessoires cytoplasmiques (79). Les ribosomes sont constitués d'ARN et de protéines et sont généralement appelés ribonucléoprotéines. L'ARN ribosomique (ARNr) 16S constitue la petite sous-unité 30S, et les ARNr 5S et 23S constituent la grande sous-unité 50S. Il existe une ample différence entre la composition du ribosome des procaryotes et celle des eucaryotes, cela a grandement permis le

développement d'antibiotiques qui cibleraient le ribosome d'un large spectre de bactéries pathogènes (80).

Les agents qui inhibent la synthèse des protéines peuvent être divisés en deux sous-classes : les inhibiteurs de la grande sous-unité 50S, et les inhibiteurs de la petite sous-unité 30S. En termes généraux, les antibiotiques qui inhibent la sous-unité 50S agissent en bloquant physiquement soit la phase d'initiation de la traduction protéique (*p. ex.* les oxazolidinones), soit la phase d'élongation de la synthèse protéique où l'acide aminé suivant est lié à la chaîne peptidique naissante en croissance (*p. ex.* les macrolides et le chloramphénicol (CHL)) (79). Les inhibiteurs de la sous-unité 30S agissent principalement en bloquant l'accès des ARN de transfert (ARNt) aminoacylés au ribosome (*p. ex.* la tétracycline), sachant que certains travaux antérieurs ont montré que la tétracycline inhibe également le ribosome 50S (81). Les aminoglycosides (*p. ex.* streptomycine, kanamycine (Kan) et gentamicine) se lient à l'ARN 16s de la sous-unité 30S, cette interaction peut induire une altération de la conformation du complexe formé entre un codon d'ARNm et son ARNt aminoacylé complémentaire au niveau du ribosome. Cela entraîne une erreur dans le décodage de l'information génétique portée par l'ARNm et par la suite une production de protéines aberrantes (79).

Les aminoglycosides ont une activité bactéricide alors que les autres inhibiteurs du ribosome sont généralement bactériostatiques. Cependant, certains de ces bactériostatiques pourraient être bactéricides dans certaines conditions spécifiques à l'espèce ou au traitement. Par exemple, le CHL, connu pour être typiquement bactériostatique tue efficacement *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* et *H. influenza* (82). Cette variabilité dans la réponse au traitement entre les espèces est potentiellement liée aux différences de séquence au niveau des régions variables des protéines ribosomiques et des ARN hautement conservés (79, 83).

2.6. Blocage des voies métaboliques

Le sulfaméthoxazole (SMX) est un sulfonamide qui agit directement sur la synthèse du folate chez les bactéries. Le SMX, étant un analogue de l'acide p-aminobenzoïque (PABA), inhibe par compétition l'activité enzymatique de la dihydroptéroate synthase (DHPS). Ceci inhibe la synthèse du dihydroptéroate, le précurseur du dihydrofolate (DHF). Le triméthoprime (TMP), un analogue de l'acide folique, inhibe l'activité de la dihydrofolate réductase (DHFR), qui convertit le DHF en tétrahydrofolate (THF) (84). Ce dernier est essentiel à la synthèse des purines nécessaires à la production d'ADN et de protéines. Lorsque ces antibiotiques sont utilisés seuls, ils agissent uniquement de manière bactériostatique. Cependant, lorsqu'ils sont utilisés en association TMP-SMX, ils peuvent avoir une activité bactéricide (85, 86). Le TMP-SMX est actif contre plusieurs bactéries à Gram positif (*p. ex. S. pneumoniae* et *S. aureus*), ainsi que celles à Gram négatif comme *E. coli* et *K. pneumoniae* (87).

2.7. Production (ou pas) de dérivés réactifs de l'oxygène

En 2007, des études ont proposé que l'activité létale des antibiotiques bactéricides ne résulte pas directement de l'inhibition de leurs cibles biologiques mais plutôt de l'induction de mécanismes effecteurs communs qui ont lieu en aval. Ainsi, la caractérisation du profil d'expression génique de souches d'*E. coli* et de *S. aureus* en présence d'antibiotiques bactéricides a permis de révéler que l'activité bactéricide des antibiotiques résulte partiellement de leur capacité à induire une dérégulation métabolique impliquant le cycle de Krebs et aboutissant à la production de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) à travers la réaction de Fenton (88, 89). Ultimement, ceci aboutit à l'accumulation de plusieurs ruptures de l'ADN double brin à un point incompatible avec la survie des cellules (Figure 5) (90). À l'inverse, les antibiotiques bactériostatiques n'induisent pas la production des radicaux hydroxyles.

Néanmoins, en 2013, d'autres études ont contredit l'idée que les bactéricides induisent la mort cellulaire en stimulant la production de DRO, du moins chez *E. coli*,

puisque'ils n'ont observé aucune différence dans le taux de survie des bactéries lorsque celles-ci étaient exposées à des antibiotiques bactéricides en conditions anaérobiques vs aérobieques (91, 92).

Malgré tout, plusieurs études ont démontré l'utilité de cibler certains composants cellulaires, incluant les mécanismes de protection contre le stress oxydatif, afin d'améliorer l'efficacité des antimicrobiens actuellement disponibles. Chez *E. coli*, l'inhibition du système de réparation SOS, un système de survie activé par les oxydants et les lésions de l'ADN, renforce la mort cellulaire induite par plusieurs bactéricides (93, 94). Aussi, l'effet bactéricide des aminoglycosides est accru par l'inhibition de régulateurs impliqués dans la réponse adaptative au stress membranaire (95).

Des évidences indirectes suggèrent également une implication des DRO et de la réaction de Fenton dans le mode d'action des bactéricides chez *S. pneumoniae*. En effet, il a été démontré qu'une mutation perte de fonction sélectionnée au niveau du gène *spr1178* codant pour une perméase de fer chez une souche résistante à la PEN confère une protection croisée contre l'accumulation de DRO induits par trois antibiotiques bactéricides, soit la PEN, la ciprofloxacine et la Kan (96). Aussi, une étude d'expression génique par puces à ADN chez *S. pneumoniae* a montré que l'antibiotique bactéricide levofloxacine induit la surexpression de l'opéron *fatDCEB* codant pour un transporteur de fer, ce qui a comme conséquence d'augmenter la concentration intracellulaire d'ions de fer et abouti ultimement à l'accumulation de DRO (97). Cependant, l'absence du cycle de Krebs chez *S. pneumoniae* (98) ne concorde pas avec le modèle universel proposé quant au mode d'action des antibiotiques bactéricides. Il est également important de noter que le comportement de *S. pneumoniae* en présence des radicaux libres est particulier comparativement à d'autres bactéries (99). Par exemple, le pneumocoque manque de catalase et son génome ne contient aucun orthologue des régulateurs de la réponse au stress oxydatif tels que SoxRS et OxyR présents chez d'autres organismes (100, 101). Des événements particuliers sont donc susceptibles d'intervenir chez *S. pneumoniae* quant au mode d'action des antibiotiques et de la réponse cellulaire induite par ceux-ci.

Finalement, plusieurs études publiées après 2013 continuent à défendre ou à contredire ce mécanisme (102). Cette controverse sert à nous rappeler qu'il reste encore beaucoup à apprendre sur les bactéries et sur leur mode de vie et de mort, en particulier en présence d'antibiotiques (103).

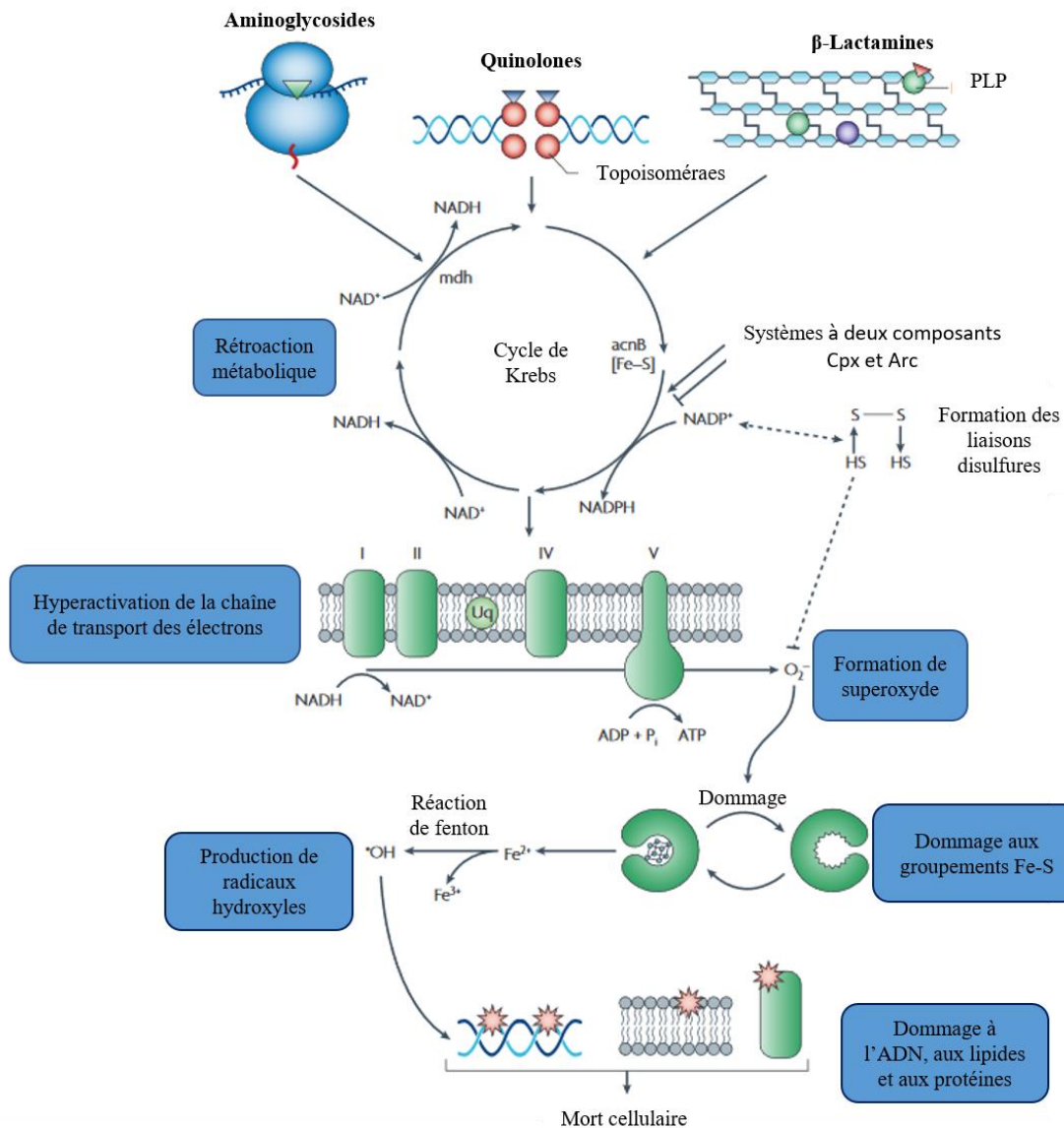


Figure 5. Mécanisme commun de mort cellulaire induite par les antibiotiques bactéricides

Adaptée de Kohanski MA. *et al.* (79).

Chapitre 3 - Les antibiotiques : mécanismes de résistance

« L'intelligence c'est la faculté de s'adapter au changement »

Stephen Hawking (1942-2018)

3.1. La résistance intrinsèque

La résistance aux antibiotiques est un phénomène écologique naturel et le produit de milliards d'années d'évolution. Des études de microorganismes provenant de sites vierges, ont montré que la résistance se produit en l'absence d'activité humaine (104, 105). La plupart des composés antimicrobiens sont des molécules produites naturellement et, en tant que telles, les bactéries productrices et co-résidentes ont mis au point des mécanismes pour surmonter leurs actions et survivre. Ainsi, ces organismes sont souvent considérés comme étant « intrinsèquement » résistants à un ou plusieurs antimicrobiens.

La résistance intrinsèque se réfère aux propriétés inhérentes d'un microorganisme qui limitent l'action des antimicrobiens (106). La membrane externe spécifique aux bactéries à Gram négatif constitue une barrière de perméabilité empêchant certains antibiotiques d'accéder à leurs cibles, ceci les rend intrinsèquement plus résistantes que les bactéries à Gram positif (107). Par exemple, la vancomycine, une molécule volumineuse de la famille des glycopeptides, est le traitement de choix contre les souches de *S. aureus* résistantes à la méthicilline (MRSA), mais elle est complètement inefficace contre les bactéries à Gram négatif en raison de l'impossibilité de franchir la membrane externe (108). Chez *P. aeruginosa*, la barrière de perméabilité est davantage renforcée par le manque, au niveau de sa membrane externe, de porines non spécifiques par lesquelles les antimicrobiens peuvent pénétrer. De plus, *P. aeruginosa* exprime également une gamme de pompes d'efflux de médicaments conférant une résistance à de nombreuses classes d'antibiotiques (109).

Certaines espèces bactériennes produisent naturellement des enzymes nommées β -lactamases qui détruisent les antibiotiques de la classe des β -lactamines avant que ceux-ci

ne puissent atteindre leur cible (110). Nous aborderons leurs rôles dans la résistance dans le chapitre 4 de cette thèse.

Des études de criblage à haut débit des génomes de bibliothèques de mutants, créés par insertion ciblée ou mutagenèse aléatoire par transposon chez des bactéries telles que *E. coli* et *S. aureus*, a permis l'identification de nombreux gènes responsables de la résistance intrinsèque aux antibiotiques de différentes classes, y compris les β -lactamines, FQ et aminoglycosides (111, 112).

3.2. La résistance acquise

La résistance acquise se produit quand un organisme sensible à un antibiotique devient résistant par l'acquisition de gènes ou à la suite de mutations (106).

3.2.1. Stratégies génétiques

Les bactéries ont une plasticité génétique remarquable qui leur permet de répondre à plusieurs menaces environnementales, y compris la présence des antibiotiques. Elles utilisent deux stratégies génétiques majeures pour s'adapter à l'attaque des antibiotiques : a) des mutations, dans un ou plusieurs gènes, souvent associées au mécanisme d'action du composé, et b) l'acquisition d'ADN étranger codant pour des déterminants de la résistance par transfert horizontal de gènes qui se fait par transformation, conjugaison ou transduction.

3.2.1.1. Résistance due aux mutations

En présence de l'antibiotique, une sous-population de cellules bactériennes issues d'une population susceptible développe des mutations dans des gènes qui affectent l'activité du médicament, ce qui permet de préserver la survie des bactéries. Une fois qu'un mutant résistant émerge, l'antibiotique élimine la population susceptible et les bactéries résistantes prédominent (113). Dans de nombreux cas, les changements mutationnels menant à la résistance coûtent cher à l'homéostasie cellulaire et ne sont maintenus que si cela est

nécessaire en présence de l'antibiotique (113). Des exemples de résistance aux antimicrobiens due à des changements mutationnels seront présentés dans les sections qui suivent.

3.2.1.2. Transfert horizontal de gènes

La plupart des agents antimicrobiens utilisés en pratique clinique sont des produits naturellement présents dans l'environnement. Ainsi, l'échange génétique entre les bactéries intrinsèquement résistantes et leurs environnements est une source importante de l'acquisition de gènes de résistance chez les bactéries pathogènes. Cet échange a été impliqué dans la dissémination de la résistance à de nombreux antibiotiques fréquemment utilisés (114). Chez les bactéries, le transfert horizontal aboutissant à l'acquisition d'ADN exogène se fait principalement selon trois stratégies :

a- La transformation

Le phénomène de la transformation a été décrit pour la première fois par Frederick Griffith en démontrant, en 1928, que des déterminants de la virulence pouvaient être transférés entre pneumocoques chez des souris infectées (115). Plus tard, en 1944, Oswald Avery et ses collaborateurs ont prouvé que ce phénomène était médié par l'absorption du matériel génétique « l'ADN » (116). Et ce fut la première preuve que le transfert horizontal de gènes pouvait avoir lieu.

La transformation bactérienne naturelle est considérée comme un processus parasexuel impliquant deux partenaires : un ADN exogène et une cellule réceptrice compétente. L'internalisation de l'ADN exogène et l'intégration dans le génome du récepteur par recombinaison homologue permettent aux bactéries d'acquérir de nouveaux traits génétiques et de s'adapter aux changements dans les conditions environnementales, en favorisant, par exemple, la résistance aux antibiotiques. Contrairement à d'autres mécanismes de transfert horizontal de gènes, telles que la transduction et la conjugaison, la transformation est entièrement dirigée par la cellule réceptrice et toutes les protéines requises sont codées par son génome. En plus de *S. pneumoniae*, à peu près 80 espèces se

sont avérées naturellement transformables, telles que *H. influenzae*, *N. gonorrhoeae* et *B. subtilis* (117).

b- La conjugaison

En 1946, Joshua Lederberg et Edward Tatum ont découvert le phénomène de la conjugaison bactérienne en mélangeant deux mutants d'*E. coli* ayant des besoins nutritionnels différents. En effet, individuellement, les deux souches ne pouvaient pas pousser sur un milieu minimum. À la suite du mélange, des colonies dans lesquelles un échange de matériel génétique a eu lieu ont pu pousser sur ce milieu (118).

La conjugaison bactérienne est le transfert génétique d'ADN nécessitant un contact entre une bactérie donatrice contenant le plasmide conjugatif et une bactérie réceptrice, par l'intermédiaire de pili sexuels chez les bactéries à Gram négatif, ou des protéines d'adhésines localisées à la surface des bactéries à Gram positif (119). Ceci est suivi par la formation d'un pont cytoplasmique permettant le transfert de l'ADN qui débute au site appelé « origine de transfert » où des protéines (relaxase et primase) sont impliquées. Par conséquent, après le transfert, les deux bactéries se retrouvent avec une copie du plasmide circulaire double brin (120).

Entre 1940 et 1950, Barbara McClintock a découvert le phénomène de transposition en étudiant le phénomène d'entrecroisement chez le maïs (121). Les éléments génétiques mobiles tels que les transposons (Tn) sont des segments d'ADN qui peuvent s'associer à des gènes de résistance, ils sont capables de se déplacer presque au hasard vers de nouveaux emplacements dans les mêmes molécules d'ADN ou dans des molécules différentes dans une même cellule. D'autres éléments, les intégrons, utilisent la recombinaison à des sites spécifiques pour déplacer des gènes de résistance entre sites définis. Par conjugaison, les éléments génétiques mobiles portant des gènes de résistance se partagent entre les bactéries, ce mécanisme est médié par des plasmides ou des éléments conjugatifs intégratifs (Tn conjugatifs) (122).

La conjugaison se produit le plus souvent chez les bactéries à Gram négatif (*P. aeruginosa*, *E. coli* et chez certaines entérobactéries) (122) mais se trouve également chez certaines bactéries à Gram positif telle que *S. pneumoniae* (123).

c- La transduction

Les éléments génétiques mobiles portant des gènes de résistance peuvent les transférer aux bactéries par transduction. La transduction se produit au moyen des bactériophages lytiques ou tempérés. Lors de l'infection, les phages tempérés intègrent leur ADN dans le chromosome de l'hôte et le prophage peut rester dormant dans l'hôte jusqu'à ce qu'un stress induise l'excision du phage à partir du chromosome, ce qui conduit à la formation de particules de phage et à la lyse de la cellule hôte. Les phages lytiques n'intègrent pas leur ADN dans le chromosome de l'hôte, mais induisent la formation immédiate de particules de phage et la lyse de la cellule hôte (124). Après infection par un bactériophage, l'ADN bactérien est parfois empaqueté accidentellement dans la capsid du bactériophage. Une capsid contenant de l'ADN bactérien est capable de se lier à une cellule receveuse et d'injecter l'ADN étranger. La transduction se produit quand l'ADN bactérien transféré est recombéné dans le génome de la cellule réceptrice (125).

Des études ont montré que la transduction contribue à la diffusion de gènes de résistance aux antibiotiques chez *E. coli* (124), *K. pneumoniae* (126) et *P. aeruginosa* (127). Chez *S. pneumoniae*, de nombreuses souches testées contenaient des prophages ou des fragments provenant de ceux-ci (128). Un gène conférant la résistance à la tétracycline a été associé à un prophage de pneumocoques (129).

3.2.2. Stratégies moléculaires

Au cours de l'évolution, les bactéries ont développé de nombreux mécanismes sophistiqués de résistance aux antibiotiques. La résistance à une classe d'antimicrobiens peut généralement être obtenue par de multiples voies biochimiques, ainsi, une cellule bactérienne peut être capable d'utiliser un ensemble de mécanismes de résistance pour

survivre à l'effet d'un antibiotique (Figure 6). Nous présenterons dans la section suivante, les stratégies les plus pertinentes adoptées par les bactéries pour se protéger contre les effets des antimicrobiens en donnant quelques exemples de cas de résistance ayant un impact au niveau clinique, plus particulièrement chez *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*.

Il est à noter que les espèces bactériennes semblent avoir développé une préférence pour certains mécanismes de résistance par rapport à d'autres. Par exemple, le mécanisme prédominant de résistance aux β -lactamines chez les bactéries à Gram négatif est la production de β -lactamases, alors que la résistance à ces composés chez les organismes à Gram positif est principalement obtenue par la modification de leur cible, les protéines de liaison à la PEN (PLPs). Ces mécanismes feront l'objet du chapitre 4 de cette thèse.

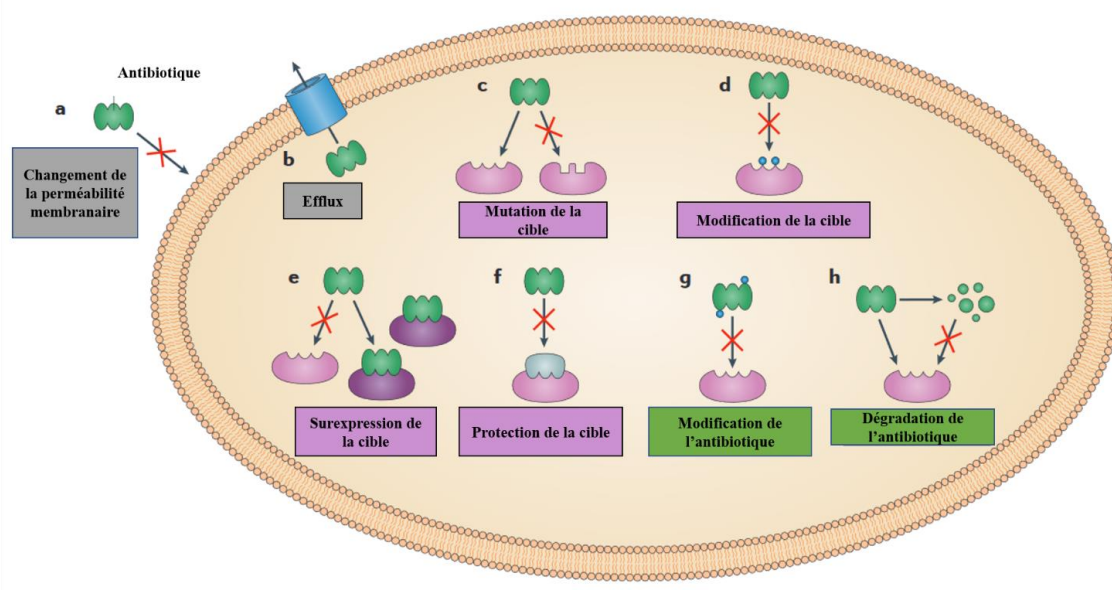


Figure 6. Les mécanismes de résistance aux antibiotiques

Adaptée de Wilson DN. (130).

3.2.2.1. Modification de l'antibiotique

a- Altération chimique de l'antibiotique

La production d'enzymes capables d'introduire des modifications chimiques dans la molécule antimicrobienne est un mécanisme de résistance qui se trouve chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Ceci affecte majoritairement les antibiotiques inhibant la synthèse des protéines au niveau des ribosomes (130). De nombreux types d'enzymes modificatrices ont été décrites et les réactions biochimiques les plus fréquentes qu'elles catalysent comprennent : 1) l'acétylation (CHL, streptogramines, aminoglycosides), 2) l'adénylation (aminoglycosides et lincosamides), 3) la glycosylation (macrolides), 4) l'hydroxylation (tétracycline et tigécycline), et 5) la phosphorylation (aminoglycosides, macrolides et CHL) (130). Quelle que soit la réaction biochimique, l'effet résultant est souvent lié à un encombrement stérique qui diminue la liaison de l'antibiotique à sa cible.

b- Hydrolyse de l'antibiotique

Les enzymes β -lactamases hydrolysent la liaison amide du cycle β -lactame des antibiotiques de la classe des β -lactamines, détruisant ainsi l'antibiotique. Nous expliquons plus en détail leurs rôles dans la résistance dans le chapitre 4.

Nombreuses autres enzymes induisent une destruction des antibiotiques. Par exemple, les estérases codées par les gènes *ere (A)*, *ere (B)* et *era (D)* hydrolysent le cycle lactone des macrolides chez les bactéries à Gram négatif et positif (15).

3.2.2.2. Prévention de l'accès à la cible

a- Réduction de la perméabilité

La membrane externe des bactéries à Gram négatif les rend naturellement plus résistantes aux antibiotiques que les bactéries à Gram positif. En effet, la membrane externe agit comme une barrière sélective en combinant une bicouche hydrophobe de

phospholipides et de LPS et porines. Les porines sont des protéines membranaires formant des canaux qui réduisent l'imperméabilité de la membrane externe aux composés hydrophiles tels que certains antibiotiques (β -lactames, tétracyclines et certaines FQ). Ainsi, des altérations de ces porines induisent souvent la résistance. Celle-ci peut être achevée par une diminution de l'expression du gène codant pour une porine ou bien par des mutations perte de fonction. Les porines non-spécifiques OmpC, OmpF et PhoE chez *E. coli*, OmpK35 et OmpK36 chez *K. pneumoniae* ainsi que la porine spécifique OprD chez *P. aeruginosa* sont liées à la résistance aux antibiotiques (27, 131).

b- Efflux de l'antibiotique

Plusieurs familles de pompes d'efflux ont été caractérisées à la fois chez les agents pathogènes à Gram négatif et Gram positif. Ces pompes jouent des rôles physiologiques comme le maintien de l'homéostasie cellulaire et la protection des bactéries de toxines environnementales (132). De ce fait, elles exportent activement les antibiotiques à l'extérieur de la cellule bactérienne, diminuant ainsi leurs concentrations intracellulaires et induisant la résistance. Certaines sont spécifiques d'un antibiotique alors que d'autres peuvent en expulser plusieurs, rendant les souches multirésistantes. Ainsi, ce mécanisme de résistance affecte un large spectre d'antibiotiques, notamment les inhibiteurs de la synthèse des protéines, les FQs, les β -lactamines, les carbapénèmes et les polymyxines. Les gènes codant pour les pompes d'efflux peuvent être situés dans des éléments génétiques mobiles ou dans le chromosome (113). La surexpression des gènes codant pour ces pompes chez les bactéries multirésistantes est souvent due à une ou plusieurs mutations aux niveaux : 1) du réseau de régulation contrôlant l'expression de la pompe d'efflux (*p. ex.* répresseur local ou facteur de transcription global), ou 2) des sites intergéniques qui modifient l'expression des gènes de la pompe ou de leurs régulateurs (*p. ex.* promoteur) (114).

Ces pompes peuvent se regrouper en trois catégories selon leur source d'énergie fournie soit par un gradient de protons (familles MFS, RND et SMR), soit par un gradient d'ions sodium (famille MATE), ou par hydrolyse d'ATP (famille ABC) (132).

Chez les bactéries à Gram négatif, les systèmes d'efflux sont souvent des complexes protéiques tripartite formés d'une porine de la membrane externe, d'une pompe transmembranaire et d'une protéine périplasmique de jonction. Chez *E. coli*, la pompe de la famille RND, AcrAB-TolC est la mieux caractérisée, elle confère la résistance à de nombreux antibiotiques tels que le CHL, les tétracyclines, les FQs et les β -lactames. Chez *K. pneumoniae*, AcrAB induit la résistance aux β -lactamines et aux FQs (133), KexD assure aussi une mutlrésistance (134). Chez *P. aeruginosa*, MexAB-OprM est exprimée d'une façon constitutive, induisant ainsi la résistance à plusieurs antibiotiques tels que le CHL, les tétracyclines, les FQs, les β -lactames et la TMP (132). En plus, plusieurs isolats cliniques de *P. aeruginosa* surexpriment MexCD-OprJ et MexEF-OprN (135, 136).

Chez les bactéries à Gram positif, les systèmes d'efflux sont juste constitués d'une pompe (132). Chez *S. pneumoniae*, les pompes du type MFS comme MefE et MefA expulsent les macrolides, alors que la pompe PmrA et les transporteurs ABC (PatA/PatB) rendent la bactérie résistante aux FQs (132, 137).

Plusieurs pompes de la famille MFS sont responsables de la résistance aux tétracyclines. Actuellement, plus de 20 gènes *tet* ont été décrits. La majorité de ces gènes se trouvent préférentiellement chez les bactéries à Gram négatif, à l'exception de *tet (K)* et *tet (L)* qui prédominent chez les organismes à Gram positif (113).

3.2.2.3. Modification de la cible

La plupart des antibiotiques se lieent spécifiquement à leurs cibles avec une forte affinité, empêchant ainsi son activité normale. La résistance peut se produire à la suite de modifications de la cible empêchant l'efficacité de cette liaison tout en lui permettant de remplir sa fonction normale (114). Ce mécanisme de résistance peut être achevé par de nombreuses stratégies développées par les bactéries :

a- Mutations de la cible

La résistance aux FQs due à des mutations aux niveaux des ADN gyrases et/ou des topoisomérases a été observée chez plusieurs espèces bactériennes incluant *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* (138-141).

Des versions mutées des gènes *folA* et *sulA* (*folP*) codant pour la DHFR et la DHPS respectivement confèrent une résistance aux TMP et au SMX chez *S. pneumoniae* et *E. coli* (142-145).

Chez *S. pneumoniae*, la résistance aux macrolides a été observée en présence de mutations aux niveaux des gènes *rplD* et *rplV* codant pour les protéines 50S ribosomiques L4 et L22, respectivement (146, 147). Également, une délétion de 6 nucléotides dans le gène *rplD* rendait deux souches cliniques résistantes aux macrolides et au CHL et moins susceptibles au linézolide (148). Des mutations au niveau du domain V de l'ARNr 23S ont été trouvées chez des souches cliniques de *P. aeruginosa* résistantes à l'azithromycine (149).

Des mutations du gène *rpsJ* codant pour la protéine ribosomique S10 ont été détectées dans des mutants de laboratoire résistants à la tigécycline chez *S. pneumoniae*, *E. coli* et *K. pneumoniae* ; chez cette dernière ce gène a été dépisté chez des souches cliniques (150-153).

Des modifications de la cible par la formation de gènes « mosaïques » a été aussi observée chez les gènes codants pour des PLPs et conférant ainsi une résistance à la PEN chez *S. pneumoniae* (154).

b- Altérations enzymatiques de la cible

Un des exemples le mieux caractérisé de la résistance due aux altérations enzymatiques de la cible est celui de la méthylation de l'ARNr 23S. En raison de cette

modification biochimique, la liaison de la molécule antimicrobienne à sa cible est altérée. Cette réaction catalysée par une enzyme codée par les gènes *erm* entraîne une résistance aux macrolides, lincosamides et streptogramine B. Ce mécanisme a été observé chez *E. coli*, *S. pneumoniae* et chez de nombreuses bactéries à Gram positif (155, 156).

Chez les bactéries à Gram négatif incluant *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*, les méthyltransférases de l'ARNr 16S, ArmA, RmtB et NpmA, confèrent un haut niveau de résistance à tous les aminoglycosides utilisés en clinique en modifiant le site A de l'ARN 16S (157).

Ces dernières années, en raison d'un manque de thérapies alternatives, la colistine (Polymyxine E) a largement été utilisée dans le traitement des infections par *P. aeruginosa*, les entérobactéries (*p. ex. E. coli* et *K. pneumoniae*) et *Acinetobacter* spp, par conséquent, la résistance s'est développée. Comme il a été mentionné dans la section 2.2, la colistine interagit avec le LPS afin de pénétrer dans la cellule des bactéries à Gram négatif ; ainsi, des modifications du LPS par plusieurs mécanismes ont été observées, nous citons la résistance médiée par un plasmide portant le gène *mcr-1* encodant pour une phosphoéthanolamine (pEtN) transférase qui ajoute la pEtN sur le lipide A produisant ainsi un LPS plus cationique (15).

c- Remplacement ou contournement de la cible

Les bactéries sont capables de développer de nouvelles cibles qui remplissent des fonctions biochimiques similaires à celles de la cible d'origine mais qui ne sont pas inhibées par l'antibiotique (113). La résistance à la méthicilline chez *S. aureus* due à l'acquisition d'une PLP exogène (PLP2a) et la résistance à la vancomycine chez les entérocoques par le biais de modification de la structure du PG sont parmi les exemples cliniques les plus pertinents de cette stratégie (113).

Une autre façon d'éviter l'action antimicrobienne consiste à « contourner » la voie métabolique que l'antibiotique inhibe en surproduisant la cible. Un exemple pertinent de ce mécanisme est la résistance au TMP-SMX. Comme il a été mentionné dans le chapitre 2, ces antibiotiques empêchent la synthèse bactérienne des purines et de certains acides aminés essentiels en affectant la voie de la synthèse du folate, en profitant du fait que la plupart des bactéries sont incapables d'incorporer du folate provenant de sources externes (113). Le mécanisme de résistance consiste alors à surproduire la DHFR ou la DHPS par le biais de mutations dans la région promotrice de l'ADN codant pour ces enzymes. Ces mutations entraînent la production de quantités accrues des enzymes ci-dessus, inhibant ainsi la capacité de TMP-SMX à inhiber la production du folate et permettant la survie des bactéries. Ce mécanisme a été observé chez plusieurs bactéries à Gram négatif et positif, telles qu'*E. coli*, *K. pneumoniae* et *S. pneumoniae* (158, 159).

d- Protection de la cible

Bien que certains des déterminants génétiques codant pour les protéines qui assurent la protection de la cible aient été trouvés dans le chromosome bactérien, la plupart des gènes cliniquement pertinents impliqués dans ce mécanisme de résistance sont portés par les éléments génétiques mobiles.

Ce mécanisme est effectué par plusieurs protéines comme Tet (M) et Tet (O). Brièvement, ces protéines vont interagir avec le ribosome en empêchant la tétracycline de se lier à son site de liaison induisant ainsi la résistance. Ceci a été observé chez plusieurs bactéries dont *S. pneumoniae* et *E. coli* (15).

Un autre exemple de protection de la cible est la protéine de résistance à la quinolone Qnr. La résistance médiée par des plasmides portant ce gène, ayant différents allèles *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS* et *qnrVC*, a été observée en clinique chez *E. coli* et *K. pneumoniae*. Cette protéine appartient à la famille des pentapeptides répétés. Elle agit comme un homologue de l'ADN et entre en compétition avec l'ADN pour la liaison avec la

topoisomérase II ou IV. Cette réduction de l'interaction topoisomérase-ADN réduit la sensibilité des bactéries aux quinolones (160, 161).

3.3. La résistance adaptative

Il n'existe pas une définition universellement acceptée pour la résistance adaptative mais l'une des définitions utilisées dans la littérature est celle proposée par Fernández et Hancock en 2012. Ils définissent cette résistance comme étant une augmentation temporaire de la capacité d'une bactérie de survivre à une attaque d'antibiotiques en modifiant l'expression de gènes et/ou de protéines à la suite d'une exposition à un environnement déclencheur comme le stress, les conditions nutritionnelles, l'état de croissance, et des concentrations sous-inhibitrices des antibiotiques eux-mêmes. Par opposition aux mécanismes de résistance intrinsèque et acquise, qui sont stables et peuvent être transmis verticalement aux générations suivantes, la résistance adaptative a un caractère transitoire et elle est réversible en absence de l'élément déclencheur (162).

De nombreux phénomènes ont été rapportés pour expliquer le développement de ce type de résistance, à savoir l'héritage épigénétique, le taux de mutation élevé, l'amplification des gènes, les pompes d'efflux, la structure et l'hétérogénéité de la population et la formation de biofilms (106, 163-165).

La résistance adaptative était considérée comme un mécanisme qui confère un bas niveau de résistance. Néanmoins, elle a été impliquée dans la résistance de *P. aeruginosa* aux polymyxines qui sont considérées comme des médicaments de dernier recours (166). Elle était également responsable d'un mécanisme de multirésistance chez *E. coli* (167).

Chapitre 4 - La classe des β -lactamines : gagnante ou vaincue ?

« *Après avoir gravi une haute colline, on se rend seulement compte qu'il y a encore beaucoup de collines à gravir* »

Nelson Mendella (1918 - 2013)

Les bactéries en croissance doivent avoir des mécanismes robustes pour maintenir leur forme et la transmettre à leur progéniture. Chez la plupart des bactéries, la forme des cellules est maintenue par la paroi cellulaire composée principalement par le PG. La paroi cellulaire empêche la lyse cellulaire en fournissant une stabilité contre la pression osmotique différentielle entre les milieux intracellulaire et extracellulaire. Le PG (ou muréine) qui entoure la membrane interne est un hétéropolymère composé de chaînes de glycanes réticulées par de courts peptides. La structure de la paroi cellulaire est maintenue par les activités combinées des protéines PLPs qui synthétisent le PG et des autolysines qui l'hydrolysent. Ensemble, ces protéines remodelent en permanence le PG pendant la croissance et la division cellulaire (168).

Les β -lactamines (y compris les PENs, carbapénèmes et céphalosporines) et les glycopeptides (*p. ex.* vancomycine et téicoplanine) font partie des classes d'antibiotiques qui interfèrent avec des étapes spécifiques de la biosynthèse homéostatique de la paroi bactérienne. L'inhibition de la synthèse de cette dernière peut entraîner des modifications de la forme et la taille des cellules, l'induction des mécanismes cellulaires en réponse au stress et finalement la lyse cellulaire (79). Cependant, des études effectuées sur *S. pneumoniae* ont montré que les β -lactames peuvent aussi induire une mort cellulaire non lytique (169, 170). Nous allons nous concentrer sur la classe des β -lactamines, plus particulièrement sur la PEN et l'IMP.

4.1. Le peptidoglycane

4.1.1. Structure et composition

Le PG est un hétéropolymère composé de chaînes formées de répétition d'unités disaccharidiques composées de *N*-acétylglucosamine (NAG) liée par une liaison glycosidique β (1-4) à un acide *N*-acétylmuramique (NAM). Une chaîne pentapeptidique s'attache par une liaison amide au groupement carboxyle de l'acide lactique du NAM. Ce pentapeptide est composé d'une séquence d'acides aminés D et L : 1) L-alanine (L-Ala), 2) acide D-glutamique (D-Glu) ou D-isoglutamine (D-iGln), 3) acide méso-diaminopimélique (m-DAP) ou L-Lysine (L-Lys), 4 et 5) D-Ala. Il existe certaines variations dans le nombre et la nature des acides aminés dans la réticulation du PG, par exemple, *S. pneumoniae* possède un D-iGln en position 2 et une L-Lys en position 3, alors que la majorité des bactéries à Gram négatif ont un acide m-DAP à cette position. La chaîne peptidique est réticulée à la chaîne peptidique d'un autre brin entre le groupe carboxyle du résidu D-Ala en position 4 et le groupe amine du résidu m-DAP (ou L-Lys) en position 3, soit directement, comme c'est le cas chez *E. coli*, soit via un court pont peptidique, comme le cas de *S. pneumoniae*, où le pont peut être formé de L-Ala-L-Ala ou de L-Ser-L-Ala, mais un pontage direct est aussi possible (171, 172).

4.1.2. Synthèse du peptidoglycane

La synthèse du PG est un processus complexe divisé en trois étapes :

4.1.2.1. Étape I de la biosynthèse du peptidoglycane

Les réactions de la première étape se produisent dans le cytoplasme (Figure 7A). Les enzymes GlmS, GlmM et GlmU sont responsables de la synthèse de l'uridine diphosphate UDP-NAG à partir du fructose-6-phosphate. Les enzymes MurA et MurB sont responsables de la formation de l'UDP-NAM à partir de son précurseur l'UDP-NAG, la formation de l'UDP-NAM-pentapeptide se fait suite à l'addition de cinq acides aminés à l'UDP-NAM par les enzymes MurC à MurF. La séquence peptidique peut varier d'une espèce à l'autre, mais les deux derniers résidus d'acides aminés doivent être constitués d'un

fragment D-Ala-D-Ala. Celui-ci est synthétisé en deux étapes, commençant d'abord par l'isomérisation de L-Ala en D-Ala par l'alanine racémase, et suivie de la formation du dipeptide catalysée par une ligase (*p. ex.* DdlA ou DdlB). Cet UDP-NAM-pentapeptide soluble devient associé à la membrane bactérienne à l'étape suivante (173).

4.1.2.2. Étape 2 de la biosynthèse du peptidoglycane

Dans la deuxième étape, la molécule UDP-NAM-pentapeptide est liée à une molécule lipidique de transport qui est liée à la membrane, appelée undécaprényl-phosphate, par l'action du phospho-*N*-acétylmuramoyl-pentapeptide transférase, MraY. Le premier lipide intermédiaire, l'undécaprényl-pyrophosphoryl-NAM-pentapeptide formé à ce stade, est appelé lipide I (Figure 7B). Dans l'étape suivante, MurG, une *N*-acétylglucosaminyl-transférase, ajoute un groupe soluble UDP-NAG au lipide I formant ainsi un second intermédiaire lipidique, l'undécaprényl-pyrophosphoryl-NAM-pentapeptide-NAG (lipide II), qui devient l'unité monomère finale du polymère du PG (Figure 7B) (174). Il est à noter que l'amidation du second résidu D-Glu en D-iGln par l'amido-transférase MurT/GatD est nécessaire pour une réticulation efficace du PG chez *S. pneumoniae* (175). A ce stade, le lipide II est toujours dans le compartiment cytoplasmique et doit être transféré à l'extérieur de la membrane, ceci se produit dans la troisième étape .

4.1.2.3. Étape 3 de la biosynthèse du peptidoglycane

La translocation du lipide II à la surface externe de la membrane cytoplasmique s'effectue par l'activité d'une «flippase». L'identité de cette flippase a fait l'objet de nombreux débats, les candidates étant FtsW, MurJ et AmJ (176). Cependant, chez *E. coli* des études ont récemment confirmé que cette activité de «flippase » est réalisée par MurJ (177, 178). Une fois à l'extérieur de la membrane, il se produit une polymérisation d'unités monomères et une liaison du matériel nouvellement formé à la paroi cellulaire préexistante. Cette dernière étape de la biosynthèse des PGs est catalysée par les enzymes membranaires à activité transglycosylase (TG) et transpeptidase (TP), connues sous le nom de PLPs (Figure 7C). Les TGs catalysent la formation des chaînes glycanes linéaires et les

TPs catalysent la formation des ponts peptidiques entre deux chaînes de glycanes adjacentes (173).

a- Les protéines de liaison à la pénicilline

Les PLPs sont des enzymes ancrées à la membrane et impliquées dans la dernière étape de la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne. Elles sont des cibles pour les antibiotiques β -lactames. Ces protéines sont classées en fonction de leurs poids moléculaires et de la structure de leurs domaines conservés. Les PLPs de classe A à haut poids moléculaire sont des protéines bifonctionnelles ayant des activités TG et TP. Les PLPs à haut poids moléculaire de classe B sont des TP monofonctionnelles. Enfin, les PLPs de classe C ou à faible poids moléculaire sont des D, D-carboxypeptidases ou des D, D-endopeptidases (179).

S. pneumoniae possède trois PLPs de classe A (PLP1a, PLP1b et PLP2a), deux PLPs de classe B (PLP2x et PLP2b) et une PLP de classe C (PLP3) ayant une activité D, D-carboxypeptidase. PLP2x et PLP2b jouent un rôle essentiel dans la synthèse du PG septal et périphérique, respectivement, et constitue donc probablement une cible critique pour les β -lactames. PLP2x est l'équivalent fonctionnel de PLP3 (FtsI) chez *E. coli*, car l'inactivation de PLP2x de *S. pneumoniae* par la méthicilline et l'inactivation ou la déplétion de PLP3 d'*E. coli* entraînent la formation de cellules filamenteuses. De même, la déplétion de PLP2b de *S. pneumoniae* et l'inactivation ou la déplétion de PLP2 d'*E. coli* entraînent l'apparition de cellules sphériques. Contrairement aux PLPs de classe B, chacune des PLPs de classe A et PLP3 peut être supprimée individuellement chez *S. pneumoniae*, mais les doubles mutants de *plp1a* et *plp2a* ne sont pas viables (179).

Les PLPs à haut poids moléculaire des bactéries à Gram négatif catalysent la synthèse du PG, tandis que les PLPs à faible poids moléculaire catalysent la maturation du PG (180).

E. coli possède 12 PLPs dont trois de la classe A. PLP1a et PLP1b sont les principales transpeptidases-transglycosylases. La suppression de l'une d'elles n'est pas

létale pour les bactéries. Le rôle de PLP1c n'est pas bien compris, elle n'est pas affectée par la plupart des β -lactamines. Les deux PLPs de la classe B d'*E. coli* sont des TP monofonctionnelles. PLP2 est impliquée dans l'élongasome, un complexe protéique dynamique spécifique de l'élongation cellulaire alors que PLP3 (FtsI) est une protéine majeure du divisome, le complexe protéique de la division cellulaire. Les sept PLPs à faible poids moléculaire d'*E. coli* sont impliquées dans la séparation cellulaire, la maturation ou le recyclage du PG. PLP4 et PLP7 sont deux endopeptidases qui clivent les ponts croisés entre deux chaînes glycanes. PLP5 est la carboxypeptidase la plus abondante, et ne coupe que la liaison terminale D-Ala-D-Ala rendant la chaîne peptidique indisponible pour la transpeptidation. PLP6 et PLP6b ont des séquences homologues à PLP5 et leur activité est, comme PLP5, celle d'une carboxypeptidase stricte. Le rôle de PLP4b est indéterminé alors qu'AmpH est associée au recyclage du PG (181).

Des analyses bioinformatiques suggèrent la présence de 8 homologues des PLPs d'*E.coli* chez *P. aeruginosa* PLP1a, PLP1b, PLP2, PLP3, PLP4, PLP5, PLP6 et PLP7 et une PLP spécifique de *P. aeruginosa*, la PLP3a. Cependant, la caractérisation enzymatique de la plupart de ces protéines n'a pas encore été effectuée (182).

Quant à *K. pneumoniae*, elle possède 7 PLPs : PLP1a, PLP1b, PLP2, PLP3, PLP4, PLP5 et PLP6 (183).

b- Polymérisation du peptidoglycane

Les PLPs de classe A initient la synthèse de chaînes de glycanes à partir de deux molécules de lipide II, l'une donnant son disaccharide NAG-NAM à l'autre en tant qu'accepteur (Figure 7C). L'élongation de la chaîne de glycanes se produit ensuite par addition séquentielle du disaccharide NAG-NAM fourni par des molécules supplémentaires de lipide II. Chaque transfert d'un disaccharide NAG-NAM du lipide II à l'hydroxyle en C4 de la NAG du brin accepteur libère son segment lipidique d'undécaprényl-pyrophosphate. Cet undécaprényl-pyrophosphate est ensuite soit déphosphorylé, soit utilisé comme donneur de phosphate dans la biosynthèse du LPS. Le site actif de la transpeptidase, présent

dans le domaine C-terminal des PLPs de classe A et B, transfère le groupement d'acyle du résidu D-Ala en position 4 de la chaîne peptidique au groupement amine du résidu m-DAP de la chaîne adjacente (m-DAP chez les bactéries à Gram négatif; L-Lys chez les bactéries à Gram positif) et libère le résidu D-Ala en position 5 (Figure 7D). Ce procédé de transfert d'acyle utilise la sérine du motif (Ser-X-X-Lys) absolument conservé du site catalytique comme accepteur d'acyle initial, formant ainsi un intermédiaire acyle-enzyme. Cet intermédiaire acyle est à son tour donneur d'acyle à l'amine m-DAP/L-Lys. La liaison amide résultante est appelée réticulation 4,3 car elle relie le résidu D-Ala (quatrième acide aminé de la chaîne du donneur) au résidu m-DAP/L-Lys (troisième acide aminé de la chaîne de l'accepteur) (Figure 7D). Une réticulation 3,3 peut se former entre deux m-DAP de chaînes de glycanes adjacentes, bien que ce ne soit qu'un produit mineur chez *P. aeruginosa* et *E. coli* (180). La transglycosylase G lytique liée à la membrane interne (MltG ou YceG) est potentiellement le catalyseur qui détermine la longueur de la chaîne de glycane, en terminant sa polymérisation (184).

4.1.3. Hydrolyse du peptidoglycane

Au cours du cycle de la division bactérienne, la synthèse et le remodelage de la paroi cellulaire sont coordonnés avec la constriction de la membrane, dirigée par l'homologue de la tubuline FtsZ (185).

Afin de maintenir la forme des bactéries et de permettre leur division cellulaire, le PG nécessite un remodelage constant. De nouvelles parties des chaînes de glycanes sont constamment attachées, tandis que les anciens matériaux sont simultanément libérés dans un processus connu sous le nom de renouvellement (turnover) du PG (186). En effet, cette maintenance se fait grâce à un équilibre délicat entre la synthèse de la paroi cellulaire par les PLPs, coordonnée par les PLPs à faible poids moléculaire, et sa dégradation par les hydrolases (180). Ces dernières constituent un élément essentiel de la physiologie des cellules bactériennes. En plus de leur rôle important dans la division cellulaire et le réarrangement de la paroi cellulaire, leurs activités affectent de nombreuses fonctions telles que l'adhésion bactérienne, la formation des biofilms, la sécrétion de protéines, la conjugaison, la virulence et la réponse immunitaire (187).

4.1.3.1. Les hydrolases : amidases, peptidases et glycosidases

Les *N*-acétylmuramyl-L-alanine amidases hydrolysent la liaison amide entre le NAM et la L-Ala séparant ainsi la chaîne de glycanes du peptide, tandis que les carboxypeptidases et les endopeptidases clivent les différentes liaisons L,D et D,D au sein des chaînes peptidiques. Les carboxypeptidases éliminent les acides aminés C-terminaux et les endopeptidases clivent les liaisons internes du peptide (188) (Figure 7E).

Il existe trois types d'enzymes de clivage des chaînes de glycanes (glycosidases) : les *N*-acétylglucosaminidases, les lysozymes et les transglycosylases lytiques (LTs). Ces deux dernières coupent la même liaison glycosidique β (1-4) entre les NAMs et les NAGs mais de deux façons différentes. En effet, les lysozymes hydrolysent cette liaison alors que les LTs effectuent une réaction de transacétalisation non hydrolytique qui coupe la liaison glycosidique entre le NAG et le NAM, transformant ce dernier en un produit anhydre, le 1,6-anhNAM (Figure 7F). Les LTs sont classées structurellement en tant que membres de la superfamille des glycosides hydrolases, bien que leur activité catalytique est non hydrolytique. Les LTs endolytiques clivent au milieu de la chaîne glycane tandis que les LTs exolytiques coupent à la fin de la chaîne glycane (180, 188).

4.1.3.2. Les hydrolases chez *S. pneumoniae*

Chez *S. pneumoniae*, 12 hydrolases ont déjà été identifiées, nous citons celles qui ont été mieux étudiées. L'hydrolase PcsB est une protéine extracellulaire essentielle qui se localise au site de division et permet une synthèse correcte du septum et la séparation cellulaire (189). Les protéines de liaison à la choline (PLCs) font partie des protéines de surface les plus étudiées du point de vue de leur contribution à la pathogenèse des pneumocoques et de leur potentiel d'immunoprotection pour améliorer les vaccins contre les pneumocoques. Parmi celles-ci figurent les PLCs qui possèdent une activité d'hydrolase du PG, LytA, LytB, LytC et CbpD. La LytA, une *N*-acétylmuramoyl-L-alanine amidase, est la première autolysine caractérisée chez *S. pneumoniae*. Elle est nécessaire pour l'autolyse en phase stationnaire (190). LytA, LytC et CbpD permettent la lyse induite par les

antibiotiques ainsi que la lyse fratricide (191). LytB est une endo- β -*N*-acétylglucosaminidase qui se localise aux pôles des cellules et sépare les cellules filles à la fin de la division cellulaire (190). PLP3 (DacA) assure la coordination spatiale du noyau FtsZ avec la machinerie de synthèse du septum, elle possède une activité D,D-carboxypeptidase qui clive le pentapeptide en tétrapeptides qui sera ensuite clivé en tripeptides par DacB, une L,D-carboxypeptidase (192). Pmp23 est une lysozyme importante pour la bonne morphologie et la division cellulaire de *S. pneumoniae*. Elle est nécessaire à la localisation correcte de la FtsZ. De plus, Pmp23 se trouve sur le site de division et interagit directement avec PLP2x (185, 193). MltG, une transglycosylase endolytique homologue de la MltG (YceG) d'*E. coli*, se localise avec les protéines de synthèse du PG périphérique pendant la division. Sa déplétion augmente la sphéricité des pneumocoques (194).

4.1.3.3. Les hydrolases chez *E. coli* et *P. aeruginosa*

Notre compréhension de la biochimie et de la biogenèse des parois cellulaires chez les bactéries à Gram négatif résulte principalement des études menées sur *E. coli*. Une connaissance incomplète de ces processus existe pour *P. aeruginosa* (182). Ainsi, nous décrirons brièvement les hydrolases du PG les plus pertinentes chez *E. coli*, en citant s'il y a lieu, celles de *P. aeruginosa*.

À noter que les peptidases d'*E. coli* et de *P. aeruginosa* PLP4 (DacB), PLP5 (DacA), PLP6 (DacC), PLP6b (DacD) et PLP7 ont été décrites dans la section 4.1.2.3.

E. coli possède quatre *N*-acétylmuramyl-L-alanine amidases (AmiA-AmiD) périplasmiques qui agissent comme une puissante enzyme de clivage peptidique. AmiA, AmiB et AmiC ont une homologie de séquence élevée et aident à la séparation des cellules pendant la division. La délétion de ces trois amidases affectent la formation du septum entraînant un phénotype d'enchaînement avec des agrégats de trois à six cellules. L'activité de ces trois enzymes est régulée de manière spatio-temporelle par des protéines ayant des domaines LytM. EnvC fait partie du complexe protéique du divisome et active AmiA et AmiB, alors que NlpD régule l'activité d'AmiC (195, 196). AmiD est ancrée au feuillet

interne de la membrane externe et elle est activée par de nombreux substrats, y compris les mucopeptides à chaîne courte et les 1,6-anhydromucopeptides. Elle ne contribue pas à la séparation cellulaire, et sa perte n'a aucun effet sur la morphologie de la paroi cellulaire. L'amidase AmpD cytoplasmique fait partie des enzymes qui dégradent le NAG-1,6-anhNAM tétra et tripeptides résultant du renouvellement du peptidoglycane (188) (Figure 71).

La plupart des LTs sont liées à la membrane (Mlt), ces LTs sont des lipoprotéines ancrées au feuillet interne de la membrane externe. Cependant, MltG est ancré au feuillet externe de la membrane interne. Certaines LTs sont des protéines dites solubles (Slt) car elles ne sont pas ancrées à la membrane, mais cela n'exclut pas leur implication dans des complexes multiprotéiques qui pourraient effectivement les ancrer. Actuellement, neuf LTs ont été identifiées chez *E. coli* : MltA, MltB/Slt35 (Slt35 est un produit de dégradation protéolytique de MltB), MltC, MltD, MltE (EmlA), MltF, MltG, RlpA et Slt70 (180). Elles sont toutes exolytiques, cependant, MltB, MltD, MltE et Slt70 sont aussi endolytiques (197).

P. aeruginosa possède des AmiA et AmiB périplasmiques. Ces deux protéines partagent une homologie avec celles d'*E. coli* et ont une activité *N*-acétylmuramyl-L-alanine amidase (182). La délétion d'*amiA* n'affecte pas la viabilité ou la morphologie des cellules de *P. aeruginosa*. AmiB est requise pour la séparation cellulaire lors de la division, car sa déplétion entraîne une croissance filamenteuse avec un net déficit dans l'invagination de la membrane interne. En plus, sa délétion diminue l'imperméabilité de la membrane externe. Ainsi, AmiB, contrairement à *E. coli*, était jugée essentielle pour la survie de *P. aeruginosa*. Elle nécessite la présence de plusieurs activateurs telles que NlpD, NlpS et EnvC (198). *P. aeruginosa* a également deux amidases périplasmiques, AmpDh2 et AmpDh3, qui jouent un rôle critique dans le recyclage des parois cellulaires. Les deux enzymes ont des homologies avec AmiD d'*E. coli* (199).

P. aeruginosa possède 11 LTs dont quatre sont solubles : MltA, MltB/Slt35, MltD, MltF, MltF2, MltG, RlpA, Slt, SltB1 (SltB), SltB2 (SltG) et SltB3 (SltH). Les LTs de *P. aeruginosa* sont à la fois endolytiques et exolytiques (182).

4.1.4. Recyclage du peptidoglycane

Les fragments de PG produits par les amidases et les LTs jouent un rôle important dans la pathogenèse des bactéries, par contre, ces mêmes fragments agissent comme des signaux puissants pour activer l'immunité de l'hôte. Un mécanisme pour réduire la perte du PG consiste à synchroniser les activités de renouvellement et de recyclage du PG, comme c'est le cas chez *E. coli*. Le renouvellement du PG est mineur chez *S. pneumoniae* ce qui est cohérent avec l'absence apparemment d'une voie de recyclage complète du PG. Ceci peut être un mécanisme qui permet aux cellules de *S. pneumoniae* de se développer de façon planctonique sans libérer de fragments de dégradation du PG qui avertiraient le SI inné de l'Homme (200). Ainsi, nous décrirons brièvement le mécanisme de recyclage du PG chez *E. coli* puisqu'il est le mieux étudié.

Le disaccharide NAG-1,6-anhNAM produit par les actions des amidases et des LTs, ainsi que le disaccharide NAG-anhNAM-peptides produit par les LTs dans le périplasme seront transportés vers le cytoplasme par la perméase membranaire AmpG (Figure 7H). Une fois dans le cytoplasme, la réaction de la *N*-acétylglucosaminidase NagZ sur les anhydrosaccharides élimine le fragment NAG pour donner le 1,6-anhNAM-peptide, qui sert ensuite de substrat à AmpD pour la synthèse *de novo* du PG (Figure 7I). En effet, AmpD coupe les anhydromuropeptides entre le groupement D-lactate et le résidu L-Ala en libérant ainsi la chaîne peptidique (Figure 7I). Le produit 1,6-anhNAM sera recyclé et convertit en glucosamine-6-phosphate (GlcN-6-P) à la suite d'une série de réactions catalysées par la kinase AnmK, l'étherase MurQ et la déacetylase NagA (Figure 7J). Le GlcN-6-P peut être converti en fructose-6-phosphate par la déaminase NagB ou bien isomérisé en GlcN-1-P par GlmM, pour commencer une biosynthèse *de novo* du PG (Figure 7K). Les chaînes peptidiques libérées sous l'action de l'AmpD peuvent être tri-, tétra ou pentapeptidiques. Les chaînes tétrapeptidiques seront dégradées par la L,D-carboxypeptidase LdcA en tripeptide. Par la suite, la muréine ligase Mpl catalyse la ligation du UDP-NAM au tripeptide, produisant ainsi l'UDP-NAM-tripeptide qui sera couplé au dipeptide D-Ala-D-Ala par MurF pour former l'UDP-NAM-pentapeptide et réintégrer ainsi la voie de biosynthèse du PG (Figure 7L) (201).

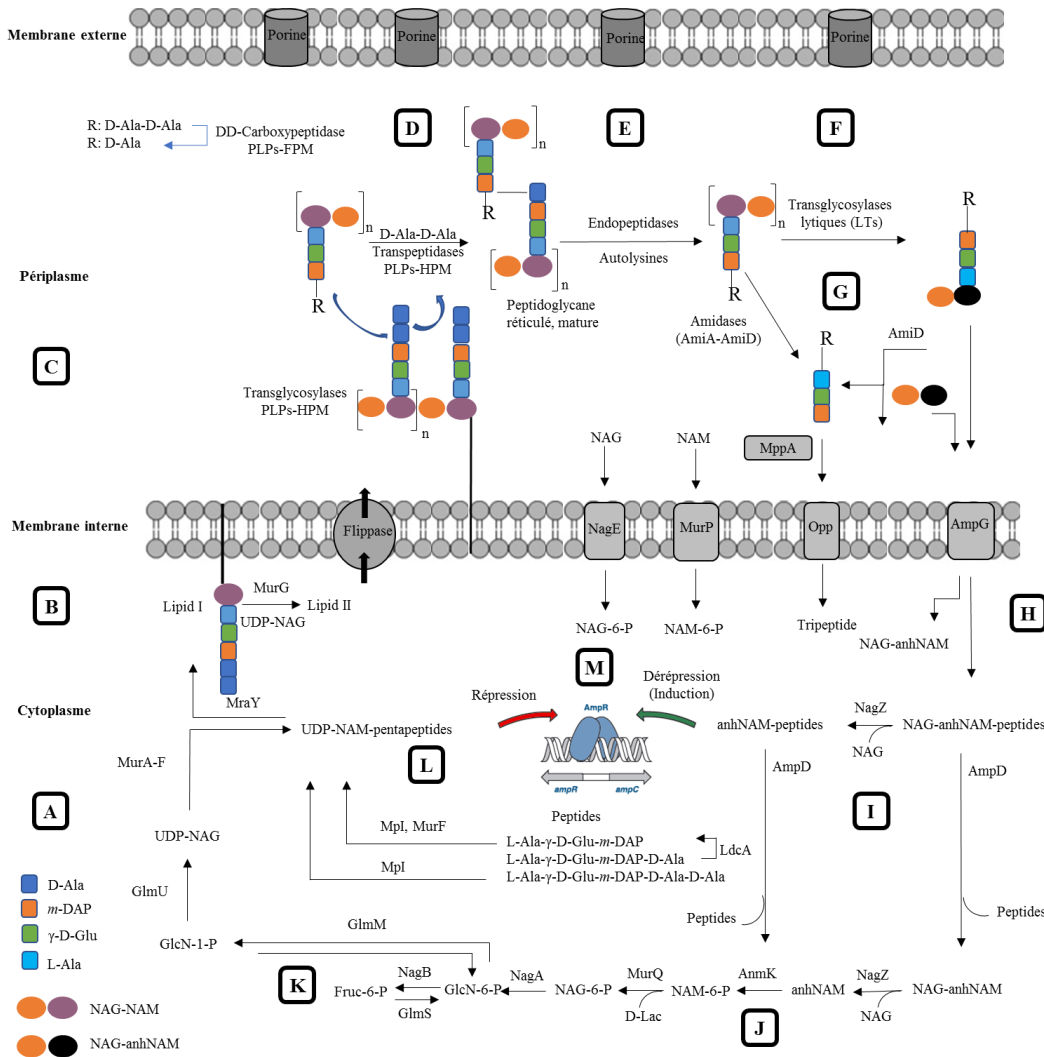


Figure 7. Résumé des étapes sélectionnées de la biosynthèse et le recyclage de la paroi cellulaire chez *E. coli*

A, B : étapes 1 et 2 de la biosynthèse du peptidoglycane (PG), C, D : étape 3 et polymérisation du PG, E, F et G : hydrolyse du PG, H à L : recyclage du PG, M : modulation de l'AmpC. NAG : *N*-acétylglucosamine, NAM : acide *N*-acétylmuramique, anhNAM : anhydro-NAM, PLP : protéines de liaison à la pénicilline, HPM : haut poids moléculaire, FPM : faible poids moléculaire. Adaptée de Johnson JW *et al.* (201).

4.2. Le mode d'action des β -lactamines

4.2.1. Les β -lactamines et leurs cibles primaires

Les antibiotiques β -lactames actuellement disponibles disposent d'un noyau β -lactame composé d'une fonction amide incluse dans un cycle carboné. Il y a cinq structures cycliques, y compris les pénames, pénèmes, carbapénèmes, céphalosporines et monobactames (202).

Le noyau β -lactame est un analogue du dipeptide D-Ala-D-Ala du PG (Figure 8). Il joue le rôle de substrat pour les PLPs. Il agit en formant un complexe covalent avec le résidu sérine du site actif du domaine TP de l'enzyme, conduisant à la formation d'un complexe acyl-enzyme intermédiaire empêchant la réticulation des chaînes peptidiques et induisant l'affaiblissement de la structure du PG (173).

Les pénames constituent un large groupe de β -lactames qui comprennent les pénicillines. Le noyau de base des PENs est une structure bicyclique, l'acide 6-aminopénicillanique ou 6-APA. Cette structure est composée d'un cycle de β -lactame et un cycle thiazolidinique (202) (Figure 8).

Les β -lactamines ont été parmi les premiers agents antimicrobiens disponibles pour la thérapie des maladies infectieuses. Cependant, au fil du temps, le développement de la résistance aux antibiotiques a engendré le besoin médical de composés ayant une activité à large spectre, une action bactéricide rapide, des propriétés limitées de développement de résistance et une bonne tolérance. Ainsi, en 1987, IMP était le premier antibiotique carbapénème utilisé en clinique car il avait une activité antimicrobienne très puissante et à large spectre avec un bon profil d'innocuité. L'IMP (*N*-formimidoyl-thiénamycine) est un dérivé semi-synthétique de la thiénamycine (Figure 8), 5 à 10 fois plus stable que son composé mère. L'atome de soufre dans le cycle thiazolidine de la molécule de PEN est remplacé par un atome de carbone et le groupe acylamino en position R1 est remplacé par une chaîne latérale hydroxyéthyle pour augmenter son activité bactéricide et sa stabilité envers les β -lactamases. L'IMP est rapidement dégradé par la déshydropeptidase rénale,

il a donc été associé à la cilastatine, un inhibiteur de cette enzyme. La cilastatine empêche non seulement la dégradation de l'IMP, mais aussi protège les reins contre les effets toxiques potentiels exercés par des doses plus élevées d'IMP. L'IMP et la cilastatine sont combinés dans un rapport de 1:1, mais la cilastatine n'exerce aucune activité antibactérienne propre (203, 204).

Comme toutes les autres β -lactamines, l'IMP inhibe la paroi cellulaire en inactivant les PLPs. Chez *E. coli* l'IMP inhibe l'activité TP des PLP1a, PLP1b et PLP2 et l'activité de la D-Ala carboxypeptidase de PLP4 et PLP5. Il provoque également une forte inhibition de l'activité TG de la PLP1a alors qu'il n'inhibe l'activité de la TP PLP3 que faiblement, ce qui est cohérent avec la conclusion qu'il a une faible affinité de liaison à la PLP3 et n'inhibe pas la formation du septum par les cellules. Ceci est à la différence de toutes les autres β -lactamines, y compris d'autres carbapénèmes qui se lient préférentiellement à PLP1 et PLP3. En conséquence, l'IMP induit la formation de sphères avec rupture ultérieure des cellules mais pas la croissance filamenteuse de bactéries observées pour d'autres β -lactamines. Le mode d'action de l'IMP permet une activité contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, cocci et bacilles, aérobies et anaérobies (203).

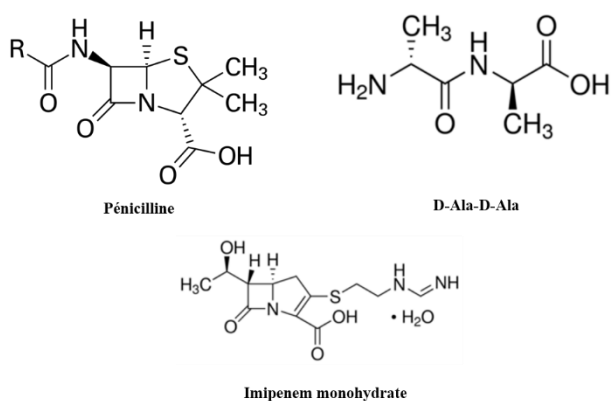


Figure 8. Structures de la pénicilline, la D-Ala-D-Ala et l'imipénème monohydrate

4.2.2. Une mort cellulaire lytique

Au début, on pensait que la mort cellulaire lytique suite à l'inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire par les β -lactamines a lieu lorsque la pression interne accumulée en raison de la croissance cellulaire dépasse l'expansion de la paroi cellulaire. Cependant, le mécanisme de la mort cellulaire dépendant de la lyse s'est révélé beaucoup plus complexe, impliquant de nombreux processus cellulaires actifs (79).

Un phénomène de tolérance aux antibiotiques a été observé chez *S. pneumoniae* déficiente en activité d'hydrolase. Cette suppression de l'activité autolytique endogène était possible en remplaçant d'une façon biosynthétique la choline de la paroi cellulaire par l'éthanolamine. Ce mutant ne poussait pas et ne mourait pas après un traitement avec une concentration d'un antibiotique β -lactame induisant une lyse (169).

Il a également été démontré que les autolysines jouent un rôle dans la mort cellulaire lytique chez des espèces bactériennes contenant de nombreuses hydrolases de PG, telles qu'*E. coli*. Chez cette dernière, il a été démontré qu'un ensemble d'hydrolases était important pour la lyse rapide à médiation par l'ampicilline. Un mutant d'*E. coli* n'ayant pas *amiA*, *amiB*, *amiC*, *mltC*, *mltD* et *emtA* est viable, cependant, sa lyse induite par la PEN a été retardée. Un mutant n'ayant pas *slt70*, *amiA*, *amiB*, *amiC*, *mepA*, *dacB* (PLP4) et PLP7 forme de longues chaînes qui se composaient de 20 à 100 cellules (205).

La découverte que les autolysines contribuent à la mort cellulaire a élargi notre compréhension de la lyse cellulaire et a montré que la dégradation active de la couche de PG par les hydrolases en combinaison avec l'inhibition de la synthèse du PG par un antibiotique β -lactame, déclenche la lyse (79).

4.2.3. Une mort cellulaire non-lytique

S. pneumoniae dépourvue d'activité hydrolase du PG peut encore être tuée par les β -lactamines, mais à un taux plus lent que celui des cellules autolysines-actives, indiquant qu'il existe un mode de mort indépendant de la lyse induite par les β -lactames (79). Des études suggèrent que certaines de ces voies non-lytiques sont régulées par des systèmes

à deux composants. Par exemple, chez *S. pneumoniae*, le système à deux composants vncSR contrôle l'expression de l'autolysine LytA et régule la tolérance à la vancomycine et à la PEN par l'intermédiaire d'une mort cellulaire qui peut être dépendante de la lyse mais aussi indépendante de la lyse (206). Aussi, l'inactivation du *pmp23* codant pour une lysozyme induit une augmentation de la sensibilité aux β -lactamines (193). Il est à noter que la diminution de l'autolyse menant à la tolérance est d'une importance particulière pour la médecine clinique. En effet, l'échec d'éradiquer les bactéries tolérantes pourrait entraîner à une prolongation et même un échec du traitement (206).

4.2.4. L'induction de la réponse SOS par les β -lactamines

Le traitement par les β -lactamines entraîne des modifications de la morphologie cellulaire associées à l'interaction de l'antibiotique avec les PLPs. En règle générale, chez *E. coli*, les inhibiteurs de PLP1 provoquent l'élongation cellulaire et sont de puissants déclencheurs de la lyse, les inhibiteurs de PLP2 modifient la forme des cellules mais ne provoquent pas de lyse. Les inhibiteurs de PLP3 influencent la division cellulaire et peuvent induire la filamentation (207). En conséquence, les β -lactamines se liant à la PLP1 sont les inducteurs les plus efficaces de l'activité hydrolase du PG et les inhibiteurs de PLP2 sont les activateurs les moins compétents d'autolysine (208).

Le système SOS est constitué de gènes sensibles aux dommages de l'ADN. L'induction de Sula ; un composant clé de ce système ; inhibe la septation suite à la liaison de Sula à FtsZ et induit la filamentation (209). Il est intéressant de noter que les β -lactamines qui inhibent la PLP3 (FtsI) et induisent la filamentation, stimulent le système à deux composants DpiAB, ce qui peut activer la réponse SOS (210). La létalité des β -lactamines peut être augmentée en perturbant la voie de signalisation de DpiAB ou en inactivant *sula*. Cela indique que Sula pourrait protéger contre la mort induite par les β -lactamines en protégeant FtsZ, et en limitant une interaction entre les PLPs et les hydrolases au niveau de l'anneau de la division cellulaire (79). À l'appui de cette idée, l'expression de Sula limite la lyse observée dans une souche d'*E. coli* exprimant FtsZ84

(un mutant de FtsZ actif uniquement sous certaines températures et conditions de milieu) et dépourvue de PLP4 et de PLP7 (211).

4.3. Les mécanismes de résistance à la pénicilline chez *S. pneumoniae*

4.3.1. Altérations des PLPs

S. pneumoniae possède un système dédié à l'acquisition d'ADN exogène de l'environnement. Des événements de transfert de gènes inter-espèces impliquant des espèces de streptocoques étroitement apparentées ont abouti à l'acquisition de *S. pneumoniae* de gènes de PLPs en mosaïque. La résistance aux β -lactamines chez les isolats cliniques de *S. pneumoniae* est médiée par des gènes en mosaïque codant pour des PLPs altérées avec des affinités de liaison aux antibiotiques inférieures à leurs versions natives. Bien que, *S. pneumoniae* contient six PLPs, les variantes de PLP2x, PLP2b et PLP1a sont considérées comme les plus importantes pour la résistance, et l'acquisition de variants de faible affinité PLP2x et PLP2b est une première étape essentielle pour l'acquisition de variants de PLP1a qui confèrent une résistance élevée aux β -lactamines. Un rôle dans la résistance aux β -lactamines a également été décrit pour d'autres PLPs, telles que PLP2a et PLP3.

4.3.2. Divers mécanismes

Les divers degrés de résistance observés parmi les isolats cliniques non susceptibles à la PEN suggèrent que la résistance implique d'autres processus complexes et multifactoriels, et la présence d'autres contributeurs non PLPs a bien été rapportée. Nous citons, ci-dessous, quelques exemples pertinents.

Les protéines MurM et MurN codées par un opéron murMN sont responsables d'une anomalie dans la synthèse de la paroi cellulaire par remplacement des mucopeptides linéarisés avec ceux atypiques ramifiés, et elles ont également été associées à la résistance à la PEN (172).

Chez *S. pneumoniae*, une proportion significative des résidus de NAG du PG est *N*-désacétylée. Il a été démontré que l'inactivation de *pdgA* codant pour une NAG désacétylase produisait des cellules exprimant des glycanes totalement *N*-acétylés plus sensibles aux lysozymes (212). Une mutation ponctuelle dans *pdgA* en présence d'autres mutations dans PLP2x confère un niveau élevé de résistance à la PEN (213).

Des facteurs de stress, tels que les antibiotiques, le stress oxydatif et les dommages de l'ADN induisent la production des protéines de choc thermique (HSP) chez les bactéries. Des mutants dépourvus de *clpL* codant pour une protéase, membre des HSP, étaient plus susceptibles à la PEN et avaient une paroi cellulaire plus mince que les souches parentales, tandis que les souches dans lesquelles *clpL* était surexprimé ont montré une résistance supérieure à la PEN et une paroi cellulaire plus épaisse. Cet effet était dû à la propriété de ClpL à stabiliser l'expression du *plp2x*, d'interagir avec PLP2x et de faciliter sa translocation (214).

La surexpression de *pstS* codant pour une sous-unité du transporteur de phosphate ABC confère la résistance à la PEN chez *S. pneumoniae*. L'inactivation du gène *pstS* dans un isolat clinique résistant a entraîné à une réduction significative de la résistance à la PEN. Il a été suggéré que le système Pst pneumococcique pourrait également faire partie d'une voie de signalisation (215), et que son expression modifiée pourrait affecter les voies de régulation liées à la résistance à la PEN (216).

Une mutation ponctuelle dans *ciaH*, faisant partie du système de régulation à deux composants CiaRH, active la régulation de la transcription de plusieurs gènes par le régulateur *ciaR* induisant une augmentation de la résistance au céfotaxime et un blocage des gènes de compétence génétique (217). Il a été aussi démontré que la suppression de *ciaR* en association avec une PLP2x modifiée entraînait à une lyse rapide, ce qui suggère qu'en absence d'un système de régulation CiaRH fonctionnel, la fonction de la PLP2x de faible affinité est altérée (218).

Le séquençage du génome entier (« WGS : Whole Genome Sequencing ») de quatre souches de *S. pneumoniae* sélectionnées pour la résistance au céfotaxime a démontré l'implication des mutations dans les gènes codant pour une glycosyltransférase, une peptidoglycane GlcNAc déacetylase, un transporteur ABC et une sortase dans la résistance à cet antibiotique (219).

Des expériences de transformation du génome entier de trois souches cliniques résistantes à la PEN dans *S. pneumoniae* R6 ont confirmé l'importance des protéines mosaïques de PLP2x, 2b et 1a dans la résistance à la PEN, mais ont également montré un nouveau rôle pour une alpha-amylase cytoplasmique conférant une résistance modérée à la PEN en présence d'altération des PLPs (220).

4.4. Les mécanismes de résistance aux carbapénèmes chez les bactéries à Gram négatif

4.4.1. Destruction de l'antibiotique par les β -lactamases

Le principal mécanisme de résistance aux β -lactamines chez les bactéries à Gram négatif repose sur la destruction de ces composés par l'action des β -lactamases. Ces enzymes détruisent la liaison amide du cycle β -lactame, rendant l'antibiotique inefficace. Les β -lactamases ont été décrites pour la première fois au début des années 1940, avant même l'introduction de la PEN sur le marché (221). Une pénicillinase codée par un plasmide qui se transmettait facilement entre des souches de *S. aureus*, entraînait une dissémination rapide de souches cliniques résistantes à la PEN. Afin de surmonter ce problème, de nouveaux composés β -lactamiques ayant un spectre d'activité plus large et une sensibilité moindre aux pénicillinases (telle que l'ampicilline) ont été fabriqués. Cependant, au cours des années 1960, une nouvelle β -lactamase appelée TEM-1 codée par un plasmide, capable d'hydrolyser l'ampicilline, a été retrouvée chez des bactéries à Gram négatif. Depuis lors, le développement de nouvelles générations de β -lactames a été systématiquement suivi de l'apparition rapide d'enzymes capables de détruire tout nouveau composé mis sur le marché (113, 222).

À ce jour, plus de 1300 β -lactamases différentes ont été décrites. Deux principales classifications ont été proposées pour regrouper ce grand nombre d'enzymes, la classification Bush-Jacoby et celle d'Ambler. Dans la suite de cette section, nous citons des exemples des différents types de β -lactamases en utilisant la classification d'Ambler qui se repose sur l'identité de la séquence d'acides aminés et sépare les β -lactamases en 4 groupes (A, B, C et D). Une enzyme de β -lactamase à spectre étendu « BLSE » a la capacité d'hydrolyser les PENs, les céphalosporines de 3ème génération et les monobactames, mais possède une activité modeste (ou nulle) contre les céphamycines et les carbapénèmes. Un autre groupe d'enzymes β -lactamases présentant un intérêt clinique est celui des carbapénémases qui hydrolysent les carbapénèmes. Ces enzymes peuvent être divisées en sérine carbapénémases (classe Ambler A ou D) et en métallo-carbapénémases (enzymes Ambler classe B). Les gènes codant pour les β -lactamases sont généralement appelés *bla* suivi du nom de l'enzyme spécifique (*p. ex. bla_{KPC}*) ; ils ont été trouvés dans le chromosome ou localisés dans des éléments génétiques mobiles dans le génome accessoire. On peut également trouver ces gènes faisant partie d'intégrons, ce qui facilite leur dissémination. En termes d'expression, la transcription de ces gènes peut être constitutive ou nécessite un signal externe pour induire leur production (223, 224).

4.4.1.1. Les β -lactamases de classe A

Les β -lactamases de classe A ont un résidu de sérine dans leur site catalytique, une propriété qu'elles partagent avec les enzymes de classe C et D. La plupart des enzymes de classe A sont inhibées par l'acide clavulanique et par tazobactame, et leur spectre d'activité inclut les monobactames mais pas les céphamycines (céfoxitine et céfotétan). Les enzymes de classe A comprennent un large éventail de protéines ayant des activités catalytiques très différentes, allant des pénicillinases (TEM-1 et SHV-1 n'hydrolysant que la PEN), aux BLSE (telles que CTX-M, SHV-2 et TEM-3) à des carbapénémases telles que la KPC (*K. pneumoniae* carbapénémase), une enzyme qui est prévalente actuellement chez plusieurs espèces à Gram négatif (225).

Les enzymes CTX-M et KPC ont un impact clinique élevé. CTX-M est une BLSE codée par un plasmide, c'est l'enzyme la plus répandue dans le monde, et elle est responsable d'une grande partie de la résistance aux céphalosporines chez *E. coli* et *K. pneumoniae*. À ce jour, cinq familles différentes de carbapénémases de classe A ont été décrites. Trois d'entre elles sont typiquement codées de manière chromosomique (IMI [enzyme hydrolysante d'IMP], SME [enzyme de *Serratia marcescens*] et NMC [carbapénémase non métallo-enzymatique]). Les deux autres (KPC et GES) sont classiquement hébergées dans des plasmides ou d'autres éléments génétiques mobiles. Bien que les KPC soient principalement présentes chez *Klebsiella* spp., elles ont été signalées chez plusieurs autres bactéries à Gram négatif, y compris *Enterobacter* spp., *E. coli* et *P. aeruginosa*. Un total de 22 variants du gène *bla*_{KPC} ont été décrits à ce jour, la plupart d'entre eux situés dans des plasmides contenant des éléments transposables ou en association avec des séquences d'insertion (225).

4.4.1.2. Les β -lactamases de classe B

Les enzymes de classe B sont également appelées métallo- β -lactamases (MBLs) car elles utilisent un ion métallique (le plus souvent du zinc) comme cofacteur (au lieu d'un résidu sérine) pour l'attaque nucléophile du cycle β -lactame. Elles sont inhibées par la présence d'agents chélateurs d'ions tel que l'EDTA et, comme les carbapénémases de classe A, elles sont actives contre une large gamme de β -lactames, y compris les carbapénèmes. Les MBLs ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique ou le tazobactam et hydrolysent efficacement les céphamycines (225). Nous citons quelques métallo-carbapénémases ayant une importance clinique.

La première enzyme du type IMP a été découverte au début des années 90. Depuis, plus de 20 sous-types différents d'IMP ont été décrits dans le monde entier, notamment chez *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp. et *Acinetobacter* spp. Les gènes *bla*_{IMP} ont été découverts sur des plasmides de grande taille faisant partie d'intégrons de classe 1. Cette enzyme hydrolyse l'IMP, les PEN et les céphalosporines à spectre étendu, mais pas le monobactame aztréonam (225).

Les enzymes de type VIM ont été décrites pour la première fois à la fin des années 90 à Vérone, en Italie et se sont depuis propagées dans le monde entier. Ces enzymes ont été initialement découvertes chez *P. aeruginosa*, mais leur association avec les intégrons de classe 1, ainsi que dans différents types d'éléments génétiques mobiles, a probablement contribué à leur dissémination vers de nombreuses espèces bactériennes devenant ainsi une préoccupation majeure dans le monde entier. Parmi les nombreuses variantes de VIM décrites à ce jour, la VIM-2 est l'enzyme la plus largement distribuée dans le monde (225).

En 2008, une nouvelle carbapénémase a été identifiée dans un isolat de *K. pneumoniae* récupéré chez un patient suédois précédemment admis à un hôpital de New Delhi, en Inde. L'enzyme a été appelée NDM-1, en référence à son origine. Comme les enzymes IMP et VIM, NDM peut hydrolyser toutes les PENs, céphalosporines et carbapénèmes, mais pas aztréonam (226). Les éléments génétiques mobiles contenant des gènes codant pour les enzymes NDM portent généralement de nombreux autres déterminants de la résistance, tels que les gènes codant pour d'autres carbapénémases (*p. ex.*, les enzymes de type VIM et OXA), les BLSE, les AME, les méthylases conférant la résistance aux macrolides, la protéine Qnr de résistance à la quinolone, les enzymes qui modifient la rifampicine et les protéines impliquées dans la résistance au SMX. Ainsi, la présence de NDM-1 est souvent accompagnée d'un phénotype multirésistant (226). Le gène *bla_{NDM}* a été trouvé dans plusieurs types de plasmides facilement transférables entre différentes espèces à Gram négatif, et il a également été associé à la présence de séquences d'insertion. L'émergence de NDM-1 dans de nombreux pays est particulièrement préoccupante. En outre, dans l'Inde et le Pakistan, le gène *bla_{NDM}* est non seulement largement disséminé parmi les agents pathogènes nosocomiaux, mais on le trouve fréquemment dans des isolats associés à la communauté (227).

4.4.1.3. Les β -lactamases de classe C

Les β -lactamases de classe C confèrent une résistance à toutes les PENs et céphalosporines y compris les céphamycines. Elles n'hydrolysent pas de manière fiable

l'aztréonam et ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique. L'enzyme de classe C la plus pertinente sur le plan clinique est l'AmpC, qui est une céphalosporinase généralement codée sur le chromosome bien que le gène *bla_{AMPc}* ait également été trouvé dans des plasmides. La production d'AmpC chromosomique est l'une des caractéristiques principales de *C. freundii*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *S. marcescens*, *Providencia* spp., *Morganella morganii* et *P. aeruginosa*. *E. coli* n'a pas le régulateur AmpR et exprime la β -lactamase AmpC de manière constitutive à un faible niveau. En revanche, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *Klebsiella* spp. et *Stenotrophomonas* spp. sont des exemples classiques d'espèces dans lesquelles le gène *bla_{AMPc}* est absent du génome central (113, 201).

La β -lactamase AmpC peut à peine dégrader les carbapénèmes, cependant elle peut les lier de manière covalente dans le périplasma et les empêcher d'accéder à leurs cibles, à condition qu'elle soit produite à un niveau élevé et que la perméabilité de la membrane externe soit réduite à cause d'une perte de porines (228-230).

Dans de nombreux organismes à Gram négatif, tels que *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae*, *E. cloacae* et *C. freundii*, l'exposition aux β -lactames induit une production élevée d'AmpC. Plusieurs gènes (notamment *ampG*, *nagZ*, *ampD* et *ampR*) sont nécessaires pour l'inductibilité, et le lien entre le recyclage des PGs et l'induction de la β -lactamase est maintenant bien établi (Figure 7M) (201).

Un autre mécanisme d'induction de la β -lactamase est médié par le système à deux composants CreBC et son effecteur, une protéine de la membrane interne CreD. Ce système chez *P. aeruginosa* joue un rôle central dans la résistance aux β -lactamines, dans la formation des biofilms et dans la valeur adaptative « fitness » des bactéries. L'inhibition de *dacB* (PLP4) par IMP conduit à une augmentation de l'expression de *creBC*, *creD* et *ampC*. L'augmentation de l'expression de l'*ampC* est accompagnée d'une concentration minimale inhibitrice (CMI) élevée de β -lactames, qui revient au niveau de type sauvage lors de la suppression de *creBC*. De plus, ces phénotypes de résistance régulés à travers *creBC* ont été perdus en l'absence de NagZ et AmpG (231). Bien que l'interaction entre les composants du recyclage de la paroi cellulaire, l'expression d'*ampC* et le système

creBC-creD régule la résistance aux β -lactames, les détails sous-jacents restent à être élucidés (182).

4.4.1.4. Les β -lactamases de classe D

Les β -lactamases de classe D comprennent un large éventail d'enzymes initialement distinguées des pénicillinases de classe A par leur capacité à hydrolyser l'oxacilline (d'où leur nom) et par leur faible inhibition par l'acide clavulanique. De nombreuses variantes d'OXA ont été décrites, y compris des enzymes capables de dégrader des céphalosporines de troisième génération (*p. ex.*, OXA-11 de *P. aeruginosa*) et des carbapénèmes (*p. ex.*, OXA-23 de *A. baumannii*). OXA-48 est une carbapénémase de classe D largement disséminée qui a été décrite pour la première fois en 2001 en Turquie à partir d'un isolat multirésistant de *K. pneumoniae*. OXA-48 et ses variantes sont maintenant largement répandues dans les isolats cliniques de *K. pneumoniae* et d'autres entérobactéries, et ont également été trouvées chez *A. baumannii*. PoxB (ou OXA-50) est une carbapénémase de la classe D codée sur le chromosome de *P. aeruginosa*. Lorsqu'elle est surexprimée par l'intermédiaire d'un plasmide inductible dans un mutant déficient en *ampC* et *poxB*, ainsi que la porine *oprD*, PoxB augmente significativement la résistance à l'IMP ainsi qu'aux méropénème et doripénème (232). De nombreux autres types d'enzymes OXA ont été décrits à ce jour, possédant une variété de profils hydrolytiques et codées par des gènes que l'on trouve souvent dans une large gamme d'éléments génétiques mobiles (113, 233).

4.4.2. OprD et imipénème chez *P. aeruginosa*

Sauf en cas de production de carbapénémases, la perte de la porine OprD de la membrane externe chez *P. aeruginosa* est généralement associée à une augmentation de 4 à 16 fois la CMI de tous les carbapénèmes, y compris l'IMP (109).

La résistance médiée par OprD peut impliquer plusieurs mécanismes qui diminuent l'expression transcriptionnelle d'*oprD* et/ou des mutations qui perturbent la production translationnelle d'une porine fonctionnelle.

Au niveau de la transcription d'*oprD*, les mécanismes caractérisés comprennent : 1) des perturbations du promoteur d'*oprD* qui ont eu lieu en tant que résultat de délétions ou d'insertions dans la région en amont d'*oprD*, 2) une terminaison prématurée de la transcription d'*oprD*, 3) une régulation négative d'*oprD* médiée par les protéines régulatrices CzcR et CopR, qui répondent à la présence de zinc et de cuivre, respectivement, et activent les mécanismes de résistance aux métaux. CzcR et CopR induisent directement ou indirectement une diminution de la transcription d'*oprD* par des facteurs non identifiés, 4) une répression de la transcription d'*oprD* en présence du salicylate dans le milieu de culture par un mécanisme non caractérisé et 5) une diminution de l'expression transcriptionnelle par des mécanismes de corégulation avec la pompe à efflux de plusieurs médicaments codée par *mexEF-oprN* (109).

Finalement, les mécanismes de déficit en OprD peuvent être liés à : 1) des mutations, des insertions et/ou des délétions créant un décalage dans le cadre de lecture ou des codons-stop prématurés, et 2) une perturbation de la structure du gène *oprD* par insertion d'un grand élément IS (109).

4.4.3. Combinaison de plusieurs mutations chez *E. coli*

A partir d'une souche d'*E.coli* qui ne codait aucune β -lactamase et dans laquelle les gènes codant pour les porines OmpC et OmpF ont été inactivés, des mutants présentant une résistance élevée aux carbapénèmes ont été sélectionnés par passage répété en série en présence de concentrations croissantes de méropénème ou d'ertapénème pendant 60 générations. Les génomes des clones isolés ont été séquencés ; les mutations détectées peuvent être organisées en cinq groupes selon le mécanisme par lequel elles peuvent contribuer à la résistance : 1) des effets en aval de la mutation du gène *envZ* codant pour une histidine kinase faisant partie d'un système à deux composants EnvZ-OmpR qui régule

l'expression d'*ompCF*, 2) une augmentation de l'efflux due à des mutations dans le système AcrAB-TolC, 3) une modification de la cible, *mrdA* (PLP2) après l'exposition au méropénème ou *ftsI* (PLP3) après l'exposition à l'ertapénème, 4) une induction de la réponse bactérienne stringente due à une mutation dans *spoT*, et 5) une diminution de l'activité protéase due à des mutations dans *ftsH* et *lon* (234).

L'introduction individuelle de chacun de ces gènes mutés dans la souche parentale conférait de faibles niveaux de résistance à l'ertapénème, le méropénème et l'IMP, cependant la combinaison de plusieurs mutations augmentait les niveaux de résistance de la souche parentale à ces trois antibiotiques. Alors que les CMI de ces mutants étaient entre 4 et 32 µg/mL pour l'ertapénème et le méropénème, elles étaient plus faibles pour l'IMP (entre 0,75 et 1,5 µg/mL) (234).

Chapitre 5 - Les approches « omiques » et la résistance

« Toute technologie suffisamment avancée est indiscernable de la magie »

Arthur C. Clarke (1917-2008)

Comme nous venons de voir dans les chapitres précédents, nous sommes confrontés à une crise de santé publique internationale due à la diminution de l'efficacité des antibiotiques en raison de la résistance. En plus d'être amplement utilisés en pratique clinique, les antibiotiques sont également utilisés dans l'agriculture, l'aquaculture et l'élevage intensif soit comme agents prophylactiques, soit à des fins thérapeutiques (235-237). L'utilisation non restreinte d'antibiotiques a toutefois entraîné à une fréquence plus élevée d'agents pathogènes humains résistants. L'acquisition de la résistance aux antibiotiques peut résulter de diverses altérations génomiques, par exemple, des mutations nucléotidiques (« SNV : Single Nucleotide Variant »), de grandes modifications génomiques telles que des insertions ou des délétions, des réarrangements de chromosomes, des duplications de gènes ainsi que des facteurs qui ont facilité la propagation des gènes de résistance c'est-à-dire les plasmides et autres éléments génétiques mobiles, y compris les intégrons et les Tns.

Malheureusement, les industries pharmaceutiques investissent de moins en moins dans le développement de nouveaux antibiotiques, et les quelques molécules récemment développées dérivent de classes d'antibiotiques bien connues, ce qui, à long terme, ne résout pas le problème de la résistance (238, 239). Il est donc impératif de s'affairer à la mise en place de nouvelles stratégies visant la préservation de l'efficacité des molécules existantes. Une stratégie prometteuse pour améliorer l'efficacité des antibiotiques consiste en l'inhibition de cibles secondaires ou de mécanismes de résistance ou de protection intrinsèque. Par exemple, il a été démontré que le métal argent améliore l'activité de plusieurs antibiotiques tels que les β -lactames, les aminoglycosides et les quinolones contre les bactéries à Gram négatif (240). Également, une étude a montré que l'inhibition des enzymes impliquées dans la production de H₂S (un gaz augmentant la capacité

antioxydante des bactéries) sensibilise *Bacillus anthracis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *E. coli* à plusieurs antibiotiques (241).

Dans ce sens, alors que les cibles primaires des antibiotiques actuellement utilisés en clinique sont bien connues, une connaissance approfondie de leur mode d'action et de la réponse cellulaire induite par ceux-ci permettrait de révéler l'étendue des altérations métaboliques associées à la mort cellulaire et d'identifier de nouvelles stratégies afin d'améliorer l'efficacité des traitements actuels. Également, comprendre la base génomique de la résistance et sa propagation entre les communautés bactériennes et les patients est essentiel pour une gestion judicieuse des antibiotiques de plus en plus rares et pour guider la découverte de nouveaux médicaments. L'utilisation croissante du séquençage de nouvelle génération (SNG) couplée avec des outils de bioinformatique et le partage de données apportera des avancées importantes permettant une surveillance de la résistance aux antimicrobiens, un meilleur contrôle de leur utilisation et par conséquent assurera leur longévité (242).

Dans la première partie de cette thèse, nous avons effectué une étude transcriptomique en utilisant la technique du séquençage d'ARN à haut débit (ARN-Seq) couplée à une étude métabolomique ciblée afin de mieux comprendre le mode d'action de la PEN chez *S. pneumoniae*.

Dans la deuxième partie de cette thèse, nous avons utilisé l'approche de Mut-Seq qui combine la mutagenèse chimique à la technologie de SNG (243-245) pour réaliser un criblage chimiogénomique, afin de déterminer des gènes responsables de la résistance à l'IMP chez *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*. En effet, l'exploration de la résistance aux antibiotiques au niveau génomique s'est avérée utile pour révéler de nouveaux gènes ou des mécanismes jouant des rôles plus subtils, comme la facilitation de la résistance ou la compensation du coût de la valeur adaptative (« fitness cost ») (96, 246-249).

Ainsi, au cours de ce chapitre nous allons vous présenter les approches omiques utilisées dans cette thèse ainsi que le principe des analyses bioinformatiques réalisées sur les données du séquençage.

5.1. Le séquençage de génome de la première génération

Le séquençage de l'ADN a parcouru un long chemin depuis l'époque de la chromatographie bidimensionnelle dans les années 1970. L'avènement de la méthode de terminaison de chaîne de Frederick Sanger en 1977 a permis aux scientifiques de séquencer l'ADN de manière fiable et reproductible. Un certain nombre d'améliorations ont été apportées au séquençage de Sanger dans les années suivantes, principalement, l'utilisation de traceurs fluorescents, attachés soit aux désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs), soit aux didésoxyribonucléotides triphosphates (ddNTPs) qui sont responsables de l'interruption aléatoire du processus d'élongation de l'ADN, et la détection par électrophorèse capillaire (EC) où les fragments d'ADN sont séparés par taille à travers des colonnes capillaires remplies de polyacrylamide réticulé, ce qui a remplacé le gel d'électrophorèse de la méthode de Sanger classique (250). Ces deux améliorations ont contribué au développement de machines de séquençage d'ADN automatisées et de la première série de machines commerciales de séquençage de l'ADN (251). Applied Biosystems a lancé la première machine de séquençage automatique AB370 en 1987, en adoptant la technique de l'EC qui a rendu le séquençage plus rapide et plus précis. AB370 pouvait détecter 500 Kilobases (Kb) par jour et la longueur de la séquence de lecture (« reads ») pouvait atteindre 600 bases. Le modèle actuel AB3730x1 peut générer 2,88 millions de bases par jour et la longueur de la séquence de lecture pourrait atteindre 900 bases depuis 1995 (252).

Afin d'analyser des fragments de plus d'1Kb, des chercheurs ont utilisé la technique du séquençage en aveugle (« Whole Genome Shotgun Sequencing ») où des fragments d'ADN chevauchants ont été clonés dans des vecteurs, et séquencés séparément à partir des deux extrémités en utilisant la méthode de Sanger donnant ainsi deux séquences de lecture courtes par clone, appelées des séquences appariées (« paired end PE»), enfin,

les séquences obtenues sont assemblées en une longue séquence contiguës (ou «contig») *in silico*. Le développement des techniques comme la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) et la recombinaison de l'ADN ont contribué à la révolution génomique en fournissant des moyens de générer des concentrations élevées d'ADN pur nécessaire pour le séquençage (251). La technique de séquençage à l'aveugle a été utilisée pour séquencer le premier génome bactérien en 1995, soit celui de *H. influenzae* (253). Depuis, de nombreux autres génomes bactériens ont été séquencés en utilisant cette technique, entre autres, celui d'*E. coli* K-12 en 1997 (254), celui de *P. aeruginosa* PAO1 en 2000 (60) et ceux de *S. pneumoniae* R6 et TIGR4 en 2001 (100, 255).

5.2. Le séquençage de la nouvelle génération

Les technologies du SNG sont différentes de la méthode de Sanger en ce qui concerne l'analyse en parallèle massive, le haut débit et les coûts réduits. Suite au projet du génome humain, la compagnie 454 (acquise plus tard par Roche) a lancé la technique du pyroséquençage 454 en 2005. L'année suivante, Solexa (acquise par Illumina en 2007) a dévoilé le « Genome Analyzer », suivi par SOLiD (« Sequencing by Oligo Ligation Detection ») fourni par Agencourt acquise par Applied Biosystems. D'autres compagnies ont aussi développé de nouvelles méthodologies de séquençage (*p. ex.* Polonator et Ion Torrent) (251). Cependant, pendant plusieurs années, la plateforme de séquençage d'Illumina a été la plus réussie, jusqu'au point de quasi-monopole (256).

Les technologies citées ci-dessus sont actuellement considérées comme des technologies de séquençage de deuxième génération dû à l'apparition d'une troisième génération de séquençage d'une seule molécule et de longues séquences de lecture, à titre d'exemple le séquençage en temps réel d'une seule molécule de Pacific Biosciences et la technologie d'Oxford Nanopore Technologies (251).

Dans la section suivante, nous allons seulement expliquer le principe de la technologie HiSeq d'Illumina utilisée au cours de cette thèse.

5.2.1. Le séquençage d'Illumina

Le concept de la technologie SNG est similaire au séquençage EC. L'ADN polymérase catalyse l'incorporation des dNTPs marqués par fluorescence dans un brin matrice d'ADN au cours de cycles de synthèse de l'ADN. La différence critique c'est qu'au lieu de séquencer un seul fragment d'ADN, le SNG étend ce processus à des millions de fragments de manière massivement parallèle. Illumina propose plusieurs plateformes de SNG : MiniSeq, MiSeq, NextSeq, HiSeq, HiSeq X et NovaSeq (257). Au cours de cette thèse, nous avons utilisé la plateforme HiSeq 2500 qui génère des courtes séquences de lecture de 101 nucléotides.

Le processus du SNG comprend quatre étapes de base (257) :

- 1. Préparation des bibliothèques de séquençage :** D'une façon générale, la première étape consiste à fragmenter l'ADN ensuite à ajouter des adaptateurs (Figure 9A & 9B). Par exemple, avec le Kit Nextera XT utilisé au cours de cette thèse, cette préparation commence par une étape de « tagmentation » qui combine les réactions de fragmentation aléatoire de l'ADN par des transposases et la ligature d'adaptateur aux extrémités 5' et 3', ce qui augmente considérablement l'efficacité du processus de préparation de la bibliothèque. Les fragments liés à un adaptateur sont ensuite amplifiés par PCR et purifiés. Au cours de l'amplification, des séquences pour la liaison d'amorce, des indices et des séquences terminales sont ajoutées. Les indices sont généralement formés de six paires de bases et sont utilisés lors de l'analyse de la séquence d'ADN pour identifier les échantillons. Ils permettent d'exécuter jusqu'à 96 échantillons différents ensemble. Au cours de l'analyse, toutes les séquences de lectures ayant le même index seront regroupées ensemble.
- 2. Génération de « cluster » :** pour la génération de « cluster », la bibliothèque est chargée dans une cellule de flux où les fragments d'ADN dénaturés liés aux adaptateurs sont capturés sur une surface contenant des amorces complémentaires aux adaptateurs de la bibliothèque. Chaque fragment est ensuite amplifié en des « clusters » clonaux distincts par amplification en pont. Lorsque la génération des clusters est terminée, les matrices d'ADN seront prêtes pour le séquençage (Figure 9C).

- 3. Séquençage :** la technologie d'Illumina de séquençage par synthèse utilise des nucléotides terminateurs de chaîne réversibles marqués par fluorescence dans lesquelles le groupe ribose 3'-OH est bloqué pour prévenir l'élongation (Figure 9D). Comme les quatre dNTPs liés au terminateur sont tous présents à chaque cycle de séquençage, la compétition naturelle minimise le biais d'incorporation. Le résultat est un séquençage base par base extrêmement précis. Au cours de chaque cycle, au moment de l'incorporation, les nucléotides sont identifiés par excitation des fluorophores (Figure 9E). Le fluorophore et le terminateur sont clivés à la fin de chaque cycle afin de permettre à la synthèse de continuer avec l'ajout d'un autre nucléotide. La possibilité de faire un séquençage en paires (PE), qui consiste à séquencer les deux extrémités des fragments d'ADN dans une librairie et à aligner les séquences de lecture sens et anti-sens comme des séquences appariées, offre plusieurs avantages. En plus, ce processus permet de produire deux fois plus de séquences de lecture. Les séquences appariées permettent un alignement des séquences de lecture plus précis et assurent la capacité de détecter des InDels (Insertions-Deletions), ce qui n'est pas possible avec le séquençage d'une seule extrémité ; elles permettent ainsi la détection d'un nombre plus élevé des SNVs.
- 4. Analyse des données :** les premières étapes de contrôle qualité sont communes à toutes les analyses qui peuvent être effectuées avec les données générées par le SNG. Il faut d'abord supprimer les adaptateurs de multiplexage ensuite nettoyer les séquences de lectures en tronquant les extrémités de mauvaise qualité, ceci se fait en utilisant des logiciels comme Trimmomatic, Sickle et FASTX-Toolkit. Nous développons les prochaines étapes de l'analyse dans les sections 5.2.2.1 et 5.4.3.

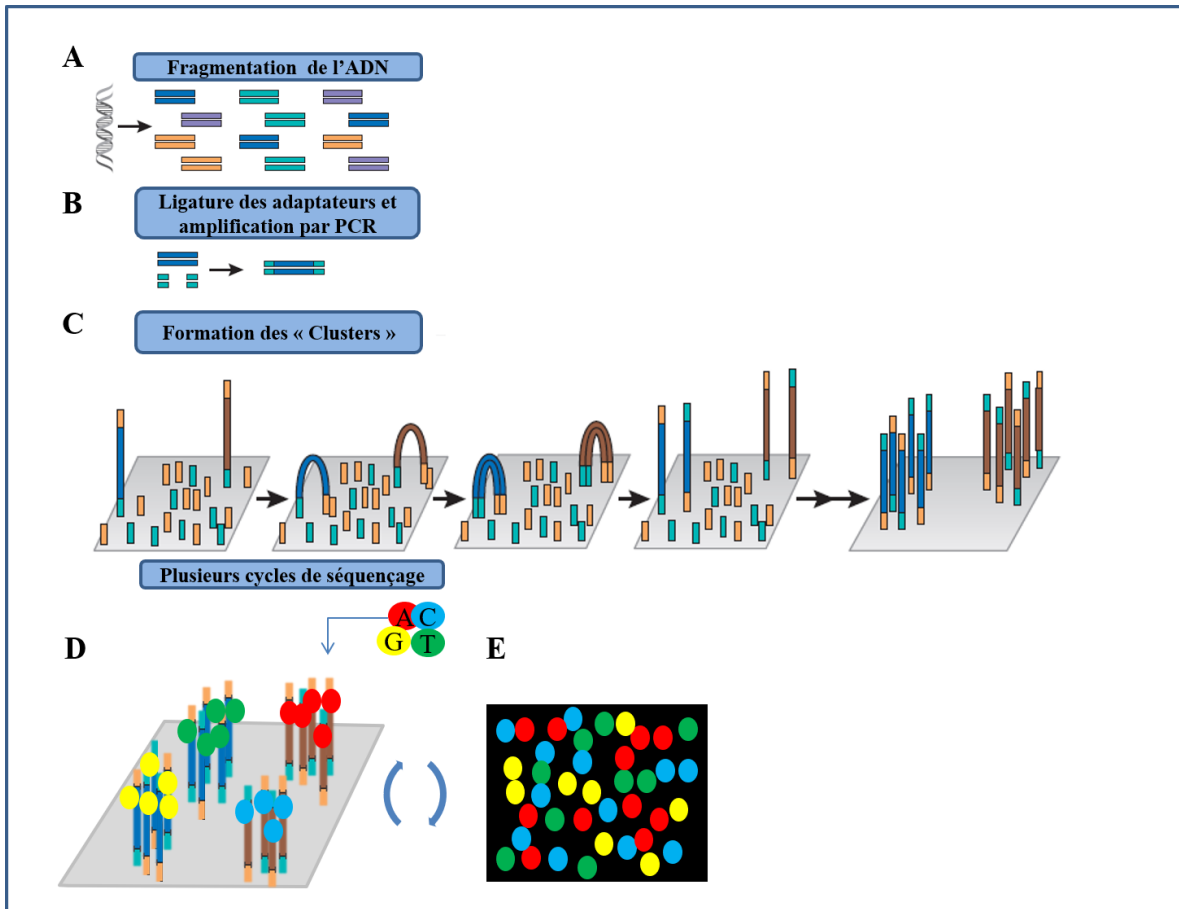


Figure 9. Le processus général du séquençage de la nouvelle génération d'Illumina

A et B : préparation des bibliothèques de séquençage en amplifiant l'ADN fragmenté auquel des adaptateurs ont été ajoutés, C : fixation des adaptateurs à la cellule de flux, chaque fragment d'ADN lié est amplifié dans un « cluster » clonal par amplification en pont, D : incorporation de nucléotides fluorescents, E : excitation laser et lecture.

Adaptée de Shendure J. et Ji H. et d'Illumina (257, 258).

5.2.2. Le séquençage d'ARN à haut débit « ARN-Seq »

La technique de l'ARN-Seq utilise les capacités des méthodes de séquençage à haut débit pour permettre de mieux comprendre le transcriptome d'une cellule, ce qui représente l'ensemble des ARNs issus de la transcription du génome. Par rapport aux méthodes précédentes basées sur le séquençage de Sanger et les biopuces à ADN, l'ARN-Seq offre une couverture bien supérieure et une résolution plus grande de la nature

dynamique du transcriptome (259). Alors que les méthodes basées sur l'hybridation mesurent les niveaux d'expression des gènes par détection de la fluorescence ou de la radioactivité, l'ARN-Seq utilise la quantité de données correspondante à une séquence codante donnée, typiquement quantifiée en séquences de lectures divisées par la longueur de la séquence codante en kilobase, et par million de séquences de lectures alignées (RPKM : Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads). Cette mesure ne peut pas être saturée comme dans le cas de la détection de la lumière ou de la radioactivité. Ainsi, l'ARN-Seq possède une plage dynamique beaucoup plus grande pour mesurer la variabilité dans les niveaux d'expression (260). Au-delà de la quantification de l'expression des gènes, les données générées par l'ARN-Seq facilitent la découverte de nouveaux transcrits ou des transcrits modifiés. En plus des transcrits d'ARNm, l'ARN-Seq peut être appliqué à l'étude de différentes populations d'ARN, y compris l'ARN total, le pré-ARNm et l'ARN non codant (259).

Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés à séquencer l'ARNm, ainsi afin d'augmenter la profondeur de couverture des ARNm par l'ARN-Seq, l'ARN total extrait de *S. pneumoniae* a été traité par le kit « Ribo-ZeroTM Magnetic Kit for Gram-Positive Bacteria » qui cible les ARNr 5S, 16S et 23S (représentant plus de 80% de l'ARN total) en utilisant des sondes de capture d'ARNr biotinylées. Après cette hybridation, l'ARNr est éliminé par liaison à des billes magnétiques. L'ARNm ainsi enrichi a été rétrotranscrit en ADNc et les bibliothèques de séquençage ont été préparées en utilisant le kit « ScriptSeqTM v2 RNA-Seq Library Preparation ». La Figure 10 représente les étapes principales de la préparation des bibliothèques de séquençage.

5.2.2.1. L'analyse des données de l'ARN-Seq par le logiciel RockHopper

Le logiciel Rockhopper a été développé par Ryan McClure et ses collègues en 2013 pour analyser, d'une façon efficace et précise, les données bactériennes d'ARN-Seq (261). Les principales étapes de l'analyse sont les suivantes :

- 1- L'alignement des séquences de lecture à un génome de référence :** l'approche de Rockhopper pour l'alignement des séquences de lectures sur un génome de référence suit celui de Bowtie. Brièvement, pour l'ensemble des réplicons

sélectionnés, le logiciel crée un index. Après la création de l'index, pour chaque séquence de lecture, un alignement exact sur l'index est tenté et, en cas d'échec, un alignement inexact sur l'ensemble des réplicons est tenté en alignant les régions d'origine de la séquence de lecture sur l'index et en étendant les alignements tout en respectant un nombre maximum autorisé de disparités, d'insertion ou de suppression dans l'alignement.

- 2- **Normalisation** : lorsque nous comparons des transcrits de différentes longueurs, les transcrits les plus longs seront couverts par un nombre plus élevé de séquences de lectures que les transcrits également exprimés mais qui sont plus courts. En outre, lors de la comparaison des profils d'expression génique entre deux échantillons, la qualité du séquençage des deux échantillons est un facteur important. Considérons un échantillon d'ARN de l'échantillon A qui a été séquençé avec une profondeur de couverture deux fois plus élevée que celui de l'échantillon B, tous les gènes de A sembleront être exprimés à un niveau supérieur que ceux de B (262). Ainsi, afin de permettre la comparaison des données de différents échantillons et expériences, chaque ensemble de données doit être normalisé.
- 3- **Assemblage des transcrits et identification des limites des transcriptions** : les sites de début/arrêt de la traduction pour les gènes codant pour les protéines annotées et les sites de début/arrêt de la transcription pour les gènes d'ARN annotés, principalement les ARNr et les ARNt, sont obtenus automatiquement par Rockhopper de GenBank. En se basant sur les données de séquençage alignées et normalisées, une carte de transcriptome sera créée comprenant des sites de début/fin de transcription pour des gènes codant pour des protéines et de nouveaux transcrits identifiés par Rockhopper.
- 4- **Quantifier l'abondance des transcrits** : RPKM est une mesure courante pour quantifier l'expression des gènes à partir des expériences d'ARN-Seq. Rockhopper indique le niveau d'expression de chaque transcription à l'aide de RPKM, sauf qu'au lieu de diviser par le nombre total de séquences de lectures, il divise par le quartile supérieur de l'expression génique, c'est-à-dire l'expression génique de 75% des séquences de lectures après avoir éliminé les gènes n'ayant aucune séquence de lecture qui leurs correspondent (261). Selon une étude de comparaison de différentes

techniques de normalisation, la technique du quartile supérieur avait la meilleure concordance avec des données de qRT-PCR (263).

5- Test d'expression génique différentielle : l'analyse d'expression différentielle signifie que le logiciel effectue une analyse statistique sur les données de comptage de séquences de lecture normalisées pour découvrir les changements quantitatifs dans les niveaux d'expression entre les groupes expérimentaux. Pour chaque transcrit, le logiciel effectue un test statistique pour l'hypothèse nulle, ce qui veut dire que l'expression du transcrit est la même dans différentes conditions. Une valeur p , indiquant la probabilité d'observer les niveaux d'expression d'un transcrit dans diverses conditions par hasard, sera calculée. Étant donné que plusieurs tests sont exécutés, des valeurs q contrôlant le taux de découverte erronée sont signalées (261).

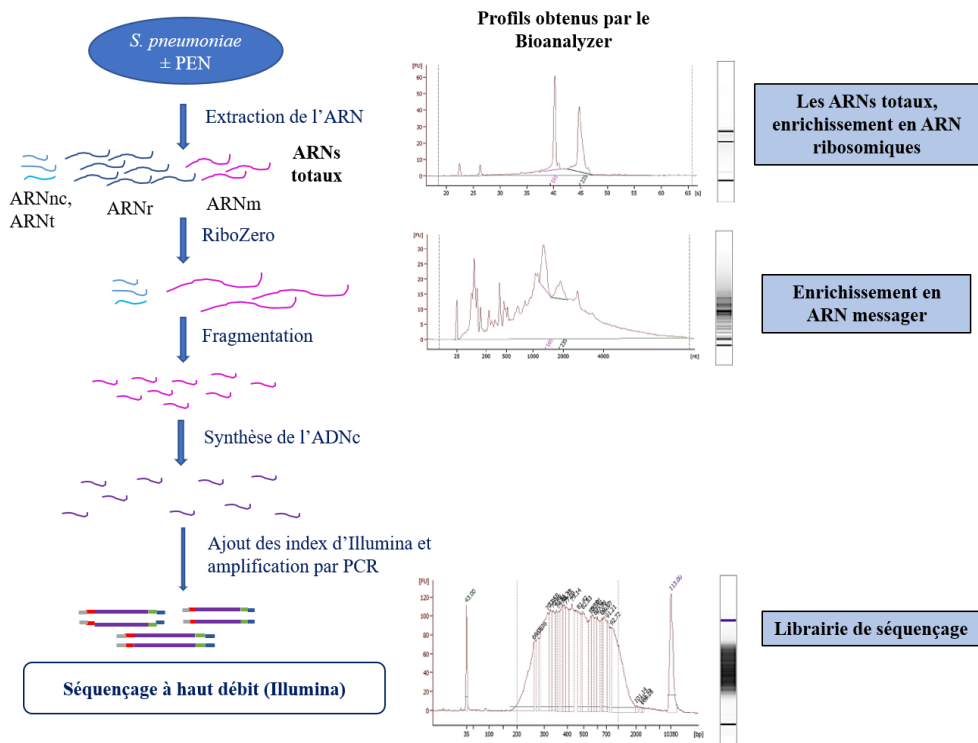


Figure 10. Les principales étapes de la préparation des bibliothèques pour l'ARN-Seq

Les profils des préparations ont été testés en utilisant le BioAnalyzer. ARNnc : ARN non codant, ARNt : ARN de transfert, ARNr : ARN ribosomique, ARNm : ARN messager et ADNc : ADN complémentaire, PEN : pénicilline.

5.3. Métabolomique

Les métabolites sont de petites molécules chimiquement transformées au cours du métabolisme et servent de signatures directes de l'activité biochimique, ainsi contrairement aux gènes et aux protéines, dont les fonctions sont soumises à une régulation épigénétique et à des modifications post-traductionnelles, les métabolites sont plus faciles à corrélérer avec un phénotype cellulaire donné (264).

5.3.1. La régulation métabolique de la résistance aux antibiotiques

De nombreuses études ont démontré qu'il existe un lien entre le métabolisme bactérien et la résistance aux antibiotiques. En effet, des changements au niveau du métabolisme, tels que ceux associés à la dormance ou à la formation de biofilms, modulent la sensibilité bactérienne aux antibiotiques, on parle ainsi d'une résistance phénotypique. Ce sont des situations transitoires, dans lesquelles une population bactérienne, par ailleurs susceptible à un antibiotique donné, est réfractaire à son action. Cette résistance transitoire ne nécessite pas de changement génétique et elle est donc non héritable (265).

Le taux de croissance est le premier paramètre qui influence le phénotype de sensibilité aux antibiotiques des populations bactériennes. L'effet du taux de croissance sur l'activité de la PEN était déjà décrit en 1944 dans une étude qui a montré que l'activité de cet antibiotique était altérée lorsque les cellules se développaient lentement (266).

Les sources de carbone peuvent également modifier la sensibilité aux antibiotiques. Il a été décrit qu'un mutant de *P. aeruginosa* déficient en Crc, le régulateur global du métabolisme du carbone, est plus sensible à l'IMP et à la fosfomycine. Ce mutant surexprimait les transporteurs membranaires OprD et GlpT, dont la fonction initiale est le transport des acides aminés basiques et du glycérol-3-phosphate, respectivement (267).

Une étude publiée en 2015 a montré que l'alanine et/ou le glucose exogènes rétablissent la sensibilité aux antibiotiques chez *Edwardsiella tarda* résistante à la Kan, en augmentant le flux du cycle de Krebs, la production de NADH et la force motrice des

protons afin d'améliorer l'absorption de l'antibiotique, à la fois *in vitro* et chez un modèle de souris pour l'infection des voies urinaires (268).

Une étude transcriptomique de mutants de *S. pneumoniae* résistants à la tétracycline a révélé une surexpression de plusieurs gènes de la voie de biosynthèse et de récupération de la thiamine, ceci a aussi été observé chez des isolats cliniques résistants à la tétracycline. Cette surexpression contribue probablement au phénotype de résistance à la tétracycline (269).

5.3.2. Étude du métabolome

Le métabolome est généralement défini comme la collection de petites molécules, les métabolites (acides aminés, sucres, acide gras, etc.). Avec le développement de la spectrométrie de masse, il est maintenant possible de mesurer rapidement des milliers de métabolites simultanément à partir de quantités minimales d'échantillon. Les innovations en instrumentation et les outils bioinformatiques permettent une analyse complète de métabolites cellulaires. Deux approches sont possibles : 1) une étude métabolomique non ciblée qui a pour objectif de mesurer simultanément autant de métabolites que possible dans un échantillon biologique donné, et 2) une étude métabolomique ciblée dans laquelle une liste de métabolites est mesurée, généralement en se concentrant sur une ou plusieurs voies d'intérêt associées. Cette approche est généralement conduite par une question biochimique spécifique ou hypothèse qui motive l'enquête d'une voie particulière (264).

Suite à l'étude transcriptomique réalisée chez *S. pneumoniae* traitée par la PEN, nous avons réalisée une étude métabolomique ciblée en utilisant la technique du LC-MS (« Liquid Chromatography-Mass Spectrometry »).

5.3.2.1. Principe de la LC-MS

La LC-MS est une technique qui combine la capacité de séparation physique de la chromatographie en phase liquide (LC) et de l'analyse de masse par spectrométrie de masse (MS) (270).

La LC est un processus de séparation utilisé pour isoler les composants individuels d'un mélange. Par exemple, la chromatographie en phase normale implique le transfert d'un échantillon à travers une phase mobile polaire et une phase stationnaire non polaire. Le dispositif est une colonne garnie du milieu poreux constitué d'un matériau solide granulaire (phase stationnaire), telle que des polymères et de la silice, où l'échantillon est injecté, le solvant (la phase mobile) traverse la colonne en transportant l'échantillon. Lorsqu'un échantillon est injecté, le solvant traverse la colonne pour séparer les composés un par un, en fonction de leur affinité relative pour les matériaux de garnissage de la phase stationnaire et le solvant. Le composant ayant le plus d'affinité pour la phase stationnaire est le dernier à se séparer de la colonne. En effet, une haute affinité correspond à un temps de rétention plus élevé (270).

La spectrométrie de masse (MS) ionise des atomes ou des molécules pour faciliter leur séparation et leur détection en fonction de leurs masses et charges moléculaires (rapport masse sur charge m/z). L'échantillon est converti en phase gazeuse, l'échantillon gazeux est ionisé pour générer des cations, les ions se séparent en fonction de leur rapport m/z par un analyseur de masse, un détecteur est utilisé pour déterminer l'espèce et la quantité de chaque ion. La source d'ions est un élément important de toute analyse MS, car elle contribue fondamentalement à la génération efficace d'ions pour l'analyse. Pour ioniser des molécules intactes, l'ionisation par électroébuliseur ou ESI (« Electrospray Ionization ») peut être un choix parmi d'autres. Le choix de la source d'ions dépend également de la nature chimique de la substance d'intérêt à analyser, c'est-à-dire polaire ou non polaire (270).

5.4. La mutagenèse chimique couplée au SNG : « Mut-Seq »

Nous avons utilisé l'approche « Mut-Seq » afin d'étudier la résistance à l'IMP provoquée par des mutations ponctuelles en l'absence de β -lactamases codées par un plasmide chez *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*. Brièvement, les souches sauvages des trois espèces ont été traitées avec un agent mutagène qui produit des mutations aléatoires par substitution de nucléotides, puis des mutants résistants ont été sélectionnés

sur des plaques de gélose contenant des concentrations croissantes d'IMP. Le WGS a été effectué sur plus de 45 mutants de chaque souche ainsi que sur la souche de type sauvage de chaque espèce.

5.4.1. Taux et types de mutations chez les bactéries

Une population bactérienne typique double sa taille toutes les 30 minutes. Le taux de mutations spontanées chez les bactéries est relativement faible (10^{-6} /base) par génération. Ceci signifie qu'il y a 1 chance sur 1 000 000 qu'une mutation se produise à un endroit donné dans un gène donné au cours d'un cycle cellulaire. Cependant, compte tenu de la grande taille du génome (entre $4,6 \times 10^6$ et $5,7 \times 10^6$ pb pour *E. coli*) et de la densité élevée de la population bactérienne dans des conditions de croissance favorables, ce taux de mutation n'est pas négligeable par génération de progéniture (120).

Toute paire de bases d'ADN peut être mutée. Une mutation ponctuelle ne change qu'une seule paire de bases dans la séquence de l'ADN. La conséquence d'un tel changement dépend à la fois de la nature du changement et de son emplacement. Une altération au niveau de la région codante d'un gène peut affecter la fonction de la protéine qui pourrait être inactive ou avoir une activité altérée (réduite ou augmentée). Ceci dépend de l'endroit où la substitution a eu lieu dans la chaîne polypeptidique et comment elle affecte le repliement ou l'activité catalytique de la protéine. La modification peut aussi avoir peu ou pas d'effet, soit parce que le triplet modifié code encore pour le même acide aminé ou parce que le nouvel acide aminé est suffisamment similaire à l'original que la fonction de la protéine reste non affectée. Des mutations qui ne provoquent aucun changement dans les acides aminés sont appelées mutations silencieuses. Un second type de mutation ponctuelle est la mutation faux sens. Un troisième type de mutation ponctuelle, la mutation non-sens qui provoque la terminaison précoce de la traduction, elle implique la conversion d'un codon sens en un codon non-sens ou stop. Parce que le code génétique est lu par blocs de trois bases, toute suppression ou insertion d'une paire de bases entraîne un décalage du cadre de lecture et la traduction du gène est complètement bouleversée. Les InDels peuvent impliquer une seule ou plusieurs bases (120).

Des erreurs peuvent survenir lors de la réplication de l'ADN si la base d'un nucléotide passe d'une forme céto à une forme énol ou une forme amino change en une forme imino. Ces tautomérisations modifient les liens hydrogènes caractéristiques des bases. L'effet le plus commun de ces changements est une transition, où la purine (adénine A et guanine G) dans une paire de bases est remplacée par l'autre base de purine et la pyrimidine (cytosine C et thymine T) est remplacée par l'autre pyrimidine. Ainsi, une paire A-T deviendrait G-C ou une paire C-G deviendrait T-A. Dans les mutations de transversion, une base de purine est remplacée par une base pyrimidine ou inversement. Par exemple, une paire A-T deviendrait T-A ou C-G (120).

5.4.2. Les agents mutagènes

Etant donné que les mutations spontanées se produisent à un taux très faible, des agents appelés mutagènes sont utilisés pour augmenter ce taux de mutation. La mutagénèse peut être induite par des rayonnements ultraviolet (UV), rayonnements gamma et rayonnements X mais aussi par des agents chimiques. Les mutagènes chimiques peuvent être classés en fonction de leur mécanisme d'action : 1) incorporation d'analogues de base dans la chaîne polynucléotidique en croissance pendant la réplication, 2) intercalation entre deux paires de bases d'ADN et 3) réaction avec l'ADN (agents alkylants) (120).

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé un composé organique mutagène, le méthanesulfonate d'éthyle (EMS), afin de produire des mutations génétiques aléatoires par substitution de nucléotides chez *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*. L'EMS induit des mutations de transition de G-C à A-T. En effet, une base anormale *O*⁶-éthylguanine est formée suite à la réaction du groupement éthyle de l'EMS avec la guanine de l'ADN (Figure 11). Ainsi, au cours de la réplication, l'ADN polymérase apparie à la *O*⁶-éthylguanine une thymine à la place d'une cytosine (245).

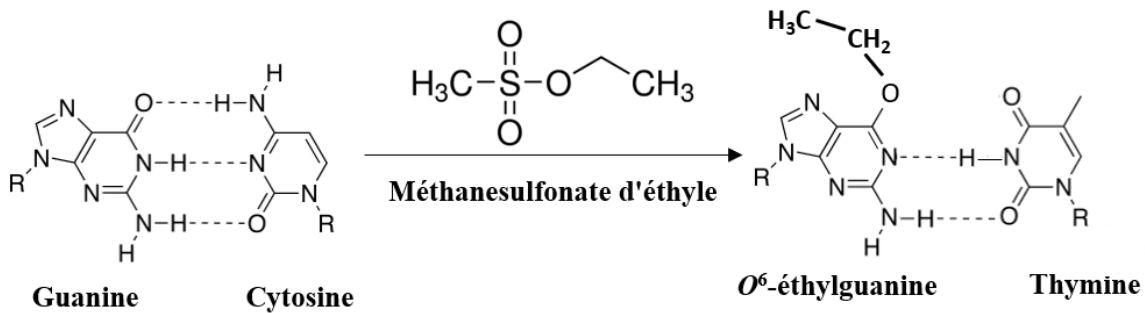


Figure 11. Mutagenèse par méthanesulfonate d'éthyle

5.4.3. Analyse des données de « Mut-Seq »

Il existe divers outils bioinformatiques pour l'analyse des données de séquençage afin d'identifier les mutations. Ces outils sont généralement utilisés comme des « pipelines » qui sont des ensembles de différentes étapes de traitement pour l'analyse des données de séquençage à travers une série de « scripts » ou programmes. Les processus débutent par des données brutes obtenues du SNG et se terminent par des données interprétables.

Après l'étape de contrôle qualité décrite dans la section 5.2.1, voici les étapes principales de l'analyse (271) :

- 1- **Alignement** : les séquences de lectures filtrées sont alignées sur leur génome de référence par le programme bwa-mem qui va générer un fichier appelé BAM. L'alignement principal n'est généralement pas suffisant pour appeler des variantes. Par conséquent, un raffinement de l'alignement est effectué en utilisant le logiciel Picard qui va marquer et supprimer les séquences de lectures en double.
- 2- **Appel des variantes** : un appel de variante est la détection d'une différence de nucléotide à une position donnée entre le génome séquencé et le génome de référence. Le logiciel GATK (« Genome Analysis Tool Kit ») est utilisé pour détecter les SNVs et les InDels. Des variantes peuvent être créées suite à un mauvais alignement ou un artefact de séquençage ou de PCR. Afin de minimiser le risque d'identifier des faux négatifs ou positifs tout en détectant avec une sensibilité et une spécificité suffisante les vraies variantes, GATK divise cette étape en deux sous-étapes : 1) l'appel de variantes (« variant calling ») qui permet de maximiser la

sensibilité et 2) la filtration de variantes (« variant filtering ») qui permet d'adapter le niveau de spécificité selon les besoins de l'analyse comme par exemple le pourcentage de SNVs toléré pour chaque position. (272)

- 3- **Annotation** : l'annotation des variantes consiste à identifier l'emplacement des variantes/mutations répertoriées dans les fichiers vcf (« variant call format ») obtenus à l'étape précédente. De nombreux « scripts » utilisant les langages bash et python ont été préparés afin de supprimer les SNVs et InDels communs à la souche parentale, de déterminer les gènes mutés, les codons et les acides aminés issus des mutations. Pour chaque espèce, plus que 45 mutants ont été séquencés, ainsi des scripts ont aussi été préparés afin d'identifier les gènes communs mutés.

5.4.3.1. Détermination des protéines orthologues chez les trois bactéries à Gram négatif étudiées

Pour faciliter la comparaison entre les trois espèces, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 13883 et *P. aeruginosa* ATCC 27853, l'analyse des «clusters» de groupes de protéines orthologues (« COGs : Clusters of Orthologous Groups ») a d'abord été effectuée, puis les COGs communs ont été déterminés.

Les orthologues sont deux gènes provenant d'un même gène ancestral mais dû à l'évolution des espèces ils se sont séparés et sont donc liés par descendance verticale par opposition aux paralogues qui sont des gènes du même génome liés par duplication. Typiquement, les protéines orthologues ont la même architecture de domaine et la même fonction, bien qu'il existe des exceptions et des complications significatives à cette généralisation, en particulier chez les eucaryotes multicellulaires (273).

La base de données COG, créée en 1997, a été un outil populaire pour l'annotation fonctionnelle. En 2003, les COGs ont été incorporés dans la base de données du domaine conservé du NCBI (CDD). Contrairement aux bases de données de domaines protéiques, telles que Pfam, SMART ou CDD, la plupart des entrées de la base de données COG étaient des protéines complètes. La base de données COG s'est appuyée sur l'analyse de

génomés microbiens complets (protéomes). Depuis 2014, elle couvre les génomes de 83 archaea et 628 bactéries. Ces organismes sont classés en trois phyla archéals et 14 phyla bactériens, entre autres les Firmicutes et les Protéobactéries. Cette base de données contient ainsi 1 785 722 protéines appartenant à 4631 COGs attribués à 26 codes représentant chacun une catégorie fonctionnelle (273-275). Par exemple, COG0085 est attribué au code K qui regroupe les protéines ayant une fonction liée à la transcription et sa fonction spécifique est la sous-unité β de l'ARN polymérase.

La procédure de construction du COG repose sur la notion simple que tout groupe d'au moins trois protéines de génomes distants, similaires les unes aux autres plus que toute autre protéine du même génome, ont plus de chances d'appartenir à une famille d'orthologues. Cette prédiction est valable même si le niveau absolu de similarité de séquence entre les protéines en question est relativement faible et, par conséquent, l'approche par COG prend en considération les gènes à évolution lente et à évolution rapide.

Chapitre 6 – Problématique, hypothèses et objectifs

6.1. Problématique

Les bactéries *S. pneumoniae*, *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* sont parmi les agents pathogènes prioritaires pour la recherche selon l’OMS, plus particulièrement, pour la résistance de *S. pneumoniae* à la PEN et celle des trois bactéries à Gram négatif aux carbapénèmes (22). Ces bactéries sont responsables d’un taux élevé de mortalité et de morbidité, surtout dû aux infections à Gram négatif nosocomiales (37, 51, 276-278). En effet, l’émergence au niveau mondial de souches cliniques multirésistantes est devenue problématique et rend le traitement des infections causées par ces espèces compliqué (41, 277-279). Les stratégies immunoprophylactiques comme les vaccins contre ces organismes ne sont actuellement disponibles que contre les infections à pneumocoques (40). Cependant, malgré l’efficacité des deux formules vaccinales antipneumococciques ciblant la capsule, le risque de l’émergence de sérotypes non inclus dans ces vaccins est toujours présent et les recherches actuelles se concentrent sur le développement ciblant des protéines pneumococciques conservées, afin d’optimiser la protection contre les 97 sérotypes de *S. pneumoniae* (40, 280, 281). Les efforts pour développer des vaccins contre les trois bactéries à Gram négatif (282-284) ainsi que le développement de nouveaux traitements ne sont pas encore concrétisés au niveau clinique (285-287). Il est donc impératif de s’affairer à la mise en place de nouvelles stratégies visant la préservation des traitements actuels.

6.2. Hypothèses

La PEN a été longtemps utilisée contre les infections à pneumocoques, mais son efficacité clinique a diminué due à l’apparition de clones résistants (22). La PEN agit en inhibant la synthèse de la paroi bactérienne, mais son mode d’action n’est pas complètement élucidé (288). La modulation de l’expression génique est au cœur de l’adaptation bactérienne et elle peut refléter la réponse cellulaire aux dommages induits par le stress ainsi que les altérations métaboliques associées à la mort cellulaire suite à un

traitement d'antibiotique (97, 289). De plus, le séquençage à haut débit des acides nucléiques (ADN ou ARN) a été utile pour détecter des mutations liées au mode d'action des antibiotiques et cela a été appliqué à *S. pneumoniae* (97, 269). En effet, le séquençage du génome de *S. pneumoniae* résistant à la PEN a confirmé le rôle des PLPs dans la résistance, mais il a également mis en évidence de nouvelles voies et gènes nécessaires pour la résistance aux β -lactamines (96). Ainsi nous avons émis l'hypothèse qu'une meilleure compréhension du mode d'action de la PEN par la technique d'ARN-seq couplée à des études fonctionnelles chez des souches *S. pneumoniae* sensibles nous permettrait de : 1) révéler l'ampleur des altérations métaboliques associées à la mort cellulaire, 2) identifier une nouvelle voie métabolique impliquée dans son mode d'action, et 3) améliorer l'efficacité de la PEN en proposant un adjuvant inhibant cette voie.

Les carbapénèmes tels que l'IMP sont des antibiotiques β -lactames dotés d'une structure moléculaire unique (204) qui leur permettent de se lier à plusieurs protéines de PLPs tout en résistant à l'hydrolyse de nombreuses β -lactamases (290, 291). Les carbapénèmes sont utilisés en dernier recours contre les agents pathogènes à Gram négatif multirésistants (291). Néanmoins, des résistances aux carbapénèmes ont été détectées chez *E. coli* et *K. pneumoniae* principalement en raison de la production des KPCs, des métallo- β -lactamases de classe B et des β -lactamases de classe D trouvées à la fois sur des plasmides et dans le chromosome (233). Une résistance due à une perte ou à une modification des porines associée à la production d'AmpC plasmidique ou chromosomique a également été observée (131, 225, 292). Chez *P. aeruginosa*, le principal mécanisme de résistance aux carbapénèmes est lié à des altérations de la protéine porine OprD, associée à une production accrue d'AmpC céphalosporinase chromosomique intrinsèque (293, 294). Malgré que les principaux mécanismes de résistance à l'IMP soient connus, il est aussi utile de comprendre les mécanismes de résistance secondaires. En effet, certaines mutations géniques sont indispensables aux bactéries pour vivre avec un génotype de résistance. L'approche Mut-Seq qui consiste à combiner un criblage chimiogénomique au SNG (243) a été utile pour l'étude de la résistance au TMP chez *S. pneumoniae* (159). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'application de la technique de Mut-Seq sur des espèces variées ne portant pas des plasmides exprimant des β -lactamases et l'analyse d'un grand

nombre de mutants indépendants permettraient de détecter des voies de résistance communes ainsi que des traits spécifiques à chaque espèce.

6.3. Objectifs

L'objectif principal de cette thèse est de mieux comprendre les modes d'action de la PEN et de l'IMP, faisant tous les deux partie des β -lactamines dont l'efficacité est menacée par l'émergence de la résistance chez divers bactéries. Ainsi, à la lumière des données obtenues, nous pourrions suggérer des cibles potentielles pour développer une bithérapie qui améliorerait l'efficacité clinique de ces deux antibiotiques.

L'objectif principal du chapitre 7 est de mieux comprendre le mode d'action de la PEN en étudiant la réponse transcriptomique à la suite du traitement par la PEN de différentes souches de *S. pneumoniae* sensibles par l'approche de l'ARN-Seq.

L'objectif principal du chapitre 8 est de mieux comprendre le mode d'action de l'IMP en identifiant par l'approche Mut-Seq des gènes mutés responsables de la résistance à cet antibiotique chez *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*.

Chapitre 7 - La pénicilline induit des altérations du métabolisme de la glutamine chez *Streptococcus pneumoniae*

7.1. Résumé

La PEN est un antibiotique bactéricide qui inhibe la synthèse du PG en ciblant les PLPs. Cette étude vise à évaluer la réponse transcriptionnelle de trois souches de *S. pneumoniae* après une exposition à des concentrations mortelles de la PEN pour mieux comprendre le mode d'action de cet antibiotique. Certains gènes dont l'altération de leur expression par la PEN a été précédemment décrite ont été modifiés, notamment *ciaRH*, *pstS* et *clpL*. Les gènes des opérons *glnRA* et *glnPQ* impliqués dans le métabolisme de la glutamine étaient parmi les gènes les plus sous-exprimés chez les trois souches. Le traitement à la PEN augmente les concentrations intracellulaires de glutamine, et l'inhibition chimique de la glutamine synthétase GlnA sensibilise *S. pneumoniae* à la PEN. En résumé, une combinaison d'ARN-Seq et de métabolomique a révélé que la PEN interfère avec le métabolisme de la glutamine, suggérant des stratégies qui pourraient être exploitées en bithérapie.

7.2. Abstract

Penicillin is a bactericidal antibiotic that inhibits the synthesis of the peptidoglycan by targeting penicillin-binding proteins. This study aimed to assess through transcriptional profiling the stress response of *S. pneumoniae* strains after exposure to lethal penicillin concentrations to understand further the mode of action of penicillin. Two experimental designs (time-course and dose-response) were used for monitoring the effect of penicillin on the transcriptional profile. The expression of some genes previously shown to be modulated by penicillin was altered, including *ciaRH*, *pstS* and *clpL*. Genes of the *glnRA* and *glnPQ* operons were among the most downregulated genes in the three strains. These genes are involved in glutamine synthesis and uptake and LC-MS work confirmed that penicillin treatment increases the intracellular glutamine concentrations. Glutamine conferred a protective role against penicillin when added to the culture medium. Glutamine synthetase encoded by *glnA* catalyses the transformation of glutamate and ammonium into glutamine and its chemical inhibition by the inhibitor L-methionine sulfoximine is shown to sensitize *S. pneumoniae* to penicillin, including penicillin-resistant clinical isolates. In summary, a combination of RNA-seq and metabolomics revealed that penicillin interferes with glutamine metabolism suggesting strategies that could eventually be exploited for combination therapy or for reversal of resistance.

7.3. Article

Penicillin induces alterations in glutamine metabolism in *Streptococcus pneumoniae*.

Jessica Y. El Khoury¹, Nancy Boucher¹, Michel G. Bergeron¹, Philippe Leprohon¹, Marc Ouellette^{1*}

¹Centre de Recherche en Infectiologie du Centre de Recherche du CHU de Québec and Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Québec, Canada

*Corresponding author : Marc Ouellette Ph.D.

Centre de Recherche en Infectiologie

2705 Boul. Laurier

Québec, Québec

G1V 4G2

Tel: 1-418-525-4444 #48184

Fax: 1-418-654-2715

E-mail: Marc.Ouellette@crchul.ulaval.ca

Running title: Penicillin interferes with glutamine metabolism.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, penicillin, glutamine, RNA-seq, metabolomics.

Introduction

Streptococcus pneumoniae is a Gram-positive bacteria responsible for several diseases such as otitis, sinusitis, pneumonia, sepsis and meningitis (1). People at risk are the elderly and young children, pneumococcal infections being responsible for the death of about 393 000 children under the age of five every year (2). Over the past decades, antibiotic resistance among *S. pneumoniae* has steadily increased, with 15 to 30 % of the strains currently being classified as multi-resistant (3). The introduction of two pneumococcal conjugate vaccines (PCV7 and PCV13) has slowed the spread of several epidemiologically significant serotypes, but antibiotic resistant rates continue to rise (4, 5).

Penicillin (PEN), a β -lactam antibiotic, remains a pillar against pneumococcal infections but resistant clones worldwide threaten its efficacy. This is especially true for pneumococcal meningitis against which third generation cephalosporins became the recommended treatment for non-susceptible PEN strains (6). PEN is a bactericidal antibiotic inhibiting the synthesis of the peptidoglycan layer of the bacterial cell wall by targeting penicillin binding proteins (PBPs). PBPs are membrane-associated enzymes involved in the final steps of peptidoglycan assembly (7). However, small molecules can have pleiotropic effects on cells and understanding the precise molecular events responsible for drug-induced events holds the promise of improving current therapies (8). Nucleic acids sequencing, whether DNA or RNA has helped in detecting effector mutations linked to antibiotics mode of action and this has been applied to *S. pneumoniae*. Indeed, sequencing the genome of β -lactam resistant *S. pneumoniae* confirmed the role of PBPs in resistance (9-12) but in addition also highlighted novel pathways and genes necessary for β -lactam resistance (13, 14).

Gene expression modulation, either at the transcriptional or translational levels, plays a central role in cellular adaptation to stresses (15). Gene expression profiling is thus well suited for deciphering the mode of action of drugs given that expression alteration usually mirrors the cellular response to drug-induced damage (16, 17). For example, a

microarray-based gene expression analysis in *S. pneumoniae* showed that the fluoroquinolone levofloxacin induces an upregulation of the *fatDCEB* operon coding for an iron transporter, leading to increased intracellular iron concentrations and ultimately to the accumulation of ROS (18). Other microarray-based studies in *S. pneumoniae* revealed many genes whose expression is modulated in response to different antibiotics but did not assess their outcome on resistance or susceptibility (19-21). Thus, a better understanding of the mode of action of PEN and of the cellular response induced by it would reveal the extent of metabolic alterations associated with cell death and identify new strategies to improve its effectiveness. Whole RNA sequencing is now surpassing DNA microarrays although not yet reported for studying β -lactam resistance or mode of action. However RNA-seq was successfully used in *S. pneumoniae* to look at the role of small RNAs on virulence (22), on host-pathogen interactions (23, 24) or at tetracycline resistance in *S. pneumoniae* (25).

We performed here a detailed RNA-seq experiment of *S. pneumoniae* when subjected to penicillin. We discovered that glutamine metabolism is altered and that interfering with glutamine synthesis can alter susceptibility to penicillin.

Results

Transcriptional response of *S. pneumoniae* to penicillin

Two experimental designs were used to monitor the effect of PEN on the transcriptional profile of *S. pneumoniae* R6. The first design analysed gene expression over time in *S. pneumoniae* R6 exposed to PEN at its minimum inhibitory concentration (MIC) and in control cells grown in parallel in the absence of antibiotic. Because understanding metabolic alterations requires working with cells that are still metabolically active, gene expression was monitored at three time points corresponding to survival rates of ~85% (T1), ~70% (T2) and ~50% (T3) (Supplementary Fig. S1b), in addition to the T0 baseline. All time points were selected to fit into the *S. pneumoniae* R6 logarithmic phase of growth

to minimize biases coming from growth-related regulation of gene expression. Only genes with a fold change (FC) higher than 2 ($\log_2 \text{FC} \leq -1$ or $\log_2 \text{FC} \geq +1$) and with a false discovery rate adjusted p value ≤ 0.05 (q -value) compared to the T0 baseline were considered as significantly modulated. Overall, 105 genes were differentially expressed upon exposure to PEN, of which 48 were overexpressed and 57 were downregulated (Table 1). Among the genes steadily upregulated over time were a number of molecular chaperones (spr0453-0456), metabolic enzymes (e.g. spr1074-1075) and uncharacterized proteins, as well as the two component regulator *ciaRH* (spr0707 and spr0708) already documented to be overexpressed upon PEN exposure (19). The CiaRH two component system is known to repress the competence regulon (26) and many competence-related genes had indeed their expression decreased from T0 to T3 (Table 1). These include the competence protein coding genes *celB* (spr0857), the operon *cglA*, *cglB*, *cglC* and *cglD* (spr1861-1864), the competence-specific transcription regulators *comX1* and *comX2* (spr0013, spr1819) and the single-stranded DNA-binding protein *ssbB* (spr1724) (Table 1). Genes coding for a phosphate ABC permease previously linked to PEN resistance was also overexpressed (spr1896-1899 in Table 1). Interestingly, the expression of several genes involved in glutamine metabolism steadily decreased upon PEN exposure (spr0443, spr0444 and spr1121 in Table 1). These are coding for the ABC transporter GlnQ, the transcriptional regulator GlnR and the glutamine synthetase GlnA, the latter two genes being the most downregulated from the dataset (Table 1).

The second experimental design analysed the transcriptional response of *S. pneumoniae* R6 exposed to increasing concentrations of PEN (0.5X, 1X, 5X and 10X PEN MIC) for 15 minutes. These conditions were selected so the survival rate at the highest concentration would not be less than 30% to ensure the presence of metabolically active cells (Supplementary Fig. S1d). Of the 129 genes modulated, 42 were common to the time course design (underlined in Table 2). Among these, the expression of the *hcrA-grpE-dnaK-dnaJ* operon (spr0453-0456) coding for heat shock proteins and molecular chaperones, as well as the expression of the chaperone *groEL* (spr1722) and of a PTS system (spr0562-0563), was similarly increased in both designs. Specific to this incremental dosing design was the upregulation of operons involved in gluconate

metabolism (spr0287-spr0290) and iron transport (spr1684-spr1687) (Table 2), the latter being of interest given the reported role of iron in PEN lethality (13, 17). Remarkably, the glutamine metabolic and transporter genes *glnR*, *glnA*, *glnP* and *glnQ* were again among the most downregulated genes (Table 2). To further validate this finding, and because *S. pneumoniae* isolates are highly polymorphic (27), the time-course RNA-seq based transcriptomics were replicated with two PEN-susceptible clinical isolates (CCRI-21487 and CCRI-8970). Strikingly, while several genes had their expression changed in the clinical strains (Supplementary Tables S1 and S2), *glnR*, *glnA* and *glnQ* were among the few genes modulated in a common fashion in the presence of PEN in every condition tested (Table 3). Quantitative RT-PCR was used to monitor the expression of these genes at T3 compared to T0 and confirmed that PEN enhances the downregulation of *glnA*, *glnR*, *glnP* and *glnQ* in the three *S. pneumoniae* strains (Fig. 1).

Modulation in glutamine levels in penicillin treated *S. pneumoniae*

The transcriptomics data revealed a possible alteration to the metabolism of glutamine in *S. pneumoniae* upon exposure to PEN and this was further analysed using liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS). The levels of glutamine and glutamate were quantified in the three *S. pneumoniae* R6, CCRI-8970 and CCRI-21487 strains in the presence or absence of PEN at time point equivalent to T3 above, in addition to the T0 baseline (Table 3). In *S. pneumoniae* R6 the level of glutamine increased close to 40-fold after exposure to PEN, whereas it increased just by 2 fold in untreated bacteria (Fig. 2a). The levels of glutamate changed more modestly, an increase of 6-fold, in bacteria treated with PEN (Fig. 2a). PEN also increased glutamine concentration in *S. pneumoniae* CCRI-21487 close to 8 fold (Fig. 2b), while glutamate level were only modestly increased (Fig. 2b). Glutamine and glutamate levels remained unchanged in untreated CCRI-21487 (Fig. 2b). As for *S. pneumoniae* CCRI-8970, glutamine level increased close to 2 fold after exposure to PEN, whereas it decreased by 0.5 fold in the untreated bacteria (Fig. 2c). Glutamate level remained unchanged after exposure to PEN and similarly to the level of glutamine, it decreased by around 0.5 fold in untreated CCRI-8970 (Fig. 2c).

Glutamine confers low-level protection against penicillin in *S. pneumoniae* R6

Penicillin increases glutamine levels (Fig. 2). We tested whether glutamine could protect against penicillin action. *S. pneumoniae* R6 was grown in BHI medium supplemented with glutamine at 0, 6 and 12 mM at early log-phase, half an hour before the addition of PEN at 1X MIC (Supplementary Fig. S2a). The survival rates at 30 min and 60 min were derived from the ratio of bacterial counts in the presence of PEN compared to untreated bacteria at each time point. Interestingly, glutamine at 6mM and 12mM conferred considerable protection against PEN by increasing survival rates at 30 min from 40% to 60% and from 40% to 75%, respectively (Fig. 3a). Survival rates also increased from 5% to 11% at 60 min in the presence of glutamine (Fig. 3a). The protection conferred by glutamine supplementation was specific to PEN and was not observed with ciprofloxacin (CIP), a fluoroquinolone antibiotic inhibiting DNA replication (Fig. 3b & Supplementary Fig. S2b). In fact in the case of CIP, glutamine at 6mM or 12mM was detrimental and apparently enhanced its lethality by decreasing survival rates from 60 % to 38 % and from 20% to 5 % at 30 and 60 min, respectively (Fig. 3b).

Inhibiting the glutamine synthetase GlnA renders *S. pneumoniae* more susceptible to penicillin

Because glutamine supplementation decreased susceptibility to PEN, we next sought whether inhibiting the glutamine synthetase GlnA would enhance PEN lethality. The MIC of PEN against *S. pneumoniae* R6 was determined in the presence of L-methionine sulfoximine (MSO), a specific inhibitor of GlnA (28-30). Attempts to determine the toxicity of MSO in *S. pneumoniae* were not possible by microdilution and bacteria were growing albeit at a lesser density up to 32 mM by macrodilution. The larger culture volume of macrodilution (see Methods) facilitated measurements. Several concentrations of MSO were tested in combination with PEN, and 0.5 mM MSO was found to have maximal effect on PEN susceptibility while alone having minimal activity against *S. pneumoniae*. Indeed, 0.5 mM MSO increased the susceptibility of *S. pneumoniae* R6 to PEN by four-fold, from a MIC of 0.03 µg/mL in the absence of MSO to a MIC of 0.008

μg/mL (Table 4). Addition of glutamine at 12 mM completely reverted this PEN hyper-susceptibility phenotype (Table 4). A two- to four-fold sensitization to PEN induced by MSO was also observed in the PEN-susceptible *S. pneumoniae* clinical isolates CCRI-21487 and CCRI-8970, but also in PEN-resistant clinical isolates (CCRI-1397, CCRI-1414 and CCRI-1983) (Table 4). Again, glutamine fully (or partially in the case of CCRI-1983) rescued the hyper-susceptibility phenotype (Table 4).

Discussion

Gene expression modulation is central to bacterial adaptation and can mirror the cellular response to stress-induced damages. In this study, we used RNA-seq to assess the metabolic consequences of exposure to PEN in *S. pneumoniae*. A number of genes previously shown to be implicated in PEN resistance were detected, including *ciaRH* (19), *pstS* (19, 31) and *clpL* (32, 33). The transcriptional regulator *CiaR* was previously shown to influence on natural competence and susceptibility to β-lactams in *S. pneumoniae* (34). It is known to activate fourteen promoters (35) and many of the genes under its control had indeed increased expression in the presence of PEN, such as the foldase *prsA*, the acetyl xylan esterase *axeI*, the maltodextrin phosphorylase *malP*, the serine protease *htrA*, the chromosome segregation protein *spoOJ* and the hypothetical protein coding genes *spr0782* and *spr0931* (Table 1). *CiaR* also drives the expression of small regulatory non-coding RNAs (36) and one target of such RNA (the formate/nitrate transporter *nirC*) was found to be overexpressed (Table 1). Apart from the *CiaRH* regulon, adenylate kinase, glutathione S-transferase, the fatty acid and phospholipid-related genes *fabK*, *fabG*, *fabF*, *fabZ* and *accD* and a gene from the MutT/nudix family whose expression was decreased in our RNA-seq data had previously been shown to be downregulated by PEN using microarrays (19), so is the case for the overexpression of LysM domain-containing proteins and molecular chaperones (Tables 1 & 2).

Common to all *S. pneumoniae* strains and transcriptomics designs was the downregulation of the *glnRA* and *glnPQ* operons (Table 3). The transcriptional regulator

glnR mediates the repression of its own *glnRA* operon, the *glnPQ-zwf* operon and the *gdhA* gene by binding to a conserved operator sequence (37). The gene *glnA* encodes glutamine synthetase which is responsible for the conversion of glutamate and ammonium into glutamine (37). GlnA also indirectly influences the transcription of its own operon by stimulating the binding of GlnR. The *glnPQ* genes are coding for a transporter involved in glutamine scavenging (37). Targeted metabolomics using LC-MS revealed an increase in glutamine concentrations following exposure to PEN in all three *S. pneumoniae* strains studied (Fig. 2). The increase is considerable with 4-to-20 fold increase compared to the untreated cells control. Since high concentration of glutamine down-regulates the *glnRA* and *glnPQ* operons (37, 38), the decreased expression of those two operons (Table 3) are most likely due to the penicillin-induced increase in glutamine levels (Fig. 2). Glutamate levels increased moderately (2-4 fold) in the *S. pneumoniae* R6, CCRI-21487 and CCRI-8970 when compared to untreated cells at the same time point (Fig. 2). Intriguingly, glutamine levels were increased two-fold in R6 during growth (Fig. 2a) but not in the two other strains. One possible candidate is *glnH* (spr0534) coding for an ABC transporter that binds glutamine and glutamate (39). Indeed, *glnH* remained constant in R6 untreated cells but downregulated in untreated CCRI-8970 and CCRI-21487 (tables S1 and S2). These RNA-seq data were confirmed by qRT-PCR (Supplementary Fig. S3). Upon penicillin treatment, *glnH* is downregulated in the two clinical isolates but upregulated in R6 (Supplementary Fig. S3). This differential expression of *glnH* in R6 may contribute to the higher uptake and accumulation of glutamate and glutamine observed in R6 (Fig. 2).

The mechanism by which PEN increases the levels of glutamine is still unclear. However, glutamine is a major nitrogen donor for the synthesis of cell building blocks and is used by the aminotransferase GlmS to convert fructose-6-phosphate into glucosamine-6-phosphate (Glc-6P) (40). GlmS occupies a central position between glycolysis and peptidoglycan synthesis in catalysing the first of a series of reactions leading to the cell wall precursor UDP-N-acetylglucosamine (40). Inactivation or chemical inhibition of GlmS was shown to synergize with a broad set of cell wall synthesis inhibitors in *Staphylococcus aureus* (41, 42). Similarly, disruption of the downstream phosphoglucosamine mutase GlmM increased the susceptibility of *Streptococcus gordonii* to PEN (43) in addition to

decrease methicillin resistance in *S. aureus* without affecting the production of endogenous PBPs (44-46). Similarly, inhibiting the wall teichoic acid transporter protein TarG was shown to potentiate the activity of imipenem against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (47). Consistent with these findings, here we observed that the inhibition of *GlnA* leads to penicillin sensitization in *S. pneumoniae* clinical isolates (Table 4). Chemical inhibition of GlmS in methicillin-resistant *S. aureus* (42) and of *GlnA* in PEN-resistant *S. pneumoniae* clinical isolates (Table 4) decreased their levels of resistance. Conversely, the mere addition of glutamine was found to be partly protective against the action of penicillin (Fig. 3). Glutamine is also a co-factor for the amidation of the second amino acid residue of lipid II by MurT/GatD, which is required for efficient cross-linking of the peptidoglycan (48). It remains to be established whether glutamine accumulation is a secondary response from bacteria to PEN attack against the peptidoglycan assembly machinery or if the role of PEN is more direct, for example by hampering the use of glutamine by GlmS or by MurT/GatD. Additional work may shed further light on this.

In an era of ever increasing antibiotic resistance and shortage of new molecules, new strategies are required for increasing the activity of current antibiotics against sensitive and resistant bacteria. Our study showed a new link between glutamine metabolism and PEN susceptibility. The search for antibiotic adjuvants is now an intensive field of investigations (8). Metabolites are now emerging as possible adjuvants and one possible strategy is the inhibition of metabolic pathways. For example exogenous alanine was shown to revert kanamycin resistance in a number of bacterial species (49) and tetracycline resistance and thiamine biosynthesis were linked in *S. pneumoniae* (25) while bacterial resistance to tetracycline can be reversed using tryptophan analogues (50). Further investigations are warranted in the attempt of restoring PEN activity using strategies to lower cellular glutamine levels. For example, untargeted metabolomics experiments may help elucidating the mechanism by which PEN leads to cell death by revealing the extent of metabolic alterations associated with it. This may have added benefits as glutamine was also shown to be involved in virulence, and deletion of *glnA* and *glnP* led to attenuated colonization (38) and to decreased bloodstream invasiveness and survival in the lungs (38), respectively. While still speculative, interfering with the metabolism of glutamine such as

inhibiting GlnA would increase PEN susceptibility but also reduces virulence and drug-like leads against this target may thus serve dual purposes when paired with existing β -lactam antibiotics.

Methods

Bacterial strains and growth conditions

S. pneumoniae strains were grown in brain heart infusion broth (BHI, Becton Dickinson), or in blood agar containing 5% defibrinated sheep's blood (Becton Dickinson). Cultures were incubated for 16 to 24 hours in a 5 % CO₂ atmosphere at 35°C as previously described (51). All strains were maintained frozen at -80°C in BHI containing 15% glycerol. For the RNA-seq experiments, *S. pneumoniae* was grown in BHI broth at 35°C until early log-phase (OD₆₀₀ = 0.11). At this time (T0), cultures were divided into 18 tubes for the time-course design, half of which contained 1X MIC PEN and incubated until survival rates of 95-75% (T1), 75-60% (T2) and 60-40% (T3) (6 tubes each). These time points correspond to 15, 30 and 40 min for R6, 8, 18 and 28 min for CCRI-21487 and 45, 65 and 85 min for CCRI-8970. For the dose-response design, at T0 *S. pneumoniae* R6 culture was divided into 30 tubes, half of which contained either 0.5X, 1X, 5X or 10X PEN MIC, and incubated for 15 min. At each time point, a serial dilution in PBS 1x was carried out to determine survival rates.

Antibacterial susceptibility testing

MIC of PEN or CIP were determined with E-test strips (AB BioMérieux) on Müller-Hinton agar plates supplemented with 5% sheep blood (Becton Dickinson) using manufacturer's instructions. The MICs were further confirmed by the microdilution method in a 96 wells plate according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines in 0.1 ml Cation Adjusted Müller-Hinton Broth (CAMHB) supplemented with 5% lysed sheep blood (Difco). All MICs were determined from three independent biological replicates, each replicate being further assessed in technical duplicates. PEN and CIP were purchased from Sigma-Aldrich.

Macrodilution was performed in triplicate in a volume of 3 ml in CAMHB or CAMHB supplemented with 12 mM glutamine. *S. pneumoniae* inoculum were prepared by suspending colonies grown overnight on TSA agar (Becton Dickinson) using 1× PBS to achieve a turbidity of 0.5 McFarland (1×10^8 CFU/ml). Fifteen microliters of this suspension was inoculated to the CAMBH broth to reach a concentration of 5×10^5 CFU/mL. MICs of PEN were determined in the presence or absence of varying concentrations (0.008 to 32 mM) of L-methionine sulfoximine (MSO; Sigma-Aldrich) but 0.5 mM was the lowest MSO concentration to allow maximal effects on the MIC of PEN. For sensitive strains, the range of PEN concentrations tested varied between 0.004 and 0.12 µg/mL in doubling dilutions. For resistant isolates this varied from 0.06 to 8 µg/mL. Tubes were incubated at 35 °C and turbidity was checked after 20-24h.

RNA sequencing

Total RNA was isolated at different time points from *S. pneumoniae* R6, CCRI-8970 and CCRI-21487 grown in BHI using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. The RNAs were treated with DNase I (Ambion) to avoid any DNA contamination. RNAs were quantified using 2100 BioAnalyzer RNA6000 Nano chips (Agilent) and 1 µg of total RNA was treated with Ribo-Zero™ Magnetic Kit for Gram-Positive Bacteria (Epicentre). The rRNA-depleted samples were purified using RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen). RNA-seq libraries were produced from 50 ng of rRNA-depleted samples using the ScriptSeq™ v2 RNA-Seq Library Preparation Kit (Epicentre). The libraries were analysed using 2100 BioAnalyser High Sensitivity DNA Chips (Agilent) and quantified by QuantiFluor. The libraries were pooled, diluted to 8 pM and sequenced on an Illumina HiSeq system using a 101 bp paired-ends reads protocol.

RNA-seq data analysis

The *S. pneumoniae* R6 genome (52) (NCBI accession number AE007317) was used as reference. Sequencing reads were aligned to the *S. pneumoniae* R6 genome and analysed using the software Rockhopper (53) with default settings. The RNA-seq data are available

under the accessions number from SAMN07298959 to SAMN07298986 under the BioProject PRJNA392406.

Quantitative reverse transcription (qRT-PCR)

The qRT-PCR experiment was done as previously described (25). Briefly, total RNAs were extracted as described above and treated with DNase I (Ambion) to avoid any DNA contamination. RNA quality and integrity was assessed by agarose gel electrophoresis. cDNAs were generated from 50 ng of total RNA using the Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) and random hexamers according to the manufacturer's instructions. qRT-PCR assays were carried out on a Bio-Rad Cyclor using SYBR Green I. A final volume of 10 μ l was used for each reaction containing specific primers (Table S4) and iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). The relative quantitation of gene expression was performed using the relative standard curve method. All qRT-PCR data were normalized according to the amplification signals of 16S rRNA.

Metabolites extraction

S. pneumoniae strains were grown in BHI broth at 35°C until they reached early log-phase ($OD_{600} = 0.11$). At this time (T0), cultures were divided into 6 tubes of 10 mL, half of which contained 1X MIC PEN, and incubated for a duration equivalent to time point T3 of the time-course RNA-seq experiments. Samples were rapidly quenched by submersion into dry ice/ethanol for 20 sec. The quenched samples were centrifuged at 1500 RCF for 10 min at 4°C then washed twice with ice-cold PBS 1 \times and centrifuged for 5 min at 4°C. Pellets were flash frozen in liquid nitrogen before being stored at -80°C until use. Cell lysis and protein denaturation was achieved by addition of 200 μ L of cooled methanol: water (4:1) supplemented with a mixture of deuterated glutamine and glutamate standards (at 300 and 500 ng/mL respectively) along with 100 mg acid washed glass beads ($\leq 106 \mu$ m, Sigma) to the pellets followed by agitation in a bead beater at 4°C for 6 cycles of 1 min agitation and 1 min cooling (Mini-BeadBeater-24, BioSpec Products, Inc.). Samples were then centrifuged at 13000 rpm for 5 min at 4°C. Supernatant (150 μ L) were speed-vac dried for 65 min at medium heat. Lyophilised samples were kept at -80°C until further analysis. The

LC-MS data were normalized according to the bacterial count obtained by plating on Trypticase soy agar supplemented with 5% sheep blood (BD).

LC-MS

Lyophilised samples were resuspended in 150 μ L of 50:50 of mobile phase A: mobile phase B (MPA: MPB), sonicated 5 min and filtrated on a 0.45 μ m filter before injection. Liquid chromatography was performed on an Acquity UPLC I-Class binary pump system. The MPA consisted of 0.1 % formic acid in water and the MPB consisted of 0.1 % formic acid in acetonitrile. The column used was a BEH Amide 1.7 μ M x 2.1 mm x 150 mm (Waters Corporation, part no. 186004802) at 45°C. A VanGuard pre-column with 2.1 X 5 mm filter unit (Waters corporation, part no 205000343) was used to protect the analytical column from impurities. Gradient conditions were: 0.01 to 0.1 min = 99 % B; 0.1 to 7.00 min = 99 to 50 % B; 7.00 to 7.10 min = 50 % to 99 % B; 7.10 to 10.00 min = 99 % B. Injection volume was 2.0 μ L, and flow rate was 0.4 mL/min. Single reaction monitoring (SRM) analysis were performed on a Q-TOF Synapt G2-*Si* system with an electrospray ionization source (ESI) in positive ionization mode. Source conditions and MS parameters were optimized by direct infusion of standards in sensitivity mode. MS parameters included: capillary voltage 2.75 kV, source temperature 120°C, desolvation temperature 325°C and desolvation gas 900 L*min⁻¹. The specific SRM transitions for quantification were: glutamate 147.0764 > 130.0499, glutamine 148.0604 > 130.0499, deuterated glutamate 153.0979 > 135.0838 and deuterated glutamine 152.1155 > 135.0838. All data were collected by MassLynx software version 4.1. Deuterated glutamate (DLM-357-0.25) and deuterated glutamine (DLM-1826-0.1) were purchased from Cambridge Isotope Laboratories. Calibration curves of both metabolites using seven concentration points (23-46-94-187-375-750 and 1500 ng/mL) were obtained by comparison of the area ratios. Deuterated standards and QC samples at low (80 ng/mL), medium (320 ng/mL) and high (640 ng/mL) concentration were directly diluted in a pool of matrix from *S. pneumoniae* untreated samples. The relative concentrations of intracellular glutamine and glutamate in metabolite extracts were determined against the calibration curves. For a detailed description of the LC-MS analysis, see the supplementary data (Supplementary Tables S5 & S6).

Statistical Analysis

Statistical analysis for the qRT-PCR experiment was done using a split plot design and Fisher's F-test using the SAS software. Significant differences in the LC-MS quantification of glutamine and glutamate and in survival rates in the presence of glutamine were determined using unpaired (two-tailed) Student's t test in GraphPad Prism. Comparative data with a p value ≤ 0.05 were considered statistically different.

Acknowledgments

This work was supported by Canadian Institutes of Health Research grant number 81266 to M. O. M.O. is the holder of a Tier 1 Canada Research Chair in Antimicrobial Resistance. We would also like to thank Pier-Luc Plante for his helpful advice and Francis Brière for his technical assistance in the LC-MS experiment. We thank Awa Diop from « Service de consultation statistique, Université Laval » for performing the statistical analysis for the qRT-PCR experiment.

Author contributions

JYEK, PL and MO designed the study. JYEK performed the experiments, analysed the data and drafted the manuscript; NB performed the LC-MS analysis. MGB provided materials. PL, MGB and MO revised the manuscript and provided critical comments. All authors approved the final version of the manuscript.

Competing financial interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Pneumococcal Vaccines WHO Position Paper--2012. Wkly Epidemiol Rec. 87, 129-144 (2012).
2. Global, Regional, and National Life Expectancy, All-Cause Mortality, and Cause-Specific Mortality for 249 Causes of Death, 1980-2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. Lancet. 388, 1459-1544, doi:10.1016/S0140-6736(16)31012-1 (2016).
3. Lynch, J. P., 3rd & Zhanel, G. G. *Streptococcus Pneumoniae*: Does Antimicrobial Resistance Matter? Semin Respir Crit Care Med. 30, 210-238, doi:10.1055/s-0029-1202939 (2009).
4. Picazo, J. J. Management of Antibiotic-Resistant *Streptococcus Pneumoniae* Infections and the Use of Pneumococcal Conjugate Vaccines. Clin Microbiol Infect. 15 Suppl 3, 4-6, doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02723.x (2009).
5. Jones, R. N., Sader, H. S., Mendes, R. E. & Flamm, R. K. Update on Antimicrobial Susceptibility Trends among *Streptococcus Pneumoniae* in the United States: Report of Ceftaroline Activity from the Sentry Antimicrobial Surveillance Program (1998-2011). Diagn Microbiol Infect Dis. 75, 107-109, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.08.024 (2013).
6. Therapy for Children with Invasive Pneumococcal Infections. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases. Pediatrics. 99, 289-299 (1997).
7. Tomasz, A. Penicillin-Binding Proteins and the Antibacterial Effectiveness of Beta-Lactam Antibiotics. Rev Infect Dis. 8 Suppl 3, S260-278 (1986).
8. Wright, G. D. Antibiotic Adjuvants: Rescuing Antibiotics from Resistance. Trends Microbiol. 24, 862-871, doi:10.1016/j.tim.2016.06.009 (2016).
9. Tait-Kamradt, A. G., Cronan, M. & Dougherty, T. J. Comparative Genome Analysis of High-Level Penicillin Resistance in *Streptococcus Pneumoniae*. Microb Drug Resist. 15, 69-75, doi:10.1089/mdr.2009.0891 (2009).

10. Pillai, D. R. et al. Genome-Wide Dissection of Globally Emergent Multi-Drug Resistant Serotype 19a *Streptococcus Pneumoniae*. BMC Genomics. 10, 642, doi:10.1186/1471-2164-10-642 (2009).
11. Fani, F., Leprohon, P., Zhanel, G. G., Bergeron, M. G. & Ouellette, M. Genomic Analyses of DNA Transformation and Penicillin Resistance in *Streptococcus Pneumoniae* Clinical Isolates. Antimicrob Agents Chemother. 58, 1397-1403, doi:10.1128/AAC.01311-13 (2014).
12. Li, Y. et al. Penicillin-Binding Protein Transpeptidase Signatures for Tracking and Predicting β -Lactam Resistance Levels in *Streptococcus Pneumoniae*. MBio. 7, doi:10.1128/mBio.00756-16 (2016).
13. Fani, F., Leprohon, P., Legare, D. & Ouellette, M. Whole Genome Sequencing of Penicillin-Resistant *Streptococcus Pneumoniae* Reveals Mutations in Penicillin-Binding Proteins and in a Putative Iron Permease. Genome Biol. 12, R115, doi:10.1186/gb-2011-12-11-r115 (2011).
14. Fani, F., Brotherton, M. C., Leprohon, P. & Ouellette, M. Genomic Analysis and Reconstruction of Cefotaxime Resistance in *Streptococcus Pneumoniae*. J Antimicrob Chemother. 68, 1718-1727, doi:10.1093/jac/dkt113 (2013).
15. Janga, S. C. & Contreras-Moreira, B. Dissecting the Expression Patterns of Transcription Factors across Conditions Using an Integrated Network-Based Approach. Nucleic Acids Res. 38, 6841-6856, doi:10.1093/nar/gkq612 (2010).
16. Dwyer, D. J., Kohanski, M. A., Hayete, B. & Collins, J. J. Gyrase Inhibitors Induce an Oxidative Damage Cellular Death Pathway in *Escherichia Coli*. Mol Syst Biol. 3, 91, doi:10.1038/msb4100135 (2007).
17. Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Hayete, B., Lawrence, C. A. & Collins, J. J. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. Cell. 130, 797-810, doi:10.1016/j.cell.2007.06.049 (2007).
18. Ferrandiz, M. J. & de la Campa, A. G. The Fluoroquinolone Levofloxacin Triggers the Transcriptional Activation of Iron Transport Genes That Contribute to Cell Death in

Streptococcus Pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother. 58, 247-257, doi:10.1128/AAC.01706-13 (2014).

19. Rogers, P. D. et al. Gene Expression Profiling of the Response of *Streptococcus Pneumoniae* to Penicillin. J Antimicrob Chemother. 59, 616-626, doi:10.1093/jac/dkl560 (2007).

20. Haas, W., Kaushal, D., Sublett, J., Obert, C. & Tuomanen, E. I. Vancomycin Stress Response in a Sensitive and a Tolerant Strain of *Streptococcus Pneumoniae*. J Bacteriol. 187, 8205-8210, doi:10.1128/JB.187.23.8205-8210.2005 (2005).

21. Ng, W. L., Kazmierczak, K. M., Robertson, G. T., Gilmour, R. & Winkler, M. E. Transcriptional Regulation and Signature Patterns Revealed by Microarray Analyses of *Streptococcus Pneumoniae* R6 Challenged with Sublethal Concentrations of Translation Inhibitors. J Bacteriol. 185, 359-370 (2003).

22. Mann, B. et al. Control of Virulence by Small RNAs in *Streptococcus Pneumoniae*. PLoS Pathog. 8, e1002788, doi:10.1371/journal.ppat.1002788 (2012).

23. Pettigrew, M. M. et al. Dynamic Changes in the *Streptococcus Pneumoniae* Transcriptome During Transition from Biofilm Formation to Invasive Disease Upon Influenza A Virus Infection. Infect Immun. 82, 4607-4619, doi:10.1128/IAI.02225-14 (2014).

24. Aprianto, R., Slager, J., Holsappel, S. & Veening, J. W. Time-Resolved Dual RNA-Seq Reveals Extensive Rewiring of Lung Epithelial and Pneumococcal Transcriptomes During Early Infection. Genome Biol. 17, 198, doi:10.1186/s13059-016-1054-5 (2016).

25. Lupien, A., Gingras, H., Bergeron, M. G., Leprohon, P. & Ouellette, M. Multiple Mutations and Increased RNA Expression in Tetracycline-Resistant *Streptococcus Pneumoniae* as Determined by Genome-Wide DNA and mRNA Sequencing. J Antimicrob Chemother. 70, 1946-1959, doi:10.1093/jac/dkv060 (2015).

26. Mascher, T. et al. The *Streptococcus Pneumoniae* Cia Regulon: CiaR Target Sites and Transcription Profile Analysis. J Bacteriol. 185, 60-70 (2003).

27. Hakenbeck, R. et al. Mosaic Genes and Mosaic Chromosomes: Intra- and Interspecies Genomic Variation of *Streptococcus Pneumoniae*. *Infect Immun.* 69, 2477-2486, doi:10.1128/IAI.69.4.2477-2486.2001 (2001).
28. Ronzio, R. A., Rowe, W. B. & Meister, A. Studies on the Mechanism of Inhibition of Glutamine Synthetase by Methionine Sulfoximine. *Biochemistry.* 8, 1066-1075 (1969).
29. Rowe, W. B., Ronzio, R. A. & Meister, A. Inhibition of Glutamine Synthetase by Methionine Sulfoximine. Studies on Methionine Sulfoximine Phosphate. *Biochemistry.* 8, 2674-2680 (1969).
30. Brusilow, W. S. & Peters, T. J. Therapeutic Effects of Methionine Sulfoximine in Multiple Diseases Include and Extend Beyond Inhibition of Glutamine Synthetase. *Expert Opin Ther Targets.* 1-9, doi:10.1080/14728222.2017.1303484 (2017).
31. Soualhine, H. et al. A Proteomic Analysis of Penicillin Resistance in *Streptococcus Pneumoniae* Reveals a Novel Role for PstS, a Subunit of the Phosphate ABC Transporter. *Mol Microbiol.* 58, 1430-1440, doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04914.x (2005).
32. Tran, T. D. et al. Decrease in Penicillin Susceptibility Due to Heat Shock Protein ClpL in *Streptococcus Pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 55, 2714-2728, doi:10.1128/AAC.01383-10 (2011).
33. Tran, T. D. et al. Heat-Shock Protein ClpL/HSP100 Increases Penicillin Tolerance in *Streptococcus Pneumoniae*. *Adv Otorhinolaryngol.* 72, 126-128, doi:10.1159/000324658 (2011).
34. Guenzi, E., Gasc, A. M., Sicard, M. A. & Hakenbeck, R. A Two-Component Signal-Transducing System Is Involved in Competence and Penicillin Susceptibility in Laboratory Mutants of *Streptococcus Pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 12, 505-515 (1994).
35. Halfmann, A., Kovacs, M., Hakenbeck, R. & Bruckner, R. Identification of the Genes Directly Controlled by the Response Regulator CiaR in *Streptococcus Pneumoniae*: Five out of 15 Promoters Drive Expression of Small Non-Coding RNAs. *Mol Microbiol.* 66, 110-126, doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05900.x (2007).

36. Schnorpfeil, A. et al. Target Evaluation of the Non-Coding csRNAs Reveals a Link of the Two-Component Regulatory System CiaRH to Competence Control in *Streptococcus Pneumoniae* R6. *Mol Microbiol.* 89, 334-349, doi:10.1111/mmi.12277 (2013).
37. Kloosterman, T. G. et al. Regulation of Glutamine and Glutamate Metabolism by GlnR and GlnA in *Streptococcus Pneumoniae*. *J Biol Chem.* 281, 25097-25109, doi:10.1074/jbc.M601661200 (2006).
38. Hendriksen, W. T. et al. Site-Specific Contributions of Glutamine-Dependent Regulator GlnR and GlnR-Regulated Genes to Virulence of *Streptococcus Pneumoniae*. *Infect Immun.* 76, 1230-1238, doi:10.1128/IAI.01004-07 (2008).
39. Hartel, T. et al. Impact of Glutamine Transporters on Pneumococcal Fitness under Infection-Related Conditions. *Infect Immun.* 79, 44-58, doi:10.1128/IAI.00855-10 (2011).
40. Kanehisa, M. et al. Data, Information, Knowledge and Principle: Back to Metabolism in Kegg. *Nucleic Acids Res.* 42, D199-205, doi:10.1093/nar/gkt1076 (2014).
41. Komatsuzawa, H. et al. The Gate Controlling Cell Wall Synthesis in *Staphylococcus Aureus*. *Mol Microbiol.* 53, 1221-1231, doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04200.x (2004).
42. Lee, S. H. et al. Antagonism of Chemical Genetic Interaction Networks Resensitize MRSA to β -Lactam Antibiotics. *Chem Biol.* 18, 1379-1389, doi:10.1016/j.chembiol.2011.08.015 (2011).
43. Shimazu, K. et al. Identification of the *Streptococcus Gordonii glmM* Gene Encoding Phosphoglucosamine Mutase and Its Role in Bacterial Cell Morphology, Biofilm Formation, and Sensitivity to Antibiotics. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 53, 166-177, doi:10.1111/j.1574-695X.2008.00410.x (2008).
44. Wu, S., de Lencastre, H., Sali, A. & Tomasz, A. A Phosphoglucomutase-Like Gene Essential for the Optimal Expression of Methicillin Resistance in *Staphylococcus Aureus*: Molecular Cloning and DNA Sequencing. *Microb Drug Resist.* 2, 277-286, doi:10.1089/mdr.1996.2.277 (1996).

45. Jolly, L. et al. The *Femr315* Gene from *Staphylococcus Aureus*, the Interruption of Which Results in Reduced Methicillin Resistance, Encodes a Phosphoglucosamine Mutase. *J Bacteriol.* 179, 5321-5325 (1997).
46. Glanzmann, P., Gustafson, J., Komatsuzawa, H., Ohta, K. & Berger-Bachi, B. *glmM* Operon and Methicillin-Resistant *glmM* Suppressor Mutants in *Staphylococcus Aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 43, 240-245 (1999).
47. Wang, H. et al. Discovery of Wall Teichoic Acid Inhibitors as Potential Anti-MRSA β -Lactam Combination Agents. *Chem Biol.* 20, 272-284, doi:10.1016/j.chembiol.2012.11.013 (2013).
48. Zapun, A. et al. In Vitro Reconstitution of Peptidoglycan Assembly from the Gram-Positive Pathogen *Streptococcus Pneumoniae*. *ACS Chem Biol.* 8, 2688-2696, doi:10.1021/cb400575t (2013).
49. Peng, B. et al. Exogenous Alanine and/or Glucose Plus Kanamycin Kills Antibiotic-Resistant Bacteria. *Cell Metab.* 21, 249-261, doi:10.1016/j.cmet.2015.01.008 (2015).
50. Meisel, J. W., Patel, M. B., Garrad, E., Stanton, R. A. & Gokel, G. W. Reversal of Tetracycline Resistance in *Escherichia Coli* by Noncytotoxic Bis(Tryptophan)S. *J Am Chem Soc.* 138, 10571-10577, doi:10.1021/jacs.6b05578 (2016).
51. Munoz, R. et al. Genetics of Resistance to Third-Generation Cephalosporins in Clinical Isolates of *Streptococcus Pneumoniae*. *Mol Microbiol.* 6, 2461-2465 (1992).
52. Hoskins, J. et al. Genome of the Bacterium *Streptococcus Pneumoniae* Strain R6. *J Bacteriol.* 183, 5709-5717, doi:10.1128/JB.183.19.5709-5717.2001 (2001).
53. McClure, R. et al. Computational Analysis of Bacterial RNA-Seq Data. *Nucleic Acids Res.* 41, e140, doi:10.1093/nar/gkt444 (2013).

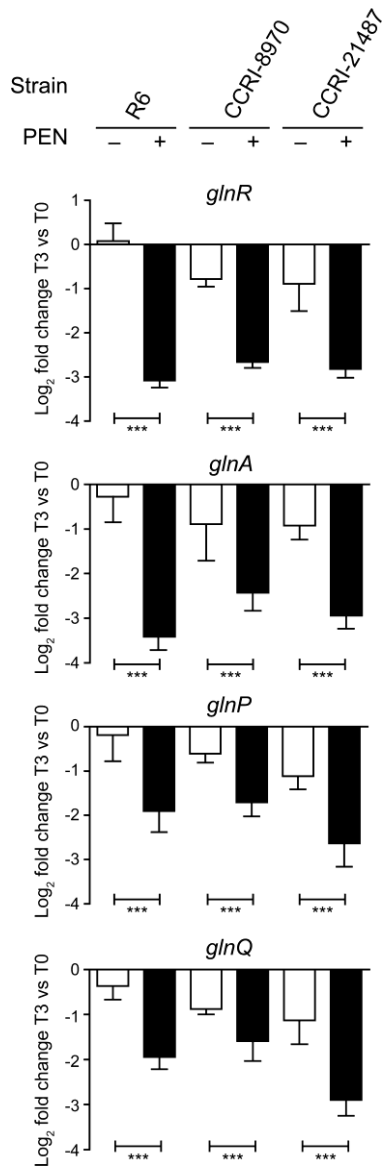


Figure 1. Validation of penicillin-induced alterations to glutamine metabolism gene expression in *S. pneumoniae* by qRT-PCR

Genes involved in glutamine metabolism (*glnR*, *glnA*, *glnP* and *glnQ*) found to be down-regulated after exposure to PEN by RNA-seq were validated by qRT-PCR. RNA levels were normalized based on the amplification signals of 16S ribosomal RNA. Graphs show the log₂ fold change of expression at time T3 (corresponding to 40 min for R6, 28 min for CCRI-21487 and 85 min for CCRI-8970) over T0 in untreated (white bars) and PEN-treated (black bars) *S. pneumoniae* isolates. Results are displayed as mean \pm SD of three biological replicates and significant differences are identified as determined by split plot design and Fisher's F-test (***) $p \leq 0.001$).

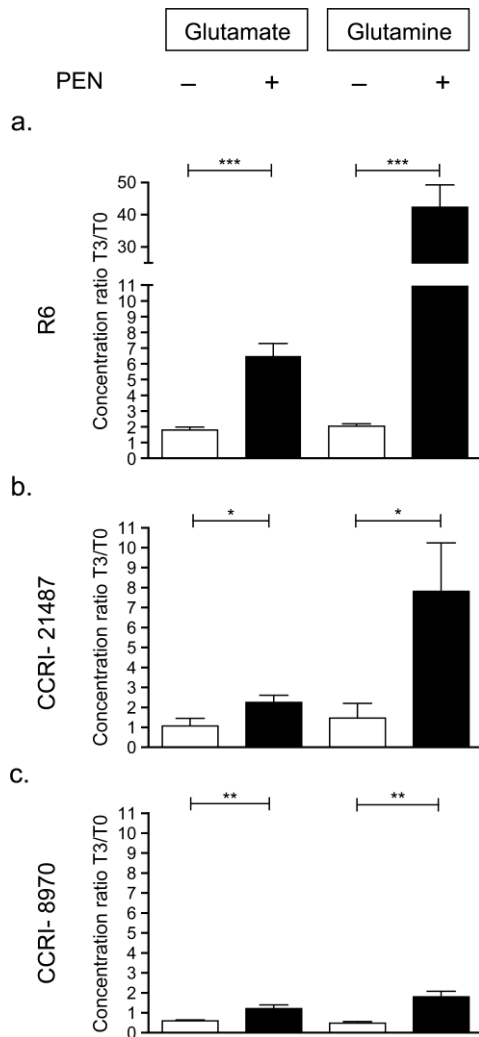


Figure 2. Quantification of intracellular levels of glutamine and glutamate by LC-MS
 Glutamine and glutamate relative concentrations at time point T3 (corresponding to 40 min for R6, 28 min for CCRI-21487 and 85 min for CCRI-8970) over T0 in untreated (white bars) and PEN-treated (black bars) *S. pneumoniae* R6 (a), CCRI-21487 (b) and CCRI-8970 (c). The data was normalized according to the bacterial counts. Results are displayed as mean \pm SD of three biological replicates and significant differences were determined by unpaired student t-test (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

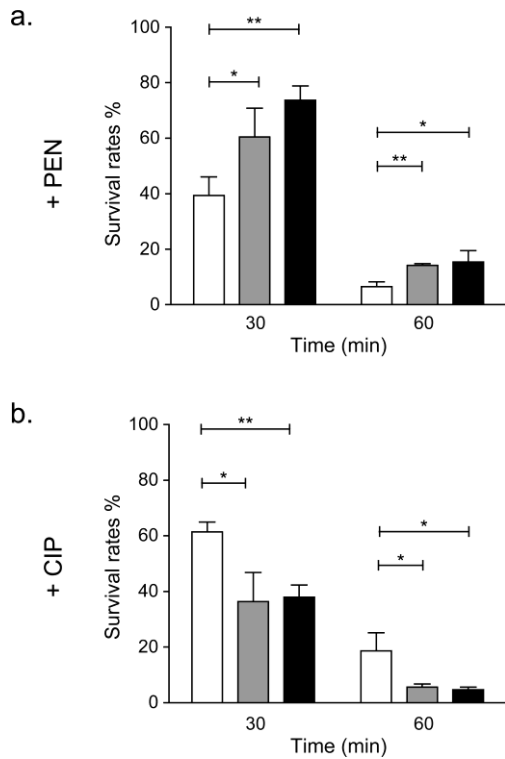


Figure 3. Protective role of glutamine against penicillin in *S. pneumoniae* R6

Survival rates at 30 min and 60 min of *S. pneumoniae* R6 in BHI media supplemented with penicillin (a) or ciprofloxacin (b) with the addition of 0 mM (white bars) 6mM (gray bars) or 12mM (black bars) glutamine. Untreated *S. pneumoniae* R6 was used as control. Results display the mean \pm SD of at least three biological repeats and significant differences were determined by unpaired Student's t test (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$).

Table 1. Genes modulated by PEN in *S. pneumoniae* R6 in the time-course transcriptomic design

Entry no. in R6 genome database	Gene Symbol	Gene description	Log ₂ FC (<i>q</i> -Value ≤ 0.05) ^{a, b}					
			No PEN ^c			PEN at 1 X MIC ^d		
			T1/T0	T2/T0	T3/T0	T1/T0	T2/T0	T3/T0
Downregulated								
spr0013	<i>comX1</i>	competence- specific global transcription modulator	-	-	-	-	-1.22	-
spr0020	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-1.68	-2.42
spr0024	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	-1.04
spr0041	<i>IS1167</i>	transposase	-	-	-	-	-1.17	-
spr0042	<i>IS1167</i>	transposase	-	-	-	-	-1.22	-
spr0117	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-1.22	-
spr0120	-	hypothetical protein	-	-	-	-1.32	-	-
spr0123	-	MutT/nudix family protein	-	-	-	-	-	-1.55
spr0127	<i>orf51</i>	hypothetical protein	-	-1.23	-1.23	-1.00	-1.74	-3.00
spr0128	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-1.58	-2.26
spr0210	<i>adk</i>	adenylate kinase	-	-	-	-	-	-1.35
spr0352a	-	DNA- binding protein	-2.00	-1.00	-1.00	-2.00	-2.00	-
spr0379	<i>fabK</i>	enoyl- acyl carrier protein(ACP) reductase	-	-	-	-	-	-1.14
spr0387	<i>accA</i>	acetyl- CoA carboxylase subunit alpha	-	-	-	-1.09	-	-
spr0388	-	hypothetical protein	-1.31	-	-	-1.33	-1.36	-1.91
spr0432	<i>cspR</i>	rRNA methylase	-	-	-	-	-1.14	-1.87
spr0443	<i>glnR</i>^e	transcriptional repressor of the glutamine synthetase gene	-	-	-	-	-1.79	-3.37
spr0444	<i>glnA</i>^e	glutamine synthetase, type I	-	-	-	-	-1.62	-3.02
spr0445	<i>hsdS</i>	type I restriction- modification system S subunit	-	-	-	-	-1.27	-2.05
spr0446	<i>hsdS</i>	type I restriction- modification system S subunit	-	-	-	-	-1.49	-2.37
spr0480	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	-1.00
spr0499a	-	hypothetical protein	-	-1.00	-1.00	-1.00	-	-
spr0504	<i>licT</i>	BglG family transcriptional antiterminator	-	-1.58	-2.43	-	-	-1.05
spr0560a	-	hypothetical protein	-	-	-	-1.17	-2.17	-
spr0629	<i>thiM</i>	hydroxyethylthiazole kinase	-	-	-	-	-	-1.00
spr0683	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	-1.25
spr0857	<i>celB</i>	competence protein CelB	-	-	-	-	-1.17	-
spr0936	<i>ABC-MSP</i>	iron- compound ABC transporter permease	-	-	-	-	-	-1.37
spr0940	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-1.05	-1.76
spr0941	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-1.32	-2.06
spr0942	<i>ccrB</i>	hypothetical protein	-	-	-	-	-	-1.26
spr0943	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-1.03	-1.53
spr0988	<i>IS1167</i>	transposase	-	-	-	-	-1.16	-1.36
spr1064	<i>nrhH</i>	glutaredoxin- like protein	-1.28	-	-	-	-1.18	-
spr1121	<i>glnQ</i>^e	amino acid ABC transporter ATP- binding protein	-	-	-	-	-1.14	-1.83
spr1144	<i>smf</i>	DNA processing protein DprA	-1.00	-	-	-1.42	-1.42	-
spr1155	<i>pyrB</i>	aspartate carbamoyltransferase	-	-	-	-	-	-1.30
spr1156	<i>pyrR</i>	bifunctional pyrimidine regulatory protein PyrR uracil phosphoribosyltransferase	-	-	-	-	-	-1.41
spr1208	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	-1.58
spr1210	-	hypothetical protein	-	-	-	-1.32	-1.32	-2.32
spr1316	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-1.17	-
spr1409	-	glutathione S- transferase YghU	-	-	-	-	-	-1.11
spr1440	-	ATP- dependent RNA helicase	-	-	-	-	-	-1.11
spr1724	<i>ssbB</i>	single- stranded DNA- binding protein	-	-	-	-	-1.32	-1.74
spr1806	-	cell wall surface anchor family protein	-	-	-	-	-1.04	-1.49
spr1817	<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP- binding protein	-	-	-	-	-1.03	-1.67
spr1818	-	hypothetical protein	-	-	-	-1.03	-1.37	-2.46
spr1819	<i>comX2</i>	competence- specific global transcription modulator	-	-	-	-	-1.22	-
spr1858	-	hypothetical protein	-	-	-1.28	-	-1.50	-

(Continued on the next page)

Table 1. (Continued)

Entry no. in R6 genome database	Gene Symbol	Gene description	Log ₂ FC (<i>q</i> -Value ≤ 0.05) ^{a, b}					
			No PEN ^c			PEN at 1X MIC ^d		
			T1/T0	T2/T0	T3/T0	T1/T0	T2/T0	T3/T0
Downregulated								
spr1859	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-1.00	-
spr1861	<i>cglD</i>	competence protein CglD	-	-	-	-1.16	-1.38	-2.16
spr1862	<i>cglC</i>	competence protein CglC	-	-1.14	-1.14	-1.46	-1.87	-2.14
spr1863	<i>cglB</i>	competence protein CglB	-	-	-1.00	-1.00	-1.49	-1.81
spr1864	<i>cglA</i>	competence protein CglA	-	-	-	-1.00	-1.26	-
spr1993	<i>hslO</i>	Hsp33- like chaperonin	-	-	-	-	-	-1.19
spr2023	<i>mreC</i>	rod shape- determining protein MreC	-	-	-	-	-	-1.19
spr2024	<i>ABC-MSP</i>	ABC transporter permease	-	-	-	-	-	-1.07
Upregulated								
spr0096	-	LysM domain-containing protein	-	-	-	-	1.46	1.84
spr0262	<i>adhP</i>	alcohol dehydrogenase	-	-	-	-	-	1.17
spr0287	<i>kdgA</i>	keto-hydroxyglutarate-aldolase/keto-deoxy-phosphogluconate aldolase	1.00	-	1.00	-	1.58	-
spr0289	-	hypothetical protein	1.00	-	-	1.00	1.58	-
spr0307	<i>clpL</i>	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	-	-	-	-	-	2.16
spr0311	-	hypothetical protein	-	-	-	1.32	-	2.04
spr0342	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	1.25
spr0343	<i>hk03</i>	sensor histidine kinase	-	-	-	-	-	1.29
spr0441	<i>pgk</i>	phosphoglycerate kinase	-	1.11	1.26	1.11	1.18	-
spr0453	<i>hrcA</i>	heat-inducible transcription repressor	1.31	-	-	1.36	1.87	-
spr0454	<i>grpE</i>	heat shock protein GrpE	-	-	-	1.23	1.64	1.36
spr0455	<i>dnaK</i>	molecular chaperone DnaK	1.34	-	1.08	1.80	2.24	2.07
spr0456	<i>dnaJ</i>	molecular chaperone DnaJ	1.40	1.00	1.03	1.57	1.91	1.73
spr0471	-	hypothetical protein	-	1.28	1.10	-	1.00	-
spr0562	<i>PTS-EII</i>	PTS system transporter subunit IIA	-	-	-	-	-	1.54
spr0563	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	1.22
spr0633	-	hypothetical protein	-	-	-	-	1.00	-
spr0635	-	hypothetical protein	-	-	-	-	2.00	-
spr0707	<i>ciaR</i>	DNA-binding response regulator CiaR	-	-	-	-	1.24	1.81
spr0708	<i>ciaH</i>	sensor histidine kinase CiaH	-	-	-	-	1.52	2.09
spr0782	-	hypothetical protein	-	-	-	1.67	2.66	3.63
spr0810	-	hypothetical protein	-	-	-	-	1.59	2.27
spr0884	<i>prsA</i>	foldase PrsA	-	-	-	-	1.30	1.63
spr0931	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	1.94
spr0959	-	hypothetical protein	-	-	-	-	2.00	3.00
spr0997	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	1.15
spr1028	<i>gapN</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.34	1.04	1.00	-	-	1.20
spr1074	<i>lacC</i>	tagatose-6-phosphate kinase	-	-	-	-	-	1.17
spr1075	<i>lacB</i>	galactose-6-phosphate isomerase subunit LacB	-	-	-	1.08	1.35	1.30
spr1097	<i>nirC</i>	formate/nitrate transporter	-	1.32	1.22	1.50	1.94	3.17
spr1293	<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein	-	-	-	-	-	2.81
spr1536	<i>nanaA</i>	neuraminidase A	-	-	-	-	-	3.00
spr1538	<i>axeI</i>	acetyl xylan esterase	-	-	-	-	1.70	2.65
spr1683	-	NAD-dependent epimerase/dehydratase	-	-	-	-	1.32	2.46
spr1700	<i>treR</i>	trehalose operon transcriptional repressor	-	-	-	1.28	-	-
spr1722	<i>groEL</i>	molecular chaperone GroEL	-	-	-	-	1.49	-
spr1800	-	hypothetical protein	1.00	-	-	1.00	-	-
spr1837	<i>adhE</i>	bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	2.56	2.43	2.57	2.28	3.05	3.45
spr1866	<i>adh</i>	zinc-containing alcohol dehydrogenase	-	-	1.03	1.06	-	-
spr1875	-	hypothetical protein	-	-	-	-	1.71	2.45
spr1895	<i>pstS</i>	phosphate ABC transporter substrate+B766-binding protein	-	-	-	1.24	-	-

(Continued on the next page)

Table 1. (Continued)

Entry no. in R6 genome database	Gene Symbol	Gene description	Log ₂ FC (<i>q</i> -Value ≤ 0.05) ^{a, b}					
			No PEN ^c			PEN at 1X MIC ^d		
			T1/T0	T2/T0	T3/T0	T1/T0	T2/T0	T3/T0
upregulated								
spr1896	<i>pstC</i>	phosphate ABC transporter permease	-	-	-	1.42	-	-
spr1898	<i>pstB</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	-	-	-	1.21	-	-
spr1899	<i>phoU</i>	phosphate transporter PhoU	-	-	-	1.58	-	-
spr1916	<i>malP</i>	maltodextrin phosphorylase	-	-	-	-	1.33	2.12
spr2011	-	ribosomal subunit interface protein	-	-	-	-	1.40	1.94
spr2045	<i>sphtra</i>	serine protease	-	-	-	-	1.49	1.97
spr2046	<i>spoJ</i>	chromosome segregation protein	-	-	-	-	1.64	2.09

^a PEN was added at 1 X MIC at T0 and the differential gene expression was tested for three time points (T1, T2 and T3). Genes included showed significant variations of log₂ FC ≤ -1 or log₂ FC ≥ +1 with a *q*-value ≤ 0.05

^b ‘-’ means no significant change in expression

^c ‘No PEN’ corresponds to the genes modulated in the untreated R6

^d ‘PEN’ corresponds to the genes modulated in the treated R6

^e Genes involved in glutamine metabolism are shown in bold

Table 2. Genes modulated by PEN in *S. pneumoniae* R6 in the dose-response transcriptomic design

Entry no. in R6 genome database ^a	Gene Symbol	Gene description	Log ₂ FC (<i>q</i> -Value ≤ 0.05) ^{b, c}				
			NO PEN ^d	0.5X MIC	1X MIC	5X MIC	10X MIC
Downregulated							
<u>spr0020</u>	-	hypothetical protein	-	-	-	-1.26	-2.58
<u>spr0078</u>	<i>rpsD</i>	30S ribosomal protein S4	-	-	-	-	-1.30
<u>spr0123</u>	-	MutT/nudix family protein	-	-	-	-	-1.33
<u>spr0127</u>	<i>orf51</i>	hypothetical protein	-1.00	-	-	-1.62	-
<u>spr0128</u>	-	hypothetical protein	-	-	-	-1.27	-
<u>spr0187</u>	<i>rpsJ</i>	30S ribosomal protein S10	-	-	-	-	-1.26
<u>spr0210</u>	<i>adk</i>	adenylate kinase	-	-	-	-1.03	-1.43
<u>spr0211</u>	<i>infA</i>	translation initiation factor IF-1	-	-	-	-	-1.71
<u>spr0216</u>	<i>rplQ</i>	50S ribosomal protein L17	-	-	-	-	-1.34
<u>spr0327</u>	<i>aliA</i>	oligopeptide ABC transporter substrate-binding protein	-	-	-	-	-1.30
<u>spr0381</u>	<i>fabG</i>	3-ketoacyl-ACP reductase	-	-1.19	-	-	-
<u>spr0382</u>	<i>fabF</i>	3-oxoacyl-ACP synthase	-	-1.01	-	-	-
<u>spr0383</u>	<i>accB</i>	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein subunit	-	-1.16	-	-	-
<u>spr0384</u>	<i>fabZ</i>	(3R)-hydroxymyristoyl-ACP dehydratase	-	-1.05	-1.26	-	-
<u>spr0386</u>	<i>accD</i>	acetyl-CoA carboxylase subunit beta	-	-1.05	-	-	-
<u>spr0388</u>	-	hypothetical protein	-	-1.27	-	-1.30	-1.45
<u>spr0398</u>	<i>rpmB</i>	50S ribosomal protein L28	-	-	-	-	-1.87
<u>spr0443</u>	<i>glnR</i> ^e	transcriptional repressor of the glutamine synthetase gene	-	-	-	-1.61	-2.38
<u>spr0444</u>	<i>glnA</i> ^e	glutamine synthetase, type I	-	-	-	-1.45	-2.06
<u>spr0682</u>	<i>rpsP</i>	30S ribosomal protein S16	-	-	-	-	-1.26
<u>spr0691</u>	<i>bioY</i>	biotin synthase	-	-	-	-	-1.00
<u>spr0714</u>	<i>gph</i>	phosphoglycolate phosphatase	-	-	-	-	-1.02
<u>spr0767</u>	<i>IS1167</i>	transposase	-	-	-	-	-1.13
<u>spr0861</u>	<i>infC</i>	translation initiation factor IF-3	-	-	-	-	-1.20
<u>spr0864</u>	<i>lgul</i>	lactoylglutathione lyase	-	-	-	-	-1.20
<u>spr1012</u>	<i>rplU</i>	50S ribosomal protein L21	-	-	-1.41	-	-
<u>spr1120</u>	<i>glnP</i> ^e	amino acid ABC transporter substrate-binding protein	-	-	-	-	-1.36
<u>spr1121</u>	<i>glnQ</i> ^e	amino acid ABC transporter ATP-binding protein	-	-	-	-1.05	-
<u>spr1144</u>	<i>smf</i>	DNA processing protein DprA	-	-	-	-1.58	-
<u>spr1208</u>	-	hypothetical protein	-	-	-1.00	-	-
<u>spr1210</u>	-	hypothetical protein	-	-	-	-1.58	-
<u>spr1409</u>	-	glutathione S-transferase YghU	-	-	-	-1.17	-1.44
<u>spr1410</u>	<i>pacL</i>	calcium transporter P-type ATPase	-	-	-	-1.08	-1.26
<u>spr1440</u>	-	ATP-dependent RNA helicase	-	-	-	-1.24	-1.52
<u>spr1604</u>	<i>aqpZ</i>	aquaporin	-	-	-	-1.11	-1.60
<u>spr1623</u>	-	hypothetical protein	-	-	-	-1.11	-
<u>spr1624</u>	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-1.26
<u>spr1626</u>	-	hypothetical protein	-	-	-	-1.31	-
<u>spr1859</u>	-	hypothetical protein	-1.00	-	-	-1.00	-
<u>spr1883</u>	-	hypothetical protein	-	-	-1.00	-	-
<u>spr1912</u>	-	hypothetical protein	-	-	-1.06	-	-
Upregulated							
<u>spr0079</u>	-	degenerative transposase	-	-	1.29	-	-
<u>spr0096</u>	-	LysM domain-containing protein	-	-	-	1.04	-
<u>spr0102</u>	<i>argG</i>	argininosuccinate synthase	-	1.00	-	-	-
<u>spr0104</u>	-	hypothetical protein	-	1.00	-	1.32	1.81
<u>spr0151</u>	-	hypothetical protein	-	-	-	1.05	-
<u>spr0225</u>	-	hypothetical protein	-	1.00	-	2.00	-
<u>spr0247</u>	<i>pulA</i>	alkaline amylopullulanase	-	-	-	-	1.84

(Continued on the next page)

Table 2. (Continued)

Entry no. in R6 genome database ^a	Gene Symbol	Gene description	Log ₂ FC (<i>q</i> -Value ≤ 0.05) ^{b,c}				
			NO PEN ^d	0.5X MIC	1X MIC	5X MIC	10X MIC
Upregulated							
spr0280	<i>celC</i>	PTS system cellobiose transporter subunit IIA	1.00	1.00	-	2.00	2.32
spr0282	<i>celD</i>	PTS system cellobiose transporter subunit IIC	-	1.00	-	-	-
spr0287	<i>kdgA</i>	keto-deoxy-phosphogluconate aldolase	-	1.00	1.32	-	-
spr0288	<i>kdgK</i>	2-keto-3-deoxygluconate kinase	1.00	1.00	-	-	1.58
spr0289	-	hypothetical protein	1.00	1.58	-	1.58	2.00
spr0290	<i>gno</i>	gluconate 5-dehydrogenase	1.00	1.00	-	-	-
spr0295	<i>PTS-EII</i>	PTS system transporter subunit IID	-	-	-	1.00	1.00
spr0311	-	hypothetical protein	-	-	-	1.38	-
spr0344	<i>rr03</i>	DNA-binding response regulator	-	-	-	-	1.36
spr0373	-	hypothetical protein	-	-	1.33	-	-
spr0453	<i>hrcA</i>	heat-inducible transcription repressor	-	1.32	-	1.72	1.83
spr0454	<i>grpE</i>	heat shock protein GrpE	-	1.03	1.11	1.70	1.79
spr0455	<i>dnaK</i>	molecular chaperone DnaK	-	1.30	1.23	1.88	2.18
spr0456	<i>dnaJ</i>	molecular chaperone DnaJ	-	1.23	1.74	-	1.85
spr0506	<i>bglH</i>	6-phospho-beta-glucosidase	-	-	-	-	1.24
spr0534	<i>glnH</i>	amino acid ABC transporter amino acid-binding protein	-	-	-	1.44	1.65
spr0562	<i>PTS-EII</i>	PTS system transporter subunit IIA	1.13	1.23	-	-	-
spr0563	-	hypothetical protein	-	1.03	-	-	-
spr0565	<i>bgaA</i>	beta-galactosidase	-	-	-	-	1.11
spr0613	<i>pyrF</i>	orotidine 5'-phosphate decarboxylase	1.09	1.14	-	1.27	-
spr0614	<i>pyrE</i>	orotate phosphoribosyltransferase	1.00	1.11	1.21	1.28	-
spr0615	-	hypothetical protein	1.25	1.17	-	-	-
spr0634	<i>tenA</i>	extracellular enzyme gene transcriptional regulator	-	1.00	-	-	-
spr0644	<i>Transposase</i> _C	transposase	1.00	1.00	-	-	-
spr0645	-	hypothetical protein	-	1.00	-	-	-
spr0664	-	acetoin utilization protein AcuB	-	-	1.12	1.12	-
spr0782	-	hypothetical protein	-	-	-	1.92	2.07
spr0791	<i>hsdS</i>	type I restriction-modification system S subunit	-	-	-	1.15	1.32
spr0793	<i>argR</i>	arginine repressor ArgR	-	1.14	-	1.38	-
spr0810	-	hypothetical protein	-	-	-	1.51	-
spr0811	-	hypothetical protein	-	-	-	1.22	1.42
spr0812	<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein	-	-	-	1.00	-
spr0840	-	hypothetical protein	-	1.00	-	-	-
spr0887	<i>gpmB</i>	phosphoglycerate mutase	-	-	1.21	-	-
spr0946	-	hydrolase	-	-	-	1.00	-
spr0959	-	hypothetical protein	-	-	-	1.58	2.00
spr0997	-	hypothetical protein	-	1.04	-	-	-
spr1028	<i>gapN</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.28	1.32	1.24	1.51	1.65
spr1069	<i>lacG</i>	6-phospho-beta-galactosidase	-	-	-	1.00	1.50
spr1073	<i>lacD</i>	tagatose 1,6-diphosphate aldolase	-	1.00	1.05	1.41	1.96
spr1075	<i>lacB</i>	galactose-6-phosphate isomerase subunit LacB	-	1.20	-	-	1.93
spr1079	-	hypothetical protein	-	-	-	-	1.58
spr1080	-	hypothetical protein	-	-	-	-	1.58
spr1081	-	hypothetical protein	-	-	-	1.00	1.22
spr1097	<i>nirC</i>	formate/nitrate transporter	1.42	1.66	2.17	2.12	2.58
spr1112	-	hypothetical protein	-	-	1.21	-	-
spr1291	-	hypothetical protein	-	1.00	-	-	-
spr1293	<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein	-	-	-	1.26	-

(Continued on the next page)

Table 2. (Continued)

Entry no. in R6 genome database ^a	Gene Symbol	Gene description	Log ₂ FC (<i>q</i> -Value ≤ 0.05) ^{b, c}				
			NO PEN ^d	0.5X MIC	1X MIC	5X MIC	10X MIC
Upregulated							
spr1382	<i>aliB</i>	peptide ABC transporter substrate-binding protein	1.06	1.06	1.13	1.67	1.86
spr1467	<i>rpsO</i>	30S ribosomal protein S15	-	-	1.11	-	-
spr1475	-	hypothetical protein	-	-	-	1.00	-
spr1527	<i>ABC-SBP</i>	sugar ABC transporter substrate-binding protein	-	-	-	-	1.32
spr1528	<i>PTS-EII</i>	PTS system transporter subunit IIBC	-	-	-	-	1.42
<u>spr1536</u>	<i>nanA</i>	neuraminidase A	-	1.58	-	2.00	2.58
spr1630	-	hypothetical protein	-	-	-	1.08	-
spr1646	-	hypothetical protein	1.58	1.00	-	1.58	-
spr1649	-	phosphate transporter PhoU	1.00	1.00	-	1.58	-
spr1667	<i>galT</i>	galactose-1-phosphate uridylyltransferase	-	-	1.32	1.00	1.50
spr1668	<i>galK</i>	galactokinase	-	-	-	1.12	1.42
spr1684	<i>fatD</i>	iron-compound ABC transporter permease	-	-	1.78	-	-
spr1685	<i>fatC</i>	iron-compound ABC transporter permease	-	1.00	-	-	-
spr1686	<i>fecE</i>	iron-compound ABC transporter ATP-binding protein	-	1.22	-	-	-
spr1687	<i>fatB</i>	iron-compound ABC transporter substrate-binding protein	-	1.12	-	-	-
<u>spr1700</u>	<i>treR</i>	trehalose operon transcriptional repressor	-	-	-	1.43	1.38
spr1715	<i>birA</i>	biotin-protein ligase	-	-	-	1.00	-
spr1721	-	transposase	-	1.00	-	-	-
<u>spr1722</u>	<i>groEL</i>	molecular chaperone GroEL	-	-	1.30	1.43	1.58
<u>spr1800</u>	-	hypothetical protein	1.00	-	-	1.22	1.22
spr1801	<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein	-	-	1.22	-	-
spr1810	-	hypothetical protein	-	-	-	1.22	-
spr1837	<i>adhE</i>	bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	2.20	2.27	2.15	3.07	3.09
<u>spr1866</u>	<i>adh</i>	zinc-containing alcohol dehydrogenase	-	-	-	1.23	1.45
<u>spr1895</u>	<i>pstS</i>	phosphate ABC transporter substrate+B766-binding protein	-	-	-	1.25	1.43
<u>spr1896</u>	<i>pstC</i>	phosphate ABC transporter permease	-	-	1.38	-	-
spr1915	-	hypothetical protein	-	-	-	1.05	-
spr1953	-	hypothetical protein	-	1.00	-	-	-
spr1962	-	hypothetical protein	-	-	-	1.35	1.80
spr1983	-	hypothetical protein	-	1.00	-	1.93	1.93
<u>spr2011</u>	-	ribosomal subunit interface protein	-	-	-	1.41	1.57
spr2016	<i>transposase_G</i>	hypothetical protein	-	1.00	-	-	-

^a Genes underlined are common between Table 1 and Table 2

^b Penicillin (PEN) was added at 0.5, 1, 5 and 10X MIC at T0 and the differential gene expression was tested between 15 min and T0. Genes included showed significant variations of log₂ FC ≤ -1 or log₂ FC ≥ +1 with a *q*-value ≤ 0.05

^c ‘-’ means no significant change in expression

^d ‘No PEN’ corresponds to the genes modulated in the untreated R6

^e Genes involved in glutamine metabolism are shown in bold

Table 3. Genes modulated in a common fashion by PEN in *S. pneumoniae* R6, CCRI-8970 and CCRI-21487

Entry no. in R6 genome database	Gene Symbol	Gene description	Condition	Log ₂ FC (<i>q</i> -Value ≤ 0.05) ^{a, b}								
				R6			CCRI-8970			CCRI-21487		
				T1/T0	T2/T0	T3/T0	T1/T0	T2/T0	T3/T0	T1/T0	T2/T0	T3/T0
Downregulated												
spr0443	<i>glnR</i> ^e	transcriptional repressor of the glutamine synthetase gene	NO PEN ^c	-	-	-	-	-2.53	-2.35	-	-	-
			PEN 1X MIC ^d	-	-1.79	-3.37	-2.08	-3.02	-2.93	-	-1.08	-2.32
spr0444	<i>glnA</i> ^e	glutamine synthetase, type I	NO PEN	-	-	-	-1.42	-	-	-	-	-1.26
			PEN 1X MIC	-	-1.62	-3.02	-1.75	-1.45	-1.65	-	-1.45	-2.82
spr1121	<i>glnQ</i> ^e	amino acid ABC transporter ATP-binding protein	NO PEN	-	-	-	-1.02	-1.55	-1.80	-	-	-
			PEN 1X MIC	-	-1.14	-1.83	-2.05	-2.63	-2.96	-	-1.10	-2.23
Upregulated												
spr0307	<i>clpL</i>	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	NO PEN	-	-	-	-	1.33	1.81	-	-	-
			PEN 1X MIC	-	-	2.16	1.30	2.03	2.22	-	-	1.13
spr0455	<i>dnaK</i>	molecular chaperone DnaK	NO PEN	1.34	-	1.08	-	1.50	1.49	-	-	-
			PEN 1X MIC	1.80	2.24	2.07	1.33	1.71	1.75	-	-	1.01
spr0456	<i>dnaJ</i>	molecular chaperone DnaJ	NO PEN	1.40	1.00	1.03	-	2.01	1.86	-	-	-
			PEN 1X MIC	1.57	1.91	1.73	1.80	1.97	2.10	-	-	1.15
spr1866	<i>adh</i>	zinc-containing alcohol dehydrogenase	NO PEN	-	-	1.03	-	-	-	-	1.11	-
			PEN 1X MIC	1.06	-	-	-	-	1.04	-	1.13	1.25
spr2011	-	ribosomal subunit interface protein	NO PEN	-	-	-	-	-	-	-	1.33	1.27
			PEN 1X MIC	-	1.40	1.94	-	-	1.06	1.31	1.55	2.15

^a Penicillin (PEN) at 1 X MIC was added at T0 and the differential gene expression was tested for three time points (T1, T2 and T3). Genes included showed significant variations of log₂ FC ≤ -1 or log₂ FC ≥ +1 with a *q*-value ≤ 0.05

^b ‘-’ means no significant change in expression

^c ‘No PEN’ corresponds to the genes modulated in the untreated *S. pneumoniae*

^d ‘PEN 1 X MIC’ corresponds to the genes modulated in the treated bacteria

^e Genes involved in glutamine metabolism are shown in bold

Table 4. Inhibition of GlnA by L-Methionine Sulfoximine sensitizes *S. pneumoniae* to PEN

Condition	MIC of PEN ($\mu\text{g/mL}$) ^{a, b}					
	R6	CCRI-8970	CCRI-21487	CCRI-1397	CCRI-1414	CCRI-1983
CAMHB ^c	0.03	0.015	0.03	1	2	8
CAMHB + MSO ^d	0.008	0.008	0.015	0.5	1	2
CAMHB + MSO + Gln ^e	0.03	0.015	0.03	1	2	4

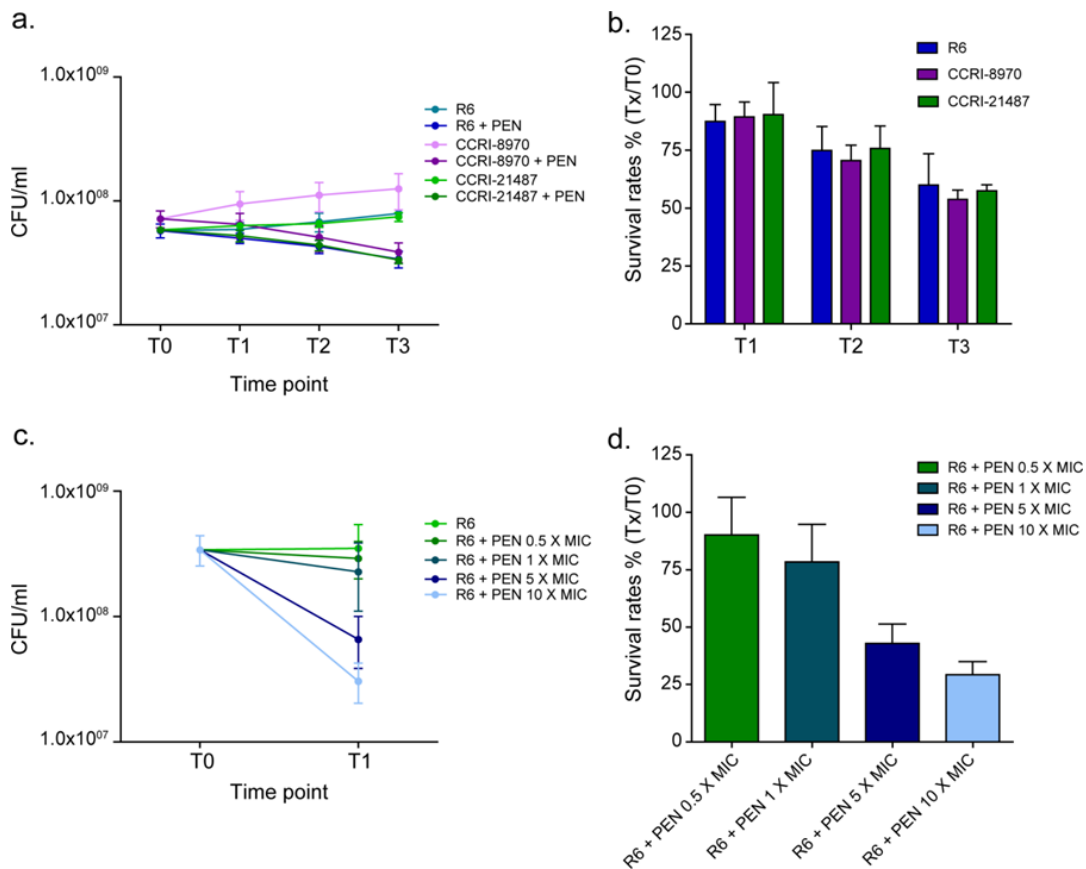
^a MIC of PEN: Minimum Inhibitory Concentration of penicillin

^b Average of three biological replicates

^c CAMHB: Cation Adjusted Muller Hinton Broth

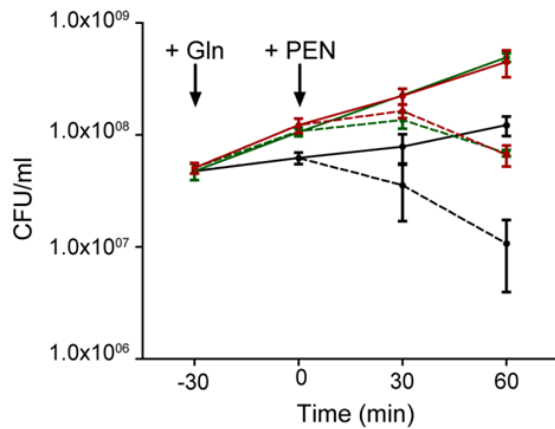
^d MSO: L-Methionine Sulfoximine added at 0.5 mM

^e Gln: glutamine added at 12 mM

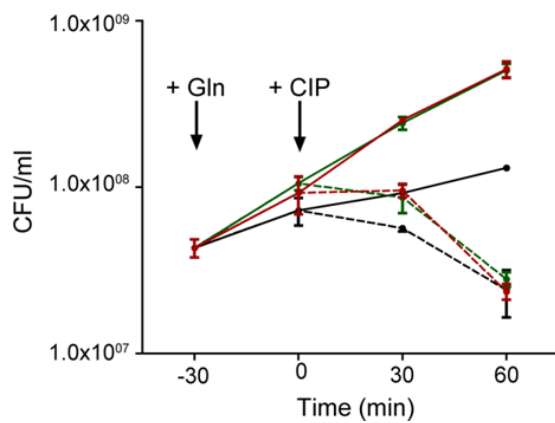


Supplementary Fig. S1: Growth curves of *S. pneumoniae* R6, CCRI-8970 and CCRI-21487 in BHI media alone or with the addition of penicillin (PEN) at 1X MIC for the time-course transcriptomic design (a). Survival rates at T1, T2 and T3 for the three strains (b). These time points correspond to 15, 30 and 40 min for R6, 8, 18 and 28 min for CCRI-21487 and 45, 65 and 85 min for CCRI-8970. Growth curves of *S. pneumoniae* R6 in BHI media alone or with the addition of PEN at 0.5X, 1X, 5X and 10X MIC (c) and the survival rates after 15 min (T1) for each concentration (d).

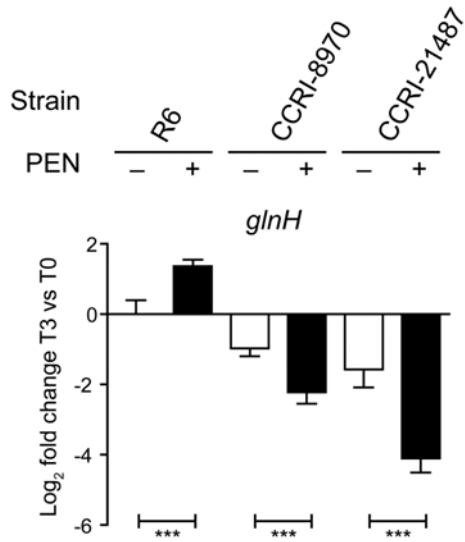
a.



b.



Supplementary Fig. S2: Growth curves of *S. pneumoniae* R6 in BHI media alone (black thin line) or supplemented with glutamine at 6 mM (green thin line) or 12 mM (red thin line) and of *S. pneumoniae* R6 in BHI media supplemented with PEN (at 1X MIC) (a) or CIP (at 2X MIC) (b) alone (black dashed line) or along with glutamine at 6mM (green dashed lines) or 12mM (red dashed lines). Glutamine was added half an hour (-30) before adding the antibiotic (0).



Supplementary Fig. S3: Penicillin-induced modulation of *S. pneumoniae glnH* expression by qRT-PCR.

Expression of *glnH* was validated by qRT-PCR. RNA levels were normalized based on the amplification signals of 16S ribosomal RNA. Graphs show the log₂ fold change of expression at time T3 (corresponding to 40 min for R6, 28 min for CCRI-21487 and 85 min for CCRI-8970) over T0 in untreated (white bars) and PEN-treated (black bars) *S. pneumoniae* isolates. Results are displayed as mean ± SD of three biological replicates and significant differences are identified as determined by split plot design and Fisher's F-test (***) p ≤ 0.001).

Supplementary Table S1. Genes modulated by PEN in *S. pneumoniae* CCRI-8970 in the time-course transcriptomic design

			Log ₂ FC (<i>q</i> -Value ≤ 0.05)					
CCRI-8970			No PEN			PEN at 1X MIC		
Entry no. in R6 genome database	Gene	Protein	45 min	65 min	85 min	45 min	65 min	85 min
Downregulated								
spr0014	<i>transposase_A</i>	transposase	-	-2.06	-1.89	-	-1.98	-2.06
spr0031	-	hypothetical protein	-	-	-	-2.00	-	-
spr0052a	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	-1.00
spr0087	-	hypothetical protein	-	-	-1.54	-	-1.71	-1.77
spr0127	<i>orf51</i>	hypothetical protein	-	-	-	-	-	-1.00
spr0128	-	hypothetical protein	-	-	-	-1.42	-	-
spr0192	<i>rpsS</i>	30S ribosomal protein S19	-	-	-1.69	-	-1.97	-2.11
spr0442	-	hypothetical protein	1.23	-2.10	-1.60	-	-1.28	-
spr0443	<i>glnR</i>	transcriptional repressor of the glutamine synthetase gene	-	-2.53	-2.35	-2.08	-3.02	-2.93
spr0444	<i>glnA</i>	glutamine synthetase, type I	-1.42	-	-	-1.75	-1.45	-1.65
spr0480	-	hypothetical protein	-	-2.27	-1.98	-1.16	-1.87	-1.90
spr0489	-	hypothetical protein	-	-	-	-1.07	-	-
spr0532	<i>glnP</i>	amino acid ABC transporter permease	-	-	-1.20	-1.92	-1.82	-1.82
spr0533	<i>glnP</i>	amino acid ABC transporter permease	-	-1.42	-1.75	-2.00	-2.30	-2.46
spr0534	<i>glnH</i>	amino acid ABC transporter amino acid-binding protein	-1.98	-	-1.44	-2.40	-2.48	-2.76
spr0602	<i>ABC-NBD</i>	sodium ABC transporter ATP-binding protein	-2.00	-2.00	-2.00	-	-2.00	-2.00
spr0709	-	hypothetical protein	-1.11	-2.46	-2.14	-1.58	-2.40	-2.38
spr0840	-	hypothetical protein	-	-	-3.32	-1.32	-3.32	-2.32
spr0863	<i>rplT</i>	50S ribosomal protein L20	-	-	-1.36	-	-1.75	-1.67
spr0866	<i>pyrD</i>	dihydroorotate dehydrogenase 1B	-	-	-	-	-	-1.28
spr0941	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	-1.78
spr0942	<i>ccrB</i>	hypothetical protein	-	-1.49	-	-1.15	-	-
spr1003	-	hypothetical protein	-	-1.48	-	-	-	-
spr1051	<i>acoA</i>	TPP-dependent acetoin dehydrogenase subunit alpha	-2.15	-	-	-1.05	-	-
spr1075	<i>lacB</i>	galactose-6-phosphate isomerase subunit LacB	5.60	-1.75	-1.58	-	-1.33	-
spr1120	<i>glnP</i>	amino acid ABC transporter substrate-binding protein	-	-	-	-1.30	-1.69	-2.04
spr1121	<i>glnQ</i>	amino acid ABC transporter ATP-binding protein	-1.02	-1.55	-1.80	-2.05	-2.63	-2.96
spr1183	-	ABC transporter ATP-binding protein	-	-	-	-1.07	-	-
spr1241	-	hypothetical protein	-	-1.56	-1.28	-	-1.19	-
spr1346	-	hypothetical protein	-	-	-	-1.00	-	-
spr1392	-	hypothetical protein	3.86	-	-	-	-1.49	-
spr1503	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	-1.40
spr1582	-	DNA-directed RNA polymerase subunit omega	-	-1.83	-1.44	-	-1.62	-1.83
spr1593	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	-1.35

(Continued on the next page)

Supplementary Table S1. (Continued)

			Log ₂ FC (<i>q</i> -Value ≤ 0.05)					
CCRI-8970			No PEN			PEN at 1X MIC		
Entry no. in R6 genome database	Gene	Protein	45 min	65 min	85 min	45 min	65 min	85 min
			Downregulated					
spr1603a	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	-1.58
spr1691	<i>scpA</i>	segregation and condensation protein A	-	-1.87	-1.58	-1.16	-1.50	-1.53
spr1806	-	cell wall surface anchor family protein	-	-1.37	-	-1.25	-	-
spr1828	<i>transposase_A</i>	transposase	-	-2.27	-2.01	-	-2.09	-2.18
spr1874	<i>marR</i>	MarR family transcriptional regulator	-	-	-	-1.10	-	-
spr1933	<i>rgg</i>	positive transcriptional regulator of glucosyltransferase and Spp phenotype	-	-	-	-1.17	-	-
spr1963	<i>adh2</i>	iron-containing alcohol dehydrogenase	-	-1.58	-1.58	-1.58	-	-
spr1964	<i>fucI</i>	L-fucose isomerase	-	-	-	-1.58	-	-
spr1973	<i>fcsK</i>	fucose kinase	-	-	-1.00	-1.00	-	-1.00
Upregulated								
spr0060	<i>PTS-EIIB</i>	PTS system transporter subunit IIB	-	-	-	-	1.81	1.58
spr0136	<i>glycosyltransferase</i>	glycosyl transferase	-	-	-	-	-	1.58
spr0152	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	1.22
spr0173	<i>spxA</i>	transcriptional regulator Spx	-	-	-	-	-	1.02
spr0307	<i>clpL</i>	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	-	1.33	1.81	1.30	2.03	2.22
spr0390	<i>nusB</i>	transcription antitermination protein NusB	-	-	-	-	-	1.12
spr0399	<i>asp23</i>	hypothetical protein	-	-	1.27	-	1.58	1.64
spr0455	<i>dnaK</i>	molecular chaperone DnaK	-	1.50	1.49	1.33	1.71	1.75
spr0456	<i>dnaJ</i>	molecular chaperone DnaJ	-	2.01	1.86	1.80	1.97	2.10
spr0458	-	hypothetical protein	-	-	-	-	1.55	1.58
spr0459	<i>ABC-NBD</i>	ABC transporter ATP-binding protein	-	1.57	1.53	1.35	1.67	1.62
spr0656	<i>clpP</i>	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	-	-	-	-	1.26	1.49
spr0661	<i>livM</i>	branched chain amino acid ABC transporter permease	-	-	-	-	1.18	1.24
spr0664	-	acetoin utilization protein AcuB	-	-	-	-	-	1.28
spr0697	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	1.38
spr0698	-	hypothetical protein	-	-	-	-	1.30	1.58
spr0707	<i>ciaR</i>	DNA-binding response regulator CiaR	-	-	-	-	-	1.30
spr0708	<i>ciaH</i>	sensor histidine kinase CiaH	-	-	-	-	-	1.29
spr0726	-	hypothetical protein	-	1.83	1.46	-	1.36	-
spr0740	<i>rpsT</i>	30S ribosomal protein S20	-1.41	2.76	1.29	1.72	-	-
spr0777	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	1.03
spr1063	<i>ptsH</i>	phosphocarrier protein HPr	-	-	-	-	-	1.22

(Continued on the next page)

Supplementary Table S1. (Continued)

			Log ₂ FC (<i>q</i> -Value ≤ 0.05)					
CCRI-8970			No PEN			PEN at 1X MIC		
Entry no. in R6 genome database	Gene	Protein	45 min	65 min	85 min	45 min	65 min	85 min
Upregulated								
spr1064	<i>nrdH</i>	glutaredoxin-like protein	-	-	-	2.29	1.69	1.35
spr1092	<i>truB</i>	tRNA pseudouridine synthase B	-	-	-	-	1.32	-
spr1100	<i>ldh</i>	L-lactate dehydrogenase	-	-	-	1.01	-	1.18
spr1139	<i>cutC</i>	copper homeostasis protein CutC	-	-	-	-	-	1.06
spr1144	<i>smf</i>	DNA processing protein DprA	-	-	-	-	1.18	1.24
spr1172	<i>crcB</i>	camphor resistance protein CrcB	-	-	-	-	-	1.32
spr1221	-	hypothetical protein	-	-	-	-	1.00	1.17
spr1344	<i>glpF</i>	glycerol uptake facilitator protein	-	1.84	1.20	1.25	1.21	1.14
spr1376	<i>patB</i>	aminotransferase, class II	-	-	-	-	-	2.00
spr1382	<i>aliB</i>	peptide ABC transporter substrate-binding protein	-	-	-	-	-	1.03
spr1385	-	hypothetical protein	-1.77	1.74	2.33	1.52	2.21	1.70
spr1430	<i>dpr</i>	non-heme iron-containing ferritin	-	-	-	-	1.32	-
spr1435	<i>apt</i>	adenine phosphoribosyltransferase	-	1.65	1.30	-	1.33	1.27
spr1449	-	hypothetical protein	-	-	-	-	2.17	2.46
spr1551	-	hypothetical protein	-	-	-	-	1.38	-
spr1601	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	1.04
spr1606	<i>pepF</i>	oligoendopeptidase F	-	-	-	1.07	-	-
spr1608	<i>prmA</i>	ribosomal protein L11 methyltransferase	-	-	1.03	-	-	1.06
spr1613	-	hypothetical protein	-	2.35	1.72	-	1.26	-
spr1629	-	transcriptional regulator	-	-	-	-	-	1.23
spr1670	<i>adhB</i>	zinc-containing alcohol dehydrogenase	-	-	-	-	1.40	1.51
spr1681	-	hypothetical protein	-	-	-	-	1.46	1.32
spr1688	-	hypothetical protein	-	-	-	1.56	1.37	-
spr1720	-	hypothetical protein	-	-	-	-	2.00	2.00
spr1723	<i>groES</i>	co-chaperonin GroES	-	-	1.27	1.03	1.78	2.13
spr1820	<i>nusG</i>	transcription antitermination protein NusG	-	-	1.00	-	1.02	-
spr1825	<i>gapA</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-	-	-	1.13	-	-
spr1840	<i>yajC</i>	preprotein translocase subunit YajC	-	-	-	-	-	1.09
spr1866	<i>adh</i>	zinc-containing alcohol dehydrogenase	-	-	-	-	-	1.04
spr1920	<i>malD</i>	maltodextrin ABC transporter permease	-	-	-	1.58	-	-
spr1930	-	hypothetical protein	-	-	-	-	1.81	2.00
spr1945	<i>pcpA</i>	choline binding protein PcpA	-	-	-	-	-	1.22
spr1981	<i>dltB</i>	activated D-alanine transport protein	-	-	-	-	1.09	1.45
spr1982	<i>dltA</i>	D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit I	-	-	-	-	1.00	1.34
spr1996	-	hypothetical protein	-	-	-	-	1.13	1.41
spr2011	-	ribosomal subunit interface protein	-	-	-	-	-	1.06
spr2045	<i>sphtra</i>	serine protease	-	-	-	-	-	1.43

Supplementary Table S2. Genes modulated by PEN in *S. pneumoniae* CCRI-21487 in the time-course transcriptomic design

			Log ₂ FC (<i>q</i> -Value ≤ 0.05)					
CCRI-21487			No PEN			PEN at 1X MIC		
Entry no. in R6 genome database	Gene	Protein	8 min	18 min	28 min	8 min	18 min	28 min
Downregulated								
spr0030	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	-2.00
spr0041	<i>IS1167</i>	transposase	-	-	-	-1.27	-	-
spr0079	<i>transposase_A</i>	degenerative transposase	-	-	-1.06	-1.10	-	-
spr0225	-	hypothetical protein	-	-1.00	-	-1.42	-	-1.00
spr0382	<i>fabF</i>	3-oxoacyl-ACP synthase	-	-	-	-1.28	-	-
spr0383	<i>accB</i>	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxyl carrier protein subunit	-1.07	-	-	-1.89	-1.26	-1.04
spr0384	<i>fabZ</i>	(3R)-hydroxymyristoyl-ACP dehydratase	-	-	-	-1.37	-	-
spr0385	<i>accC</i>	acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase subunit	-	-	-	-1.05	-	-
spr0386	<i>accD</i>	acetyl-CoA carboxylase subunit beta	-	-	-	-1.62	-	-
spr0387	<i>accA</i>	acetyl-CoA carboxylase subunit alpha	-	-	-	-1.34	-	-
spr0388	-	hypothetical protein	-	-	-	-1.22	-	-
spr0443	<i>glnR</i>	transcriptional repressor of the glutamine synthetase gene	-	-	-	-	-1.08	-2.32
spr0444	<i>glnA</i>	glutamine synthetase, type I	-	-	-1.27	-	-1.45	-2.82
spr0532	<i>glnP</i>	amino acid ABC transporter permease	-	-1.21	-1.45	-1.10	-	-2.10
spr0533	<i>glnP</i>	amino acid ABC transporter permease	-	-	-	-	-	-1.28
spr0534	<i>glnH</i>	amino acid ABC transporter amino acid-binding protein	-	-	-1.39	-	-	-3.09
spr0594	-	hypothetical protein	-	-	-1.20	-	-1.18	-
spr0644	<i>transposase_C</i>	transposase	-	-	-1.00	-1.42	-	-
spr0645	-	hypothetical protein	-	-2.22	-2.22	-2.81	-	-
spr0647	<i>pmi</i>	mannose-6-phosphate isomerase	-	-	-	-1.32	-	-
spr0650	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	-1.16
spr0683	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	-1.22
spr0722	<i>transposase_A</i>	transposase	-	-	-	-1.23	-	-
spr0740	<i>rpsT</i>	30S ribosomal protein S20	-	-	-	-1.02	-	-
spr0770	-	hypothetical protein	-	-1.84	-1.97	-1.73	-	-
spr0841	<i>IS1381</i>	transposase	-	-	-	-	-	-1.58
spr0940	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	-1.00
spr1009	<i>IS1167</i>	transposase	-	-1.81	-2.81	-1.22	-	-
spr1020	<i>hlpA</i>	DNA-binding protein HU	-	-	-1.20	-1.03	-	-
spr1038	<i>transposase_A</i>	transposase	-	-1.17	-1.58	-1.49	-	-

(Continued on the next page)

Supplementary Table S2. (Continued)

			Log ₂ FC (<i>q</i> -Value ≤ 0.05)					
CCRI-21487			No PEN			PEN at 1X MIC		
Entry no. in R6 genome database	Gene	Protein	8 min	18 min	28 min	8 min	18 min	28 min
Downregulated								
spr1064	<i>nrdH</i>	glutaredoxin-like protein	-	-	-1.13	-	-	-
spr1079	-	hypothetical protein	-	-	-	-1.00	-	-
spr1120	<i>glnP</i>	amino acid ABC transporter substrate-binding protein	-	-	-	-	-	-1.45
spr1121	<i>glnQ</i>	amino acid ABC transporter ATP-binding protein	-	-	-	-	-1.10	-2.23
spr1467	<i>rpsO</i>	30S ribosomal protein S15	-	-1.04	-1.00	-	-1.02	-
spr1476	-	hypothetical protein	-	-	-	-	-	-1.58
spr1538	<i>axeI</i>	acetyl xylan esterase	-1.00	-1.57	-1.54	-	-1.09	-
spr1545	-	hypothetical protein	-1.00	-1.00	-	-1.00	-	-
spr1621	<i>scrR</i>	sucrose operon repressor	-	-1.00	-	-	-	-1.00
spr1837	<i>adhE</i>	bifunctional acetaldehyde-CoA/alcohol dehydrogenase	-	-	-	-1.31	-	-
spr1866	<i>adh</i>	zinc-containing alcohol dehydrogenase	-	1.11	-	-	1.13	1.25
spr1891	<i>IS1381</i>	transposase	-	-1.32	-1.32	-1.32	-	-1.32
spr1925	-	hypothetical protein	-	-1.18	-1.56	-1.32	-	-
spr2022	<i>mreD</i>	rod shpae-determining protein MreD	-	-	-	-	-	-1.02
Upregulated								
spr0096	-	LysM domain-containing protein	-	-	-	-	-	1.28
spr0230	<i>PTS-EIIB</i>	PTS system transporter subunit IIB	-	-	-	1.17	-	-
spr0247	<i>pulA</i>	alkaline amylopullulanase	-	1.22	1.22	-	1.32	1.50
spr0260	<i>manM</i>	PTS system mannose-specific transporter subunit IIC	1.50	1.42	1.71	1.15	1.35	-
spr0307	<i>clpL</i>	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	-	-	-	-	-	1.13
spr0415	<i>pfl</i>	formate acetyltransferase	-	-	-	-	-	1.03
spr0453	<i>hrcA</i>	heat-inducible transcription repressor	-	-	-	-	-	1.21
spr0455	<i>dnaK</i>	molecular chaperone DnaK	-	-	-	-	-	1.01
spr0456	<i>dnaJ</i>	molecular chaperone DnaJ	-	-	-	-	-	1.15
spr0562	<i>PTS-EII</i>	PTS system transporter subunit IIA	-	1.32	1.81	-	-	1.58
spr0564	<i>PTS-EII</i>	PTS system transporter subunit IIC	1.00	-	1.74	1.00	1.22	1.74
spr0565	<i>bgaA</i>	beta-galactosidase	1.08	1.08	1.15	-	1.15	-
spr0656	<i>clpP</i>	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	-	-	-	-	-	1.16
spr0778	<i>fruR</i>	lactose PTS system repressor	1.72	1.84	1.80	1.63	1.86	1.70
spr0779	<i>fruB</i>	1-phosphofructokinase	1.76	1.90	1.75	1.67	1.96	1.56
spr0780	<i>fruA</i>	PTS system fructose specific transporter subunit IIABC	1.40	1.16	1.00	1.07	1.25	-
spr1046	<i>xerS</i>	site-specific tyrosine recombinase XerS	-	-	1.46	-	-	1.81

(Continued on the next page)

Supplementary Table S2. (Continued)

			Log ₂ FC (<i>q</i> -Value ≤ 0.05)					
CCRI-21487			No PEN			PEN at 1X MIC		
Entry no. in R6 genome database	Gene	Protein	8 min	18 min	28 min	8 min	18 min	28 min
Upregulated								
spr1073	<i>lacD</i>	tagatose 1,6-diphosphate aldolase	1.49	1.32	-	1.67	1.49	1.52
spr1074	<i>lacC</i>	tagatose-6-phosphate kinase	1.24	-	-	1.13	-	-
spr1075	<i>lacB</i>	galactose-6-phosphate isomerase subunit LacB	1.49	-	-	2.07	1.85	1.93
spr1076	<i>lacA</i>	galactose-6-phosphate isomerase subunit LacA	1.13	-	-	1.54	-	-
spr1272	<i>nagB</i>	glucosamine-6-phosphate isomerase	-	-	-	-	-	1.44
spr1420	-	hypothetical protein	-	-	-	1.19	-	-
spr1455	<i>phnA</i>	hypothetical protein	-	-	1.24	-	-	1.14
spr1523	-	hypothetical protein	1.27	1.58	1.88	-	1.53	1.66
spr1530	-	hypothetical protein	2.16	2.50	2.66	1.74	2.32	2.22
spr1531	<i>nanB</i>	neuraminidase B	2.17	3.09	3.00	2.17	2.91	2.58
spr1532	<i>ABC-MSP</i>	ABC transporter permease	2.00	2.58	2.32	1.58	2.32	2.00
spr1623	-	hypothetical protein	1.27	-	-	1.04	-	-
spr1629	-	transcriptional regulator	-	-	-	-	-	1.29
spr1685	<i>fatC</i>	iron-compound ABC transporter permease	1.07	-	-	-	1.02	-
spr1686	<i>fecE</i>	iron-compound ABC transporter ATP-binding protein	1.17	-	-	1.07	-	-
spr1687	<i>fatB</i>	iron-compound ABC transporter substrate-binding protein	1.27	1.07	-	1.02	1.06	-
spr1723	<i>groES</i>	co-chaperonin GroES	-	-	-	-	-	1.48
spr1812a	-	hypothetical protein	-	-	-	1.46	-	-
spr1866	<i>adh</i>	zinc-containing alcohol dehydrogenase	-	1.11	-	-	1.13	1.25
spr1895	<i>pstS</i>	phosphate ABC transporter substrate+B766-binding protein	-	1.81	-	-	1.81	1.86
spr1897	<i>pstA</i>	phosphate ABC transporter permease	-	-	-	-	1.58	-
spr1898	<i>pstB</i>	phosphate transporter ATP-binding protein	-	1.76	-	-	1.82	1.66
spr1899	<i>phoU</i>	phosphate transporter PhoU	-	1.78	-	-	1.78	-
spr1988	<i>glpF</i>	glycerol uptake facilitator protein	-	-	-	1.58	-	-
spr1991	<i>glpK</i>	glycerol kinase	-	-	-	1.14	-	-
spr2003	-	ABC transporter substrate-binding protein	-	1.38	1.40	-	1.30	1.16
spr2011	-	ribosomal subunit interface protein	-	1.33	1.27	1.31	1.55	2.15

Supplementary Table S3. Genes modulated in a common fashion by PEN in *S. pneumoniae* CCRI-8970 and CCRI-21487

Entry no. in R6 genome database	Gene Symbol	Gene description	Condition	Log ₂ FC (<i>q</i> -Value ≤ 0.05)					
				CCRI-8970			CCRI-21487		
				T1/T0	T2/T0	T3/T0	T1/T0	T2/T0	T3/T0
Down-regulated									
spr0443	<i>glnR</i>	transcriptional repressor of the glutamine synthetase gene	NO PEN	-	-2.53	-2.35	-	-	-
			PEN 1X MIC	-2.08	-3.02	-2.93	-	-1.08	-2.32
spr0444	<i>glnA</i>	glutamine synthetase, type I	NO PEN	-1.42	-	-	-	-	-1.27
			PEN 1X MIC	-1.75	-1.45	-1.65	-	-1.45	-2.82
spr0532	<i>glnP</i>	amino acid ABC transporter permease	NO PEN	-	-	-1.20	-	-1.21	-1.45
			PEN 1X MIC	-1.92	-1.82	-1.82	-1.10	-	-2.10
spr0533	<i>glnP</i>	amino acid ABC transporter permease	NO PEN	-	-1.46	-1.75	-	-	-
			PEN 1X MIC	-2.00	-2.30	-2.42	-	-	-1.28
spr0534	<i>glnH</i>	amino acid ABC transporter amino acid-binding protein	NO PEN	-1.98	-	-1.44	-	-	-1.39
			PEN 1X MIC	-2.40	-2.48	-2.76	-	-	-3.09
spr1120	<i>glnP</i>	amino acid ABC transporter substrate-binding protein	NO PEN	-	-	-	-	-	-
			PEN 1X MIC	-1.30	-1.69	-2.04	-	-	-1.45
spr1121	<i>glnQ</i>	amino acid ABC transporter ATP-binding protein	NO PEN	-1.02	-1.55	-1.80	-	-	-
			PEN 1X MIC	-2.05	-2.63	-2.96	-	-1.10	-2.23
up-regulated									
spr0307	<i>clpL</i>	ATP-dependent protease ATP-binding subunit	NO PEN	-	1.33	1.81	-	-	-
			PEN 1X MIC	1.30	2.03	2.22	-	-	1.13
spr0455	<i>dnaK</i>	molecular chaperone DnaK	NO PEN	-	1.50	1.50	-	-	-
			PEN 1X MIC	1.33	1.71	1.75	-	-	1.01
spr0456	<i>dnaJ</i>	molecular chaperone DnaJ	NO PEN	-	2.01	1.86	-	-	-
			PEN 1X MIC	1.80	1.97	2.10	-	-	1.15
spr0656	<i>clpP</i>	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit	NO PEN	-	-	-	-	-	-
			PEN 1X MIC	-	1.21	1.49	-	-	1.16
spr1629	-	transcriptional regulator	NO PEN	-	-	-	-	-	-
			PEN 1X MIC	-	-	1.23	-	-	1.29
spr1723	<i>groES</i>	co-chaperonin GroES	NO PEN	-	-	1.27	-	-	-
			PEN 1X MIC	1.03	1.78	2.13	-	-	1.48
spr1866	<i>adh</i>	zinc-containing alcohol dehydrogenase	NO PEN	-	-	-	-	1.17	-
			PEN 1X MIC	-	-	1.04	-	1.13	1.25
spr2011	-	ribosomal subunit interface protein	NO PEN	-	-	-	-	1.33	1.27
			PEN 1X MIC	-	-	1.06	1.31	1.55	2.15

Supplementary Table S4. List of primers used in this study

Primers	Sequence (5'-->3')
For qRT-PCR	
Frd spr0443 <i>glnR</i>	CATGGATCGTCTGCTTGAAA
Rv spr0443 <i>glnR</i>	CTTGGATTTTCGCTTCACGTT
Frd spr0444 <i>glnA</i>	TCTTGAGTTGCGTTCAGTGG
Rv spr0444 <i>glnA</i>	TTCGATAGGAGCTGGTGCTT
Frd spr1120 <i>glnP</i>	CTGGGGAATTCCAAACTTCA
Rv spr1120 <i>glnP</i>	ATTGAGTGAGAGGGCAATGG
Frd spr1121 <i>glnQ</i>	CTCGTGGCCTAGCAATGAAT
Rv spr1121 <i>glnQ</i>	ACGTCTCCAACCATCTCAGG
Frd spr0534 <i>glnH</i>	CTATCACCCAACGCCTGATT
Rv spr0534 <i>glnH</i>	CTGGGTAGGAACCAAGTTCG

LC-MS analysis

Chemicals

All chemicals and standards were HPLC grade. Acetonitrile (A955-4L); formic acid (A117-50) were purchased from Fisher Scientific, and hydrochloric acid (HCl, 258148); L-glutamine (G3126); glutamate (G1251) from Sigma Aldrich. Deuterated DL-glutamate (2,3,3,4,4-D₅, 97%, cat no. DLM-357-0) and deuterated L-Glutamine (2,3,3,4,4-D₅, 97%, cat no. DLM-1826-0.1) were obtained from Cambridge Isotope Laboratories, Inc. Ultrapure water was produced by a Millipore SuperQ system for mobile phase and reagent dilution.

Internal standard preparation

Deuterated standards stock solutions were prepared in 1N HCl at 1 mg/mL. A mix of two deuterated stock solutions for dGlu and dGln was diluted at 100 µg/mL for calibration curves. A second mixture with dGlu at 20 µg/mL and dGln at 12 µg/mL prepared in water was also prepared for spiking in the extraction solution.

Working mixture and calibration curves

A mix of two deuterated internal standards (IS) DL-glutamate (dGlu) and L-Glutamine (dGln) was spiked during cells lysis to a final concentration of 500 ng/mL and 300 ng/mL respectively. Lyophilised extracts with IS were resuspended in 150 µL of 50:50 (mobile phase A: mobile phase B) and sonicated 5 min at 15°C. Samples were then filtrated with a 13 mm 0.22 µM PVDF syringe filter (Fisherbrand, no 09-720-3) before injection in UPLC Acquity system. For calibration curves, 15 extraction tubes of T0 wild type *S. pneumoniae* were pooled and used as matrix dilution. The linear regression was eight-points serial dilutions of a mixture of dGlu and dGln (0; 23.4; 46.8; 93.7; 187.5; 375; 750; 1500 ng/mL) in the matrix. Linearity was determined by the squared correlation coefficient (R^2). Quantification was expressed as the peak-area ratio of deuterated molecule (dGlu or dGln) on its respective endogenous signal (Glu or Gln). As for analytes, quantification was expressed as peak-area ratio of endogenous signal against deuterated IS. TargetLynx software from Waters Corp. was used to assess peak integration. The method monitors the fragment peak area of the molecule of interest to a specified retention time. Data were then

exported to Microsoft Excel to allow linearity, standard deviation and quantification measurements.

Method validation

Quality control (QC) was injected three times for curve validation. Concentration of a dGlu/dGln QC mix was tested at low (80 ng/mL), medium (160 ng/mL) and high (320 ng/mL) concentrations. Validation curves were accepted when the QC concentration did not exceed 15% of the standard deviation of expected value. The matrix effect was compensated by performing curves and IS dilutions in a pool of matrix from *S. pneumoniae* untreated samples. Three technical and biological replicates allowed reproducibility and variability measurements. Samples were randomly injected and carry-over was evaluated by several randomized blank injection.

Supplementary Table S5. Compounds parameters and linearity

Compounds	<i>S.pneumoniae</i> strains	Retention time (min)	Formula	Precursor ions (m/z)	Product ions (m/z)	Regression equation	R ²
Endogenous glutamine	R6	5,18	C5H10N2O3	146.0686	130.0500	y = 63,676x + 3,7381	0,9992
	CCRI-8970	5,18	C5H10N2O3	146.0686	130.0500	y = 1075,3x - 3,087	0,9994
	CCRI-21487	5,18	C5H10N2O3	146.0686	130.0500	y = 108,93x + 8,2567	0,9994
Endogenous glutamate	R6	4,84	C5H9NO4	147.0526	130.0500	y = 616,74x + 12,99	0,9991
	CCRI-8970	4,84	C5H9NO4	147.0526	130.0500	y = 2252,4x + 3,9258	0,9997
	CCRI-21487	4,84	C5H9NO4	147.0526	130.0500	y = 1770,4x + 15,827	0,9983
Deuterated glutamine	R6	5,18	C5D5H5N2O3	151.1077	135.0844	y = 63,676x + 3,7381	0,9992
	CCRI-8970	5,18	C5D5H5N2O3	151.1077	135.0844	y = 1075,3x - 3,087	0,9994
	CCRI-21487	5,18	C5D5H5N2O3	151.1077	135.0844	y = 108,93x + 8,2567	0,9994
Deuterated glutamate	R6	4,84	C5D5H4NO4	152.0901	135.0844	y = 616,74x + 12,99	0,9991
	CCRI-8970	4,84	C5D5H4NO4	152.0901	135.0844	y = 2252,4x + 3,9258	0,9997
	CCRI-21487	4,84	C5D5H4NO4	152.0901	135.0844	y = 1770,4x + 15,827	0,9983

Supplementary Table S6. Compounds MS settings

Tune page	Cone voltage	3
	Polarity	ESI+
	Da Range	50-600
	Scan time	0.1 sec Continium
	Capillary (kV)	2.75
	Sampling cone	50
	Source offset	80
	Source temperature	120
	Desolvatation temperature	325
	Cone gas	10
	Desolvatation gas	900
	Nebuliser	6
Lock mass solution	Leucine-Enkephaline	200 pg/μL
Lock mass flow rate		20 μL/ min
Transfer CE ramp (V)	Endogenous glutamine	3-5
	Endogenous glutamate	3-5
	Deuterated glutamine	3-5
	Deuterated glutamate	5-7

Chapitre 8 – Criblage chimiogénomique de la résistance à l'imipénème chez des bactéries à Gram négatif

8.1. Résumé

Les bactéries à Gram négatif résistantes aux carbapénèmes constituent une menace majeure pour la santé mondiale. Nous avons appliqué un criblage chimiogénomique chez *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*. Les gènes les plus mutés codaient pour des protéines impliquées dans la biogenèse de la membrane, la transcription et la transduction de signal. Le gène *rpoD* était l'un des gènes les plus mutés communs aux trois espèces, et un « knock-in » muté chez *E. coli* était 4 fois plus résistant à l'imipénème (IMP). *E. coli* et *K. pneumoniae* partageaient de nombreux gènes mutés communs, et la contribution à la sensibilité à l'IMP a été prouvée expérimentalement pour des amidases, transférases et transglycosidases. Chez *P. aeruginosa*, des mutations dans la porine OprD ou dans des systèmes à deux composants ont été détectées. Notre criblage chimiogénomique a mis en évidence des réponses à l'IMP communes ainsi que spécifiques à chaque espèce.

8.2. Abstract

Carbapenem-resistant Gram-negative bacteria are considered a major threat to global health. Imipenem (IMP) is used as a last line of treatment against these pathogens but its efficacy is diminished by the emergence of resistance. We applied a powerful whole genome screen in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* that were submitted to chemical mutagenesis, selected for IMP resistance and characterized by next generation sequencing. A comparative analysis of IMP-resistant clones showed that most mutated genes shared by the three species encoded proteins involved in transcription or signal transduction. Of these, the *rpoD* gene was one of the most prevalent and an *E. coli* strain disrupted for *rpoD* displayed a 4-fold more resistance to IMP. *E. coli* and *K. pneumoniae* also specifically shared several mutated genes, most involved in membrane/cell envelope biogenesis, and the contribution in IMP susceptibility was experimentally proven for amidases, transferases and transglycosidases. *P. aeruginosa* differed from the two *Enterobacteriaceae* with two different resistance mechanisms, one involving mutations in the *oprD* porin or alternatively in two-component systems. Our chemogenomic screen with the three species has highlighted shared and species-specific responses to IMP.

8.3. Article

Chemogenomic screen for imipenem resistance in Gram-negative bacteria

Jessica Y. El Khoury¹, Alexandra Maure¹, Hélène Gingras¹, Philippe Leprohon¹, Marc Ouellette^{1#}

¹Axe des Maladies Infectieuses et Immunitaires du Centre de Recherche du CHU de Québec and Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Québec, Canada

#Corresponding author : Marc Ouellette Ph.D.

Axe des Maladies Infectieuses et Immunitaires

2705 Boul. Laurier

Québec, Québec

G1V 4G2

Tel: 1-418-525-4444 #48184

Fax: 1-418-654-2715

E-mail: Marc.Ouellette@crchul.ulaval.ca

Running title: Mut-seq and IMP resistance in Gram-negative bacteria

Keywords: chemical mutagenesis, carbapenem resistance, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*

Introduction

The World Health Organization (WHO) refers to antimicrobial resistance (AMR) as a major threat to global health and has established a list of priority pathogens for research and development of new effective antibiotics (1). Among the urgent threats is carbapenem resistance in the Gram-negative *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Both are commensal bacteria of the gastrointestinal tract of human and animals, they harbor many virulence factors and are responsible for different types of infections (2, 3). Another threat is the opportunistic pathogen *P. aeruginosa* (4). Those three bacterial species are leading cause of hospital-acquired infections (5).

Carbapenems such as imipenem (IMP) are β -lactam antibiotics (6) that bind and inhibit multiple Penicillin Binding Proteins (PBPs) while resisting hydrolysis by class A extended spectrum β -lactamases and class C β -lactamases (AmpC) (7). Carbapenems are used as a last line of treatment against multidrug-resistant Gram-negative pathogens (7). Nonetheless, resistance against carbapenems has been detected in *Enterobacteriaceae* mainly due to the production of more potent β -lactamases such as *K. pneumoniae* carbapenemases (KPCs), class B metallo- β -lactamases (e.g., VIM, NDM, IMP) and class D β -lactamases (OXA-type) found both on plasmids and in the chromosome (2, 8). Resistance resulting from the loss or modification of porins (OmpK35/36 for *K. pneumoniae* and OmpC/F in *E.coli*), in combination with the production of plasmid- or chromosomally-encoded AmpC, was also observed (9-12). In *P. aeruginosa* the loss of the porin OprD constitutes the major driver of carbapenem resistance, although resistance due to class B metallo- β -lactamases was also reported (13-16).

Exploring resistance to antibiotics at the genomic level is proving useful at revealing drugs' targets and mode of action, resistance mechanisms, and genes or mechanisms that play more subtle roles like facilitating resistance or compensating for fitness cost (17-20). The objective of this study was to apply a powerful whole genome screen for IMP resistance in sensitive isolates of *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*. This screen couples chemical mutagenesis, selection for IMP resistance, and the

characterization of IMP-resistant clones by next generation sequencing (NGS). This approach called Mut-Seq (21) has been helpful for various studies including drug resistance (22, 23). We found that the gene *rpoD*, encoding an RNA polymerase sigma factor, was the most prevalent mutated gene among IMP-resistant clones from the three species and we experimentally validated its role in IMP resistance in *E. coli*. Mutations were also detected in several genes related to the cell wall and membrane biogenesis and these are shown to confer low level IMP resistance in *Enterobacteriaceae*. Lastly, mutations in OprD were frequent in *P. aeruginosa* but we show that two-component signal transduction systems are also likely involved in IMP resistance.

Results

Chemical mutagenesis and selection for resistance to IMP

E. coli ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 13883 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 were treated with Ethyl Methane Sulfonate (EMS) and selected for growth in the presence of IMP. The EMS concentrations, exposure and recovery time as well as the IMP concentration for selection were optimized (see materials and methods). The minimum concentration of IMP used for selection was determined as the concentration at which growth occurred in the presence of IMP for the mutagenized populations but not for the non-mutagenized control populations.

The IMP-resistant clones for the three species were between 2- to 16-fold more resistant than their respective parental wild-type (WT) clones (Tables 1, 2 and S1). Most clones of *E. coli* and *K. pneumoniae* had levels of resistance to IMP considered as intermediate (MIC 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (24). Two *E. coli* clones and five *K. pneumoniae* clones had a MIC of IMP of 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a level consistent with clinical resistance (Tables 1 and S1, respectively). According to the MIC breakpoints for *P. aeruginosa*, all but one clone reached resistance levels consistent with clinical resistance (MIC $\geq 8 \mu\text{g}/\text{mL}$) (Table 2).

Clusters of Orthologous Groups of mutated proteins

The genomes of 145 IMP-resistant clones were analyzed by NGS (45 *K. pneumoniae*, 50 *E. coli* and 50 *P. aeruginosa* clones). The genomes of the parent WT strains were also sequenced. A total of 3810 single nucleotide variants (SNVs) were identified in the *E. coli* mutants (Figure 1A), a majority of clones having at least 40 SNVs (Table S2). In *K. pneumoniae*, 1379 SNVs were detected (Figure 1A) with an average of 22 mutations (from 5 to 39) per genome (Table S3). In *P. aeruginosa*, 654 SNVs were identified (Figure 1A) and an average of 10 mutations (from 2 to 18) was found per mutant (Table S4). SNVs were more prevalent in coding regions than in intergenic regions for all species and non-synonymous SNVs predominated among coding mutations (Figure 1A). Consistent with the mode of action of the mutagen EMS (25), most SNVs consisted of G to A and C to T transitions (Figure 1B). Some small insertions and deletions (InDels) were also observed in coding regions and these were more frequent in *P. aeruginosa* than in *E. coli* or *K. pneumoniae* (Figure 1A).

We hypothesized that functional recurrence among mutated genes between species or clones would help in pinpointing mutations the most relevant to IMP resistance. To ease comparison between the three species, we relied on the Clusters of Orthologous Groups of proteins (COGs) classification. The COG database is composed of over 4600 specific functional COG descriptions grouped into 26 general category letter associations (26). We initially focused on mutated genes part of COG descriptions common to the three species, then on those shared by at least two species and finally on species-specific genes but mutated in a higher number of clones. Thirty-five functional COG descriptions were found in common amongst the three species (Table S5). A third of these belonged to the general categories transcription (K) or signal transduction mechanisms (T) (Figure 2). The *rpoD* gene was the most prevalent from the COG category transcription with mutations detected in a total of 10 mutants in the three species (Table S5). A C58T transition occurred in *rpoD* for one mutant each of *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*, leading to G20S and E20K amino acids substitutions respectively, while eight *E. coli* mutants harbored mutations leading to either A72V, A444V, A444T or I457L substitutions (Figure 3A).

Additional genes coding for DNA-binding transcriptional regulators, sensor histidine kinases (HK), major facilitator superfamily transporters and multidrug transporters were also mutated in the three species but often in a single mutant for each species and thus were not further studied (Tables S5).

The *E. coli* and *K. pneumoniae* mutants shared 275 COG descriptions. Of these, 11 were made of one-to-one matches of *E. coli* and *K. pneumoniae* proteins sharing at least 70% sequence identity (implying genuine functional similarity) and that were also mutated in at least two mutants in each species (Table 3). These 11 genes belonged to 7 general functional categories, the cell wall/membrane/envelope biogenesis category (M) being the most prevalent with 4 mutated genes (Table 3). One was *amiC* coding for a *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase mutated in 9 *E. coli* and 26 *K. pneumoniae* mutants, respectively (Table 3). A majority of mutations localized to the AmiC domain of the protein and several were nonsense mutations (Figure S1A). Another gene was *nlpD*, mutated in 5 *E. coli* and 18 *K. pneumoniae* mutants, respectively (Table 3). This gene codes for the activator of AmiC (27). Similarly to *amiC*, several nonsense mutations were observed in *nlpD* (Figure S1B). The third gene was *wecA*, coding for an undecaprenyl-phosphate alpha-*N*-acetylglucosaminyl 1-phosphate transferase mutated in 5 mutants of each species (Table 3). The last gene from the M category was *slt* which codes for a soluble lytic murein transglycosylase. The *slt* gene was mutated in 5 mutants, a majority harboring nonsense mutations (Figure S1C). The remaining 7 genes were not part of the cell wall biogenesis category and had unrelated functions (Table 3). These were shared by 4 to 9 *E. coli* and *K. pneumoniae* mutants (Table 3). For the gene *clbJ* (COG1020, category Q), the E1684G mutation found in 15 mutants of *K. pneumoniae* was present also in the IMP-sensitive *E. coli* WT strain, making it less likely to contribute to IMP resistance.

P. aeruginosa mutants were fairly distinct compared to *E. coli* and *K. pneumoniae* mutants and these were thus not directly compared to *E. coli* and *K. pneumoniae* mutants in 2-ways comparisons.

Species-specific mutations

Recurrence among clones was previously shown to ease the identification of SNVs contributing to the resistance phenotype (22) so for retrieving gene candidates specifically mutated in *E. coli* we thus focused on those mutated in at least 3 clones (Table 1). The gene *yceG* encoding a cell division protein was the most prevalent among *E. coli* clones, with 15 SNVs (including 5 nonsense mutations) detected in 20 mutants (Table 1). The second most prevalent gene was DR76_2948 coding for a trehalose-6-phosphate synthase with two mutations (D376N and P380L) found in a total of 14 *E. coli* mutants (Table 1). Seven different mutations (5 of which were nonsense) occurred in the *rne* gene for six mutants. This gene is coding for the ribonuclease E. Four different mutations occurred in five mutants for the gene DR76_475 encoding a glutamate racemase. Finally, the *tolA* gene, which is part of the Tol-Pal cell envelope complex, was mutated in three *E. coli* mutants, including mutants M24 and M45 that also hold a mutated *amiC* (Table 1). A more exhaustive list of mutations can be found in Table S6.

The mutational landscape of *P. aeruginosa* was less than for *E. coli* (Figure 1A) so we lowered our cut-off for candidate genes to those mutated in at least two mutants (Table S7). All mutants either had a mutation in the porin OprD or in two component systems (TCSs) consisting of histidine kinase (HK) and a response regulator (Table 2). For *oprD*, 20 different mutations were found in 28 *P. aeruginosa* clones, 16 of which were leading to a stop codon (Table 2). Every mutant with a nonsense mutation in *oprD* had a MIC of IMP of 16 µg/mL, an 8-fold increase compared to WT *P. aeruginosa* (Table 2). This was also the case for mutant M34 harboring a Y343N substitution in OprD, while other *oprD* coding mutations (G183D, G402D or S325F) were associated with lower IMP resistance levels (Table 2). For TCSs, 15 mutants had a mutation in the sensor HK (A4W92_13070) (Table 2). This HK is part of a two-component signal transduction system for which A4W92_13065, mutated in 4 independent *P. aeruginosa* clones (Table 2), is the response regulator. Interestingly, mutants M6 and M9 had a R419H mutation in the HK A4W92_04840 (Table 2), the same change that occurred in mutants M1, M3 and M11 for

the HK described above (A4W92_13070). Lastly, the sensor HK PhoQ (A4W92_05675) was mutated in *P. aeruginosa* clones M5 (Q258*) and M36 (E198K) (Table 2).

Phenotypic validation of mutations highlighted by Mut-Seq

The role of specific mutations in resistance to IMP was tested in *E. coli* ATCC 25922 using a knock-in approach. This involved the transformation of WT cells with a DNA cassette made of a PCR fragment containing the mutation fused to a kanamycin (Kan) resistance gene flanked by FRT sequences used for the removal of the selection marker by the FLP/FLPe recombinase (Figure S2). For the *rpoD* gene mutated in all species we tested the G1331A transition detected in *E. coli* and leading to the A444V amino acid substitution (Table 4). This mutation conferred a 4-fold increase in IMP resistance to the *rpoD*^{G1331A}::*kan* transformants compared to the *rpoD*^{WT}::*kan* cells used as a control (we failed to remove the *kan* resistance marker in *rpoD*^{G1331A}::*kan* despite several attempts) (Table 4). The transformant *rpoD*^{WT}::*kan* had the same MIC (0.25 µg/mL) of IMP as *E. coli* ATCC 25922 WT. The A444V mutation allowed cells to sustain higher IMP concentrations than the control both in liquid medium (Figure 3B) and on solid agar (Figure 3C) but conferred a slight fitness cost in the absence of IMP (Figure 3B).

Using the same knock-in approach we also investigated the role in IMP resistance of mutations in genes shared by *E. coli* and *K. pneumoniae* mutants (Table 3). The G402R substitution in *AmiC*, a position mutated in two *E. coli* mutants and one mutant of *K. pneumoniae* (Figure S1A), decreased the susceptibility to IMP by 2-fold when introduced into *E. coli* ATCC 25922 (Table 4). Similarly, the nonsense mutations Q161* and R475* respectively in *NlpD* and *Slt* increased the MIC of IMP by 2-fold (Table 4). The *E. coli* mutant M14 and the *K. pneumoniae* mutant M17 had mutations in both *amiC* and *slt*, and the *AmiC* G402R and *Slt* R475* mutations were indeed additive in increasing the MIC of IMP by 4-fold when co-transformed into *E. coli* ATCC 25922 (Table 4). Despite being mutated in 5 mutants each of *E. coli* and *K. pneumoniae* (Table 3), the role of *wecA* mutations was less clear as the transformant for the R40C mutation (detected in *E. coli* mutant M12) was not conclusively altered for its MIC of IMP (Table 4). Regarding the

mutations in genes unrelated to cell wall biogenesis but having at least 70% sequence identity between *E. coli* and *K. pneumoniae* (Table 3), we tested the mutations A138V in SpoT, A429T in DR76_3362 and A539V in GidA but similarly to *wecA* none had a significant impact on the MIC of IMP (Table 4).

We also tested some representatives of the most prevalent genes specifically detected in *E. coli*. The mutations in *yceG* and *rne* respectively leading to the Q92* and Q775* nonsense mutations, as well as the P380L substitution in DR76_2948 and the M67I mutation in TolA were independently transformed in *E. coli* ATCC 25922. The MIC of IMP was increased by 2-fold (0.5 µg/mL) in the case of the *rne* and *tolA* knock-in (Table 4).

The knock-ins for mutations in *wecA* and *spoT* described above had an ambiguous phenotype by MIC measurements, so we looked for more subtle phenotypes by monitoring their growth by serial dilution on solid medium in the presence of IMP. As expected, the *E. coli* mutant M14 (harboring an A138V mutation in SpoT) grew until the highest cell dilution and IMP concentration tested. In contrast, *E. coli* ATCC 25922 WT only grew up to the 10⁻¹ dilution on agar plate supplemented with 0.25 µg/mL of IMP (its MIC) (Figure 4). As a positive control for transformation we used the M67I mutation in TolA. This mutation allowed cells to grow until the 10⁻² dilution at 0.5 µg/mL (Figure 4), consistent with the MIC of this transformant (Table 4). The mutations R40C in WecA and A138V in SpoT had an intermediate phenotype in growing for more dilutions than WT cells at 0.12 µg/mL IMP and at the dilution 10⁻¹ at 0.25 µg/mL IMP (Figure 4). Given its recurrence we also tested the gene *yceG* but the Q92* mutation did not increase growth in the presence of IMP and was even detrimental in the conditions tested (Figure 4).

Discussion

The use of whole genome screens is now allowing holistic views of mechanism of action and resistance mechanisms against antimicrobial agents. We applied here a Mut-Seq screen (21, 22, 28) combining chemical mutagenesis and NGS to obtain clones of *E. coli*,

K. pneumoniae and *P. aeruginosa* with decreased susceptibility to IMP. We posited that using diverse species and analyzing a large set of independent mutants would pinpoint shared pathways of resistance as well as species-specific traits. As expected from phylogeny, the response of *E. coli* and *K. pneumoniae* to IMP shared more similarity than with *P. aeruginosa*. Some responses were shared between the three species and while we concentrated on the genes mutated in the most mutants it is quite possible that mutant specific genes are also important for IMP response.

Transcription and signal transduction mechanisms were the two main categories of orthologous proteins shared between the three species. The most prevalent gene common to the three species was *rpoD* which codes for the σ^{70} factor that associates to the core RNA polymerase complex to initiate specific transcription (29). Mutations in *rpoD* were in distinct domains and we validated the role of the A444V substitution detected in several independent *E. coli* mutants. This substitution occurred in a region of RpoD that is highly conserved as it is part of the -10 promoter recognition helix binding (30). While *rpoD* has never been involved with IMP resistance, sigma factors are well known to regulate a number of genes often associated with responses to stress (31). Further work may provide insights on the downstream target gene(s) responsible for the decrease in IMP susceptibility. Several other genes (62 in *E. coli* and 39 in *K. pneumoniae*), often strain specific, involved in transcription were mutated, and some may indeed help in the response to IMP. Among many of the TCSs mutated in each of the three species, *evgS* and *phoQ*, were common (Table S5). Knock-in of *evgS* or *phoQ* was not possible because of the gene arrangement and close proximity of their respective regulators *evgA* and *phoP*.

IMP inhibits bacterial cell wall synthesis by binding to and inactivating the PBPs, with the highest affinity to PBPs-1a, -1b and -2 (32, 33), leading to rapid cell lysis and death (34). Consistent with IMP mode of action, genes from the category cell wall and membrane biogenesis were among the most represented in *E. coli* and *K. pneumoniae*. Amidases such as AmiC split the peptidoglycan (PG) of daughter cells during cell division (33). These amidases are autoinhibited and AmiC is activated by NlpD, a lipoprotein anchored in the outer membrane (27). Mutations in both *amiC* and *nlpD* contributed to a

decrease in susceptibility to IMP (Table 4). It was demonstrated that the Tol-Pal system is implicated in regulating cell wall cleavage during cell division by activating NlpD (35) as well as in the modulation of PG synthesis (36). TolA, part of the Tol-Pal complex, was found mutated in three mutants of *E. coli* and the M67I mutation decreased the susceptibility of the WT strain by 2-fold (Table 4). Mutations in *amiC*, *nlpD* and *tolA* are likely to be loss of function mutation since *nlpD* and *amiC* have nonsense mutations or InDels in many mutants (Figure S1A and S1B). Our observations are consistent with previous studies, where mutants lacking *nlpD* or amidases and several lytic transglycosylases (see below) displayed a delayed lysis response to ampicillin (37, 38).

The PG is made of alternating *N*-acetylglucosamine (GlnNAc) and *N*-acetylmuramic acid (MurNAc) connected by a β -1,4-glycosidic bond (33). Lytic transglycosylases (LTs) cleave this glycosidic bond (33). *E. coli* has eight membrane-bound LTs (MLTs) and one soluble LT named Slt70 (33). Several of these LTs (MltA, MltB, MltD and RlpA) were mutated in single *E. coli* or *K. pneumoniae* mutants and were not studied (Tables S2 and S3) but the *yceG* (MltG) gene was mutated in 20 *E. coli* mutants, five with nonsense mutations (Table 1). The transformation of the mutation Q92* in *E. coli* ATCC 25922 WT did not change the susceptibility of the strain to IMP and it did not provide a growth advantage in the presence of IMP (Table 4 and Figure 4). While we could not find a specific role of *yceG* in IMP resistance, its frequent mutation in *E. coli* suggests a role possibly in combination with other mutations. Indeed MltG was shown to interact with PBP1b and in absence of PBP1b, MltG was shown to be toxic (39). Since IMP inhibits PBP1b, possibly loss of function mutations in *yceG* are selected to limit its toxicity. Inhibition of PBPs by β -lactams leads to an accumulation of non-crosslinked PG and Slt70 is the main enzyme responsible for destroying this nascent PG (40). Slt inactivation produced differential effects on β -lactam sensitivity depending on the genetic background (40-42). Here we showed that a *slt* nonsense mutation (R475*) in *E. coli* ATCC 25922 decreases the susceptibility to IMP by 2-fold.

P. aeruginosa differed extensively in its response to IMP in contrast to the two *Enterobacteriaceae*. The outer membrane permeability of *P. aeruginosa* is about 12 to 100

fold lower than that of *E. coli* (43) and this is probably due to a reduced number of general diffusion porins and the presence of a variety of specific porins such as OprD (16, 44). IMP penetrates the pseudomonal membrane through OprD (45). Resistance to IMP in *P. aeruginosa* can occur through loss of OprD which has been reported to take place at the levels of transcription and translation (14, 46). Mutations resulting in a premature stop codon were found in clinical isolates (47-50), several of which (W6*, Q19*, W65*, W138*, Q158*, W277*, Q295*, W339* and W415*) were also detected in this study as well as new ones (Q30*, Q67*, Q79* and Q235*) (Table 2). Stops codons occurred at tryptophan or glutamine residues, the only two codons that can be changed to a stop codon through a single transition (along with one out of the six codons for arginine) induced by EMS. TCSs are known to downregulate OprD and contribute to IMP resistance (51, 52). In *P. aeruginosa* ATCC 27853 mutants selected in this study, 19 mutants had a mutation either in the sensor HK gene (A4W92_13070) or in the gene encoding its response regulator (A4W92_13065) without having a mutated *oprD* gene (Table 2). Two independent mutants had a mutation in another sensor HK gene (A4W92_04840) (Table 2). These mutated HKs belong to the same clade as the ones known to regulate OprD (53). Two mutations (E198K and Q258*) in the sensor HK PhoQ (A4W92_05675) were detected in two independent clones (Table 2). A PhoQ-null mutant is resistant to polymyxin B and to aminoglycosides antibiotics (54-56) and mutated PhoQ were reported in *P. aeruginosa* clinical isolates resistant to polymyxin B (57) or colistin (polymyxin E) (58). Current understanding would suggest that the mutated HKs activate their respective response regulators that in turn downregulate *oprD*. Mutated HKs were also observed in *E. coli* and *K. pneumoniae* resistant to IMP (Table S5), highlighting the potential key role of HKs in IMP response in Gram-negative bacteria.

Our chemogenomic screen with three bacterial species has highlighted shared and species-specific response to IMP. The most mutated genes encoded for proteins involved in transcription, signal transduction and membrane/cell envelope biogenesis. The number of mutants investigated allowed a holistic view of the response to IMP and to concentrate our functional work on the most recurrent genes. Most mutations tested were indeed associated with a two-fold difference in IMP susceptibility. Many other mutations are likely to be

involved in response to IMP and our dataset can be useful to better understand IMP and find strategies to revert carbapenem resistance in Gram-negative bacteria.

Materials and methods

Bacterial strains, plasmids and growth conditions

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table S8. Unless otherwise specified, *E. coli* (ATCC 25922), *K. pneumoniae* (ATCC 13883) and *P. aeruginosa* (ATCC 27853) were cultured on Luria-Bertani (LB) or Nutrient Agar (1.5%) and incubated at 37°C for 18 to 24 hours. Liquid cultures were grown in LB for *E. coli* and Brain Heart Infusion (BHI) medium for *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*. Plasmid pRedET and the FRT-flanked PGK-gb2-kan cassette (catalogue number K006) and the enhanced FLP expression plasmid 707-FLPe (catalogue number A104) with tetracycline resistance marker were obtained from Gene Bridges GmbH. IMP-monohydrate was purchased from Santa-Cruz Biotechnology®, all other chemicals were purchased from Sigma Aldrich.

Antibacterial susceptibility testing

The MICs of IMP for the WT strain of the three species and for their respective mutants, as well as optimization of the EMS concentrations (Table S8), were performed by microdilution in 96 well plates according to recommendations from the CLSI. The MICs of IMP for the single or double knock-ins were determined by macrodilution. All MICs were determined from at least three independent biological replicates, each replicate being further assessed in technical duplicates.

Chemical mutagenesis and selection of antibiotic resistant mutants

Overnight (ON) cultures of the strains were diluted and incubated at 37°C with shaking (220 rpm) until they reached an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.5. Each

culture was separated into two tubes of 10 mL. In one of the tubes, the EMS was added at a concentration equivalent to four times its MIC for *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* and eight times its MIC for *E. coli*. Cultures of *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* were incubated for 10 min (*E. coli* for 20 min) at 37°C. Cultures were then diluted by half using ice-cold medium and then further diluted by one tenth before being incubated until reaching an OD₆₀₀ of 0.5. The cultures were centrifuged at 4000 rpm for 5 min then the pellet was resuspended in 200 µL of the culture medium. Ten-fold dilutions (from 10⁻³ to 10⁻⁷) were spread on agar plates to allow colony counting. In order to select mutants resistant to IMP, 100 µL of the mutagenized cultures were spread on agar plates containing an increasing concentration of the antibiotic (between 2X and 20X the MIC depending on the species). Agar plates were incubated overnight at 37°C and colonies were counted the next day. This protocol was performed for each strain in duplicate.

Extraction and quantification of DNA

Genomic DNA (gDNA) was extracted using the Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) according to the manufacturer's protocol. The purity of the gDNA were analyzed using the NanoDrop® spectrophotometer. Quantification was performed by fluorescence detection using the QuantiFluor® One dsDNA System (Promega).

DNA sequencing

Libraries were produced from 0.8 ng of gDNA using the Nextera XT DNA Library Prep Kit (Illumina) according to the manufacturer's protocol. Libraries were verified by the 2100 Bioanalyzer High Sensitivity DNA Chips (Agilent) and quantified by QuantiFluor® One dsDNA System (Promega). Libraries were sequenced on a Illumina HiSeq2500 system (101 nt paired-end sequencing) at a final concentration of 8 pM.

Mut-Seq data analysis

Sequence reads were aligned to the *E. coli* ATCC 25922 (PRJNA244551), *K. pneumoniae* ATCC 13883 (PRJNA244567) or *P. aeruginosa* ATCC 27853 (PRJNA316664) genomes using the software bwa-mem (59). The seed length was 32 and 2 mismatches were allowed within the seed, the maximum number of mismatches was 4. Read duplicates were marked using Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>), SNVs and InDels calling was done using the GATK software (60). Mutations common to the WT strain sequence in parallel were excluded and the remaining mutations (i.e. mutant-specific mutations) were annotated. To ease the comparison between the three species, the common COGs (26) were determined using the workflow of the COGsoft (<https://sourceforge.net/projects/cogtriangles/files/>).

Generation of knock-ins in *E. coli*

We first transformed *E. coli* ATCC 25922 with the expression plasmid pRedET as recommended by the manufacturer (Gene Bridges GmbH). Mutated PCR fragments of the genes of interest were amplified from the appropriate *E. coli* mutant and fused to the FRT-flanked PGK-gb2-kan cassette before being transformed in *E. coli* strain containing the pRedEt plasmid. L-arabinose was added to induce the expression of the Red/ET recombination proteins and transformants were selected with Kan (40 µg/mL). Colonies were analyzed by colony PCR and sequencing. All primers used to generate the single knock-ins and to check the right integration of the gene replacement cassette are listed in Table S9. The enhanced FLP conditional expression plasmid 707-FLPe was transformed into the strain containing the gene replacement cassette so that recombination occurs at the FRT sites. PCR confirms both the removal of the Kan cassette by FLP recombination (Figure S2) and the presence of the knock-in mutation.

Testing the effect of mutations on the growth of *E. coli*

Cultures ($OD_{600} = 0.9$) were serially diluted (10^{-1} to 10^{-6}) in LB and 5 μ L were spotted on freshly prepared LB-agar plates supplemented with different concentrations of IMP. Plates were incubated at 37°C overnight and the next day they were photographed using an AlphaImager system (Alpha Innotech).

For the growth curve in liquid medium, 5 μ L of 1×10^7 CFU/ml were inoculated in 200 μ L of LB medium in the absence or presence of IMP at a range of 0.03 to 4 μ g/mL in 96 well plate. The plate was incubated at 37°C and the OD_{600} was read each 30 min after shaking for 10 sec using a Cytation 5 multimode reader. Each assay was done in technical and biological triplicates.

Data availability

The WGS data have been deposited in the SRA database and accessions are listed in tables S10, S11 and S12.

Acknowledgments

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research grant 81266 and by a Canadian Institutes of Health Research Foundation grant to MO. MO is the holder of a Tier a Canada Research Chair in Antimicrobial Resistance. We thank Dr Michel G. Bergeron for providing bacterial strains ATCC 13883 and ATCC 27853. The authors declare no conflict of interest.

Authors contributions

JYEK designed and performed the experiments, analyzed the data and drafted the manuscript. AM and HG were involved in the design of Mut-Seq and with experiments. PL provided the bioinformatics' pipeline for the Mut-Seq analysis and revised the manuscript. MO supervised the work and revised the manuscript.

References

1. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outterson K, Patel J, Cavalieri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N. 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 18:318-327.
2. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. 2012. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol Med* 18:263-72.
3. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. 2017. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 41:252-275.
4. Lopez-Causape C, Cabot G, Del Barrio-Tofino E, Oliver A. 2018. The Versatile Mutational Resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol* 9:685.
5. Peleg AY, Hooper DC. 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med* 362:1804-13.
6. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. 2011. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4943-60.
7. Lob SH, Hackel MA, Kazmierczak KM, Young K, Motyl MR, Karlowsky JA, Sahm DF. 2017. In Vitro Activity of Imipenem-Relebactam against Gram-Negative ESKAPE Pathogens Isolated by Clinical Laboratories in the United States in 2015 (Results from the SMART Global Surveillance Program). *Antimicrob Agents Chemother* 61.
8. Diene SM, Rolain JM. 2014. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 20:831-8.
9. Bidet P, Burghoffer B, Gautier V, Brahimi N, Mariani-Kurkdjian P, El-Ghoneimi A, Bingen E, Arlet G. 2005. In vivo transfer of plasmid-encoded ACC-1 AmpC from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in an infant and selection of impermeability to imipenem in *K. pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3562-5.
10. Queenan AM, Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 20:440-58.

11. Chia JH, Siu LK, Su LH, Lin HS, Kuo AJ, Lee MH, Wu TL. 2009. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* in Taiwan: resistance due to combined CMY-2 production and porin deficiency. *J Chemother* 21:621-6.
12. Shin SY, Bae IK, Kim J, Jeong SH, Yong D, Kim JM, Lee K. 2012. Resistance to carbapenems in sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* is related to DHA-1 and loss of OmpK35 and/or OmpK36. *J Med Microbiol* 61:239-45.
13. Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. 2009. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:4783-8.
14. Fang ZL, Zhang LY, Huang YM, Qing Y, Cao KY, Tian GB, Huang X. 2014. OprD mutations and inactivation in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from China. *Infect Genet Evol* 21:124-8.
15. Hong DJ, Bae IK, Jang IH, Jeong SH, Kang HK, Lee K. 2015. Epidemiology and Characteristics of Metallo-beta-Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother* 47:81-97.
16. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. 2019. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv* 37:177-192.
17. Feng J, Lupien A, Gingras H, Wasserscheid J, Dewar K, Legare D, Ouellette M. 2009. Genome sequencing of linezolid-resistant *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals novel mechanisms of resistance. *Genome Res* 19:1214-23.
18. Fani F, Leprohon P, Legare D, Ouellette M. 2011. Whole genome sequencing of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* reveals mutations in penicillin-binding proteins and in a putative iron permease. *Genome Biol* 12:R115.
19. Koser CU, Ellington MJ, Peacock SJ. 2014. Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. *Trends Genet* 30:401-7.
20. Rimoldi SG, Gentile B, Pagani C, Di Gregorio A, Anselmo A, Palozzi AM, Fortunato A, Pittiglio V, Ridolfo AL, Gismondo MR, Rizzardini G, Lista F. 2017. Whole genome sequencing for the molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at the Italian ASST Fatebenefratelli Sacco Hospital, 2012-2014. *BMC Infect Dis* 17:666.

21. Robins WP, Faruque SM, Mekalanos JJ. 2013. Coupling mutagenesis and parallel deep sequencing to probe essential residues in a genome or gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E848-57.
22. Gingras H, Patron K, Bhattacharya A, Leprohon P, Ouellette M. 2019. Gain and loss of function screens coupled to next generation sequencing for antibiotic mode of action and resistance studies in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* doi:10.1128/AAC.02381-18.
23. Brammeld JS, Petljak M, Martincorena I, Williams SP, Alonso LG, Dalmases A, Bellosillo B, Robles-Espinoza CD, Price S, Barthorpe S, Tarpey P, Alifrangis C, Bignell G, Vidal J, Young J, Stebbings L, Beal K, Stratton MR, Saez-Rodriguez J, Garnett M, Montagut C, Iorio F, McDermott U. 2017. Genome-wide chemical mutagenesis screens allow unbiased saturation of the cancer genome and identification of drug resistance mutations. *Genome Res* 27:613-625.
24. Wayne P. 2019. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI supplement M100.
25. Du H, Pan B, Chen T. 2017. Evaluation of chemical mutagenicity using next generation sequencing: A review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 35:140-158.
26. Galperin MY, Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. 2015. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. *Nucleic Acids Res* 43:D261-9.
27. Peters NT, Dinh T, Bernhardt TG. 2011. A fail-safe mechanism in the septal ring assembly pathway generated by the sequential recruitment of cell separation amidases and their activators. *J Bacteriol* 193:4973-83.
28. Lehrbach NJ, Ji F, Sadreyev R. 2017. Next-Generation Sequencing for Identification of EMS-Induced Mutations in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Protoc Mol Biol* 117:7 29 1-7 29 12.
29. Borukhov S, Nudler E. 2008. RNA polymerase: the vehicle of transcription. *Trends Microbiol* 16:126-34.

30. Campbell EA, Muzzin O, Chlenov M, Sun JL, Olson CA, Weinman O, Trester-Zedlitz ML, Darst SA. 2002. Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol Cell* 9:527-39.
31. Paget MS. 2015. Bacterial Sigma Factors and Anti-Sigma Factors: Structure, Function and Distribution. *Biomolecules* 5:1245-65.
32. Sauvage E, Terrak M. 2016. Glycosyltransferases and Transpeptidases/Penicillin-Binding Proteins: Valuable Targets for New Antibacterials. *Antibiotics (Basel)* 5.
33. Dik DA, Fisher JF, Mobashery S. 2018. Cell-Wall Recycling of the Gram-Negative Bacteria and the Nexus to Antibiotic Resistance. *Chem Rev* 118:5952-5984.
34. Rodloff AC, Goldstein EJ, Torres A. 2006. Two decades of imipenem therapy. *J Antimicrob Chemother* 58:916-29.
35. Tsang MJ, Yakhnina AA, Bernhardt TG. 2017. NlpD links cell wall remodeling and outer membrane invagination during cytokinesis in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 13:e1006888.
36. Gray AN, Egan AJ, Van't Veer IL, Verheul J, Colavin A, Koumoutsi A, Biboy J, Altelaar AF, Damen MJ, Huang KC, Simorre JP, Breukink E, den Blaauwen T, Typas A, Gross CA, Vollmer W. 2015. Coordination of peptidoglycan synthesis and outer membrane constriction during *Escherichia coli* cell division. *Elife* 4.
37. Heidrich C, Ursinus A, Berger J, Schwarz H, Holtje JV. 2002. Effects of multiple deletions of murein hydrolases on viability, septum cleavage, and sensitivity to large toxic molecules in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184:6093-9.
38. Uehara T, Dinh T, Bernhardt TG. 2009. LytM-domain factors are required for daughter cell separation and rapid ampicillin-induced lysis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 191:5094-107.
39. Yunck R, Cho H, Bernhardt TG. 2016. Identification of MltG as a potential terminase for peptidoglycan polymerization in bacteria. *Mol Microbiol* 99:700-18.
40. Cho H, Uehara T, Bernhardt TG. 2014. Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. *Cell* 159:1300-11.
41. Templin MF, Edwards DH, Holtje JV. 1992. A murein hydrolase is the specific target of bulgecin in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 267:20039-43.

42. Costa CS, Anton DN. 2006. High-level resistance to mecillinam produced by inactivation of soluble lytic transglycosylase in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Microbiol Lett* 256:311-7.
43. Hancock RE. 1998. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis* 27 Suppl 1:S93-9.
44. Hancock RE, Brinkman FS. 2002. Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol* 56:17-38.
45. Trias J, Nikaido H. 1990. Outer membrane protein D2 catalyzes facilitated diffusion of carbapenems and penems through the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 34:52-7.
46. Shu JC, Kuo AJ, Su LH, Liu TP, Lee MH, Su IN, Wu TL. 2017. Development of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is associated with OprD polymorphisms, particularly the amino acid substitution at codon 170. *J Antimicrob Chemother* 72:2489-2495.
47. Pirnay JP, De Vos D, Mossialos D, Vanderkelen A, Cornelis P, Zizi M. 2002. Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* oprD gene from clinical and environmental isolates. *Environ Microbiol* 4:872-82.
48. Gutierrez O, Juan C, Cercenado E, Navarro F, Bouza E, Coll P, Perez JL, Oliver A. 2007. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 51:4329-35.
49. Kao CY, Chen SS, Hung KH, Wu HM, Hsueh PR, Yan JJ, Wu JJ. 2016. Overproduction of active efflux pump and variations of OprD dominate in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bloodstream infections in Taiwan. *BMC Microbiol* 16:107.
50. Courtois N, Caspar Y, Maurin M. 2018. Phenotypic and genetic resistance traits of *Pseudomonas aeruginosa* strains infecting cystic fibrosis patients: A French cohort study. *Int J Antimicrob Agents* 52:358-364.
51. Perron K, Caille O, Rossier C, Van Delden C, Dumas JL, Kohler T. 2004. CzcR-CzcS, a two-component system involved in heavy metal and carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem* 279:8761-8.

52. Caille O, Rossier C, Perron K. 2007. A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189:4561-8.
53. Chen YT, Chang HY, Lu CL, Peng HL. 2004. Evolutionary analysis of the two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Mol Evol* 59:725-37.
54. Macfarlane EL, Kwasnicka A, Ochs MM, Hancock RE. 1999. PhoP-PhoQ homologues in *Pseudomonas aeruginosa* regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Mol Microbiol* 34:305-16.
55. Macfarlane EL, Kwasnicka A, Hancock RE. 2000. Role of *Pseudomonas aeruginosa* PhoP-phoQ in resistance to antimicrobial cationic peptides and aminoglycosides. *Microbiology* 146 (Pt 10):2543-54.
56. Gooderham WJ, Hancock RE. 2009. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Rev* 33:279-94.
57. Barrow K, Kwon DH. 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* 53:5150-4.
58. Miller AK, Brannon MK, Stevens L, Johansen HK, Selgrade SE, Miller SI, Hoiby N, Moskowitz SM. 2011. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 55:5761-9.
59. Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754-60.
60. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytzky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA. 2010. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20:1297-303.

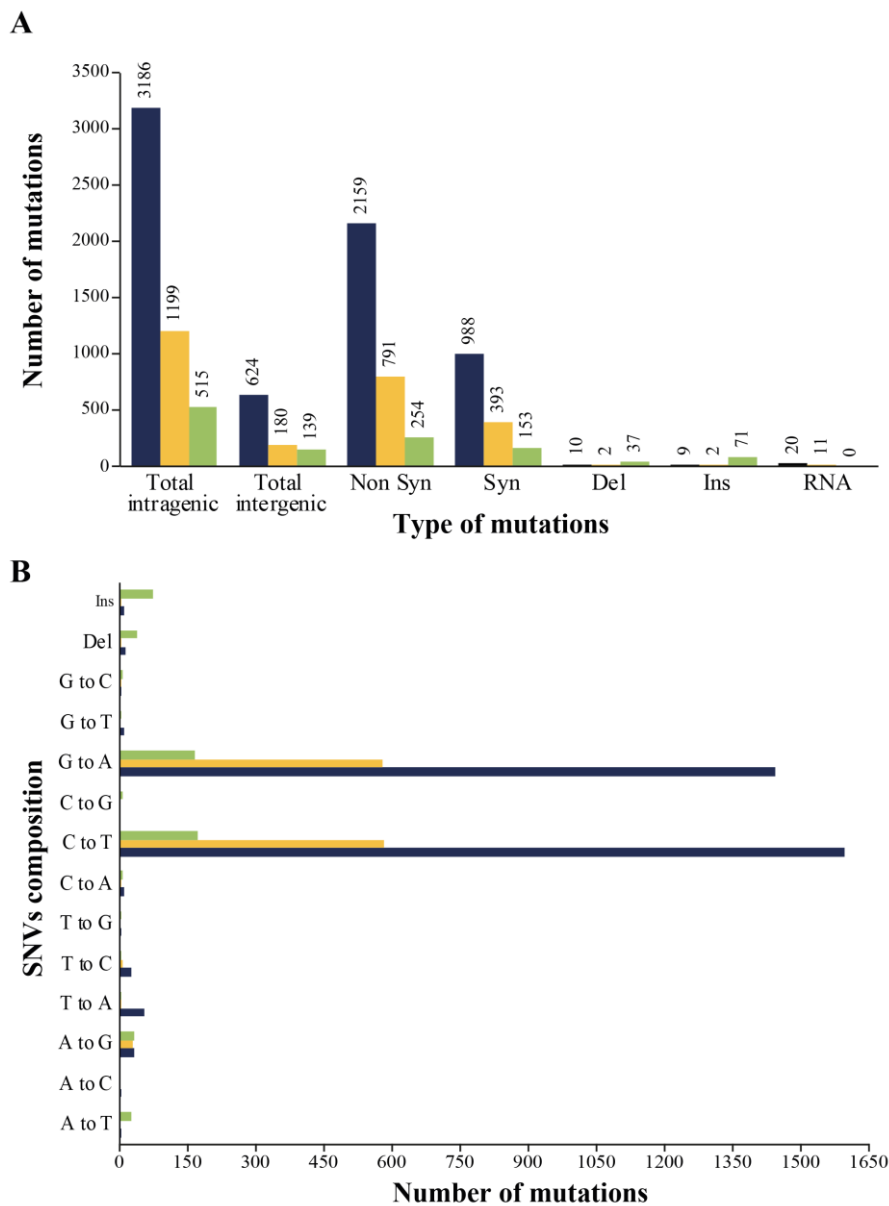


Figure 1. Summary of number and type of mutations induced by EMS in the three bacterial species.

Number and type (A) as well as distribution (B) of mutations found in Mut-Seq mutants selected for IMP resistance in *E. coli* (blue), *K. pneumoniae* (orange) and *P. aeruginosa* (green). Syn, Synonymous; Non Syn, Non Synonymous; Del, Deletion; Ins, Insertion; RNA includes (rRNA, tRNA, tmRNA and ncRNA); SNV, Single Nucleotide Variant.

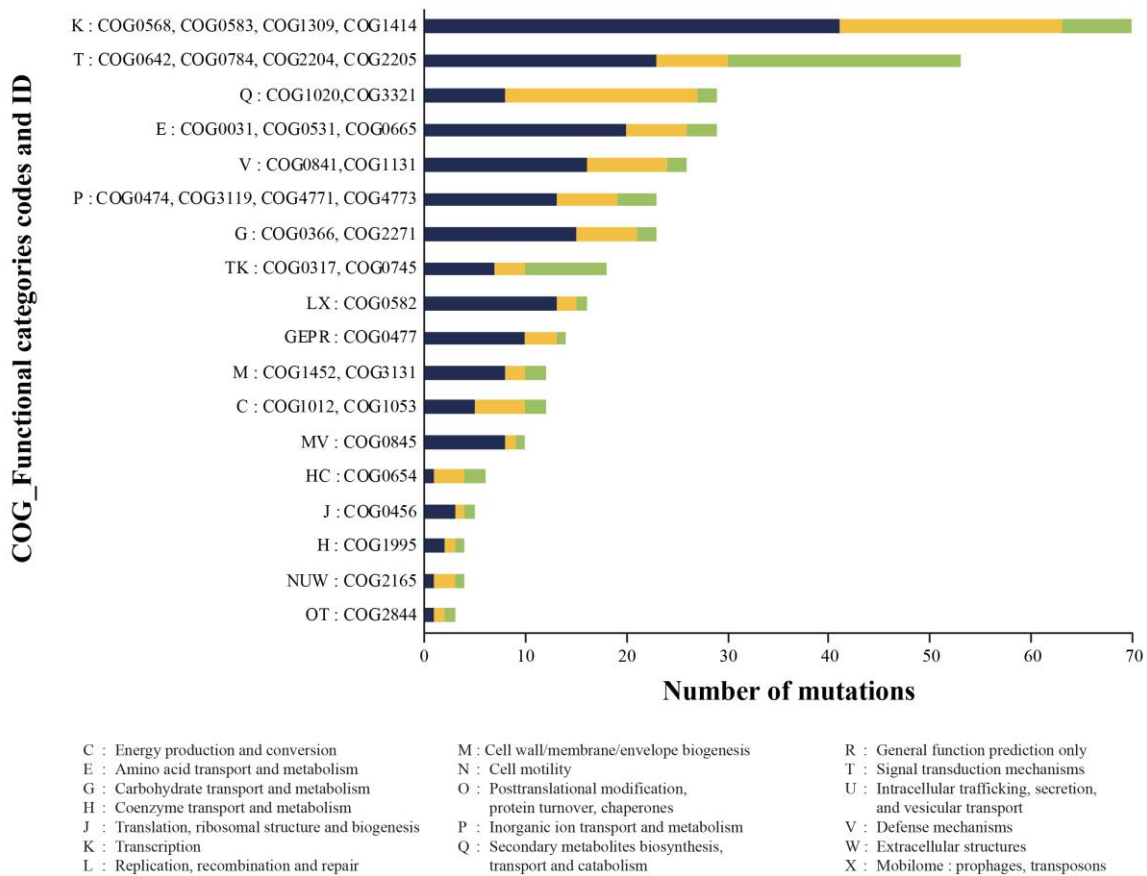


Figure 2. COG functional categories detected among the three species for the mutated genes. Mutated genes were classified into the appropriate COG and the most common COGs shared by *E. coli* (blue), *K. pneumoniae* (orange) and *P. aeruginosa* (green) are shown.

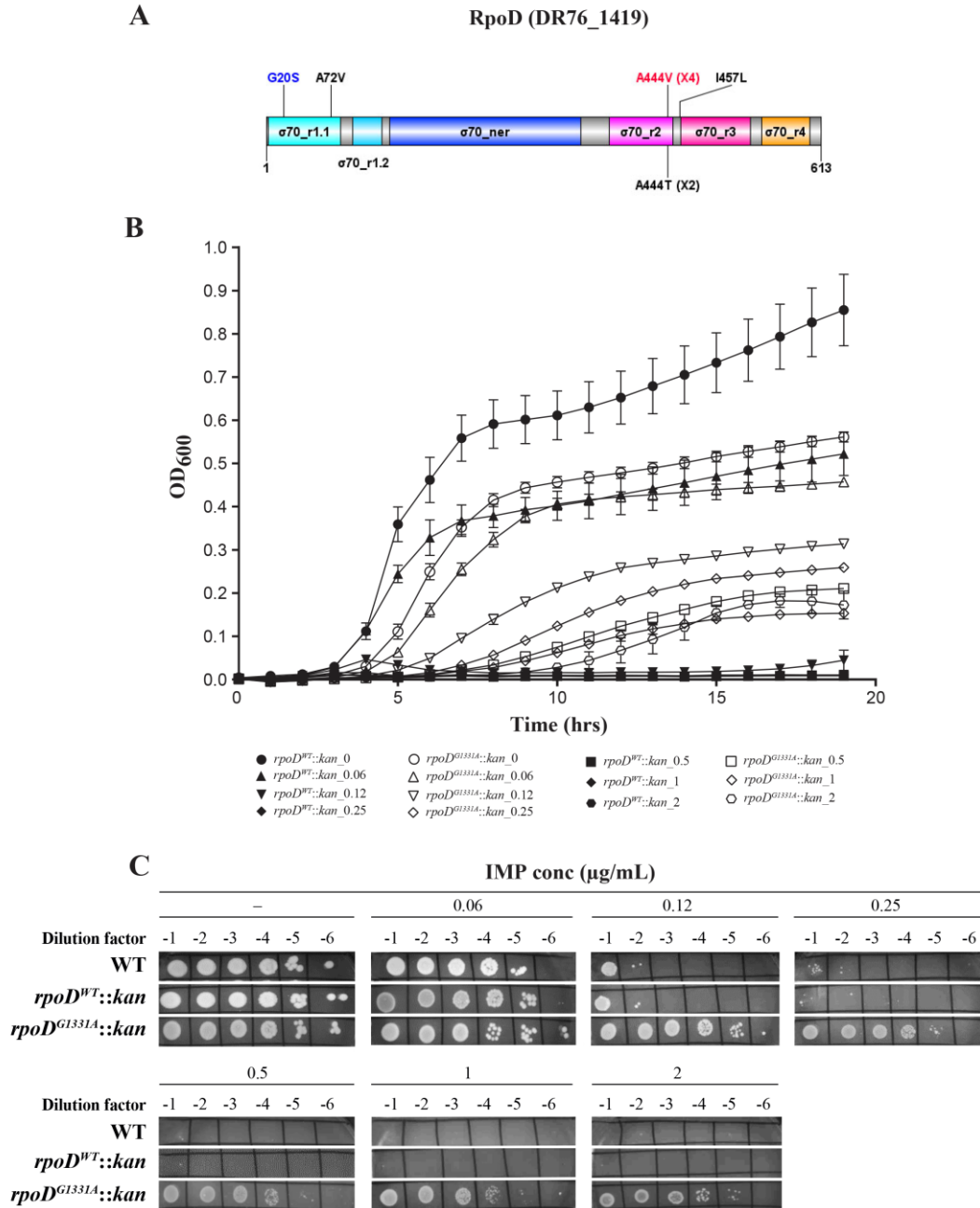


Figure 3. Validation of the role of RpoD in IMP susceptibility. (A) Schematic representation of the RpoD (DR76_1419) domains. The mutation marked in red was used to generate the single knock-in in *E. coli* ATCC 25922 (*rpoD^{G1331A}::kan*). Numbers between parentheses indicate the recurrence of the mutation among clones. The G20S and E20K (not shown) substitutions were only found in one mutant of *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* respectively. $\sigma70_r$, sigma 70_region; ner, non-essential region. (B) Growth

curves of *rpoD*^{WT}::*kan* and *rpoD*^{G1331A}::*kan* in LB in the absence or presence of IMP at the indicated concentrations. Data shown is the average \pm SEM of three biological replicates done in technical triplicates. (C) Cultures of *E. coli* ATCC 25922 WT, *rpoD*^{WT}::*kan* and *rpoD*^{G1331A}::*kan* were serially diluted and spotted on LB-agar plates in the absence (-) or presence of imipenem (IMP) at the indicated concentrations. Plates were incubated overnight at 37°C and photographed. Data shown is representative of three biological replicates.

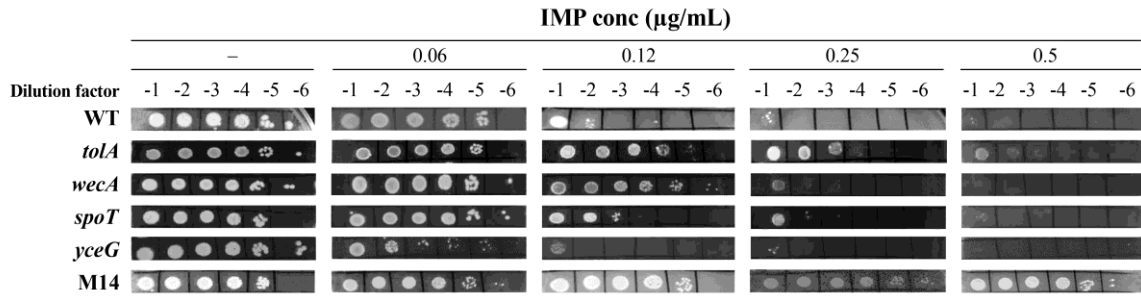


Figure 4. Validation of the role of WecA and SpoT in IMP susceptibility in *E. coli*. Cultures of *E. coli* ATCC 25922 WT, single knock-ins harboring TolA (M67I), WecA (R40C), SpoT (A138V) or YceG (Q92*) mutations, and *E. coli* IMP-resistant mutant M14 were serially diluted and spotted on LB-agar plates in the absence (-) or presence of imipenem (IMP) at the indicated concentrations. Plates were incubated overnight at 37°C and photographed.

Table 1. MICs of IMP for *E. coli* ATCC 25922 mutants and amino acid substitutions detected in genes mutated in at least three mutants.

Strain ^a	MIC IMP (µg/mL) ^b	Genes ID ^{c,d}												
		DR76 3827 (<i>yceG</i>)	DR76 2948	DR76 1787 (<i>amiC</i>)	DR76 1419 (<i>rpoD</i>) ^e	DR76 3839 (<i>rne</i>)	DR76 3362	DR76 1882 (<i>nlpD</i>)	DR76 689 (<i>wecA</i>)	DR76 475	DR76 727 (<i>gidA</i>)	DR76 4272 (<i>tolA</i>)	DR76 2503 (<i>slt</i>)	DR76 839 (<i>spoT</i>)
WT	0.25													
M27	0.5								G163D					
M38	0.5		P380L											
M5	1	A212T		G402R										
M6	1		P380L		A72V									
M7	1	Y274H	P380L											
M10	1					Q705*								
M16	1													
M17	1							276 Ins						
M18	1													
M19	1					R335C								
M20	1			G402R							A539V			
M24	1		P380L	A203T								A223T		
M25	1		P380L	E229K							A77T			
M28	1	W162*												
M33	1	S230L								A122V			121 ins	
M39	1		P380L	G197S										
M40	1		P380L											
M42	1													
M44	1						D113N			P101S				
M46	1		P380L											
M49	1		P380L					D321G						
M50	1	P281S	P380L	Q353*										
M1	2	E224K				Q692*								
M2	2	M1I								A254V				
M3	2	T273I				Q775*								
M4	2				A444V		D318A		G45R					
M8	2		P380L										W455*	
M9	2							276 Ins						
M11	2	W156*				P250L Q691*						M67I		
M12	2				A444T				R40C					
M13	2				I457L				D159N					
M15	2	Q92*												
M21	2										R204C			
M22	2		P380L					342 Del						
M23	2		D376N		A444V									
M29	2	P246L					A429T							
M30	2	T273I												
M31	2	289 Ins												
M32	2	Q92*												P168S
M34	2	P246L					A429T							
M35	2	W24*				Q649*								
M36	2						D113N			P101S				
M37	2	W193*								A149V				
M41	2			Q57*										
M43	2				A444V									
M45	2			R102C	A444V							G316E		
M47	2	Q92*								V102M				
M48	2	E107K					A259V	Q161*						
M14	4	S230L	P380L	Q15*									R475*	A138V
M26	4				A444T				G51E					

^a Mutants are listed in ascending order of MIC to IMP.

^b MICs were monitored with at least three biological replicates.

^c Mutations correspond to amino acid substitutions and numbers refer to amino acid position in the protein. In the case of small insertions (Ins) or deletions (Del), the number indicated refers to the nucleotide position at which these occurred in the gene. Asterisks denote stop codons.

^d Mutations in bold have been functionally tested for their role in resistance to IMP by individual transformation in *E. coli* ATCC 25922 (see Table 4).

^e The *kan* resistance marker was removed from all transformants using the FLP/FLPe recombinase except for *rpoD*.

Table 2. MICs of IMP for *P. aeruginosa* ATCC 27853 mutants and amino acid substitutions detected in genes mutated in more than one mutant.

Strains ^a	MIC IMP ($\mu\text{g/mL}$) ^b	Gene ID ^c				
		A4W92_06800 (<i>oprD</i>)	A4W92_13070 (sensor HK) ^d	A4W92_13065 (response regulator)	A4W92_04840 (sensor HK) ^d	A4W92_05675 (<i>phoQ</i>)
WT	2					
M2	4	G183D				
M44	8	S325F				
M13	8	G402D				
M31	8			A174V		
M35	8			A174V		
M40	8			A174V		
M47	8			M53V		
M36	8					E198K
M8	8		A252V			
M39	8		A252V			
M23	8		G260D			
M30	8		G260D			
M43	8		G260D			
M37	8		V268M			
M28	8		S285F			
M25	8		L303F			
M1	8		R419H			
M3	8		R419H			
M11	16		R419H			
M5	16		A252V			Q258*
M12	16		E291K			
M14	16		E291K			
M16	16		E291K			
M6	16				R419H	
M9	16				R419H	
M4	16	W6*				
M10	16	W6*				
M18	16	W6*				
M22	16	W6*				
M33	16	W6*				
M26	16	Q19*				
M32	16	Q19*				
M29	16	Q30*				
M17	16	W65*				
M20	16	Q67*				
M48	16	Q67*				
M38	16	Q79*				
M24	16	W138*				
M27	16	W138*				
M45	16	W138*				
M46	16	W138*				
M7	16	Q158*				
M50	16	Q158*				
M42	16	Q235*				
M21	16	W277*				
M41	16	Q295*				
M19	16	Q296*				
M15	16	W339*				
M34	16	Y343N				
M49	16	W415*				

^a Mutants are listed in ascending order of MIC of IMP and grouped by mutation profiles.

^b MICs were monitored with at least three biological replicates.

^c Mutations correspond to amino acid substitutions and numbers refer to amino acid position in the protein. Asterisks denote stop codons.

^d HK, histidine kinase.

Table 3. COG categories and functional descriptions with genes mutated in at least two mutants of *E. coli* and *K. pneumoniae*.

COG category	COG description	Function	Gene ID ^a		Gene Symbol ^b
			<i>E. coli</i> ^{b,c}	<i>K. pneumoniae</i> ^b	
C	COG4656	Na ⁺ -translocating ferredoxin:NAD ⁺ oxidoreductase RNF	DR76_3209 (2)	DR88_4075 (2)	<i>RnfC</i>
			DR76_1590 (2)	-	<i>NanT</i>
G	COG2814	Predicted arabinose efflux permease	DR76_1762 (2)	-	-
			DR76_4561 (2)	-	<i>araJ</i>
			-	DR88_690 (3)	-
J	COG0445	tRNA U34 5-carboxymethylaminomethyl modifying enzyme MnmG/GidA	DR76_727 (4)	DR88_3339 (2)	<i>gidA</i>
	COG0215	CysteinyI-tRNA synthetase	DR76_4436 (2)	DR88_4524 (3)	<i>cysS</i>
L	COG0847	DNA polymerase III	DR76_3797 (2)	DR88_1301 (2)	-
M	COG0860	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	DR76_1787 (9)	DR88_2369 (26)	<i>amiC</i>
	COG1388	LysM repeat	DR76_1882 (5)	DR88_2261 (18)	<i>nlpD</i>
	COG0472	UDP-N-acetylmuramyl pentapeptide phosphotransferase/UDP-N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase	DR76_689 (5)	DR88_3479 (5)	<i>wecA</i>
	COG0741	Soluble lytic murein transglycosylase	DR76_2503 (3)	DR88_109 (2)	<i>slt</i>
	COG0438	Glycosyltransferase involved in cell wall biosynthesis	DR76_4781 (3) DR76_1541 (2)	- - DR88_1607 (3)	- - -
NW	COG3188	Outer membrane usher protein FimD/PapC	DR76_1626 (2)	-	<i>papC</i>
			DR76_2428 (2)	-	<i>fimD</i>
			DR76_3348 (3)	-	<i>fimD</i>
			DR76_3932 (3)	-	<i>fimD</i>
			-	DR88_2135 (2)	<i>fimD</i>
			-	DR88_3815 (2)	-
			-	DR88_397 (2)	<i>StfC</i>
P	COG4773	Outer membrane receptor for ferric coprogen and ferric-rhodotorulic acid	DR76_3822 (2)	-	<i>fhuE</i>
			-	DR88_4364 (2)	-
Q	COG1020	Non-ribosomal peptide synthetase component F	DR76_2812 (2)	DR88_1541 (15)	<i>clbJ</i>
R	COG2373	Uncharacterized conserved protein YfaS	DR76_408 (2)	DR88_2018 (2)	-
	COG0612	Predicted Zn-dependent peptidase	DR76_3359 (3)	DR88_3068 (3)	-
S	COG1649	Uncharacterized lipoprotein YddW	DR76_3362 (6)	DR88_3813 (3)	-
TK	COG0317	(p)ppGpp synthase/hydrolase	DR76_839 (2)	DR88_3198 (2)	<i>spoT</i>
			DR76_4821 (7)	-	<i>MdtB</i>
V	COG0841	Multidrug efflux pump subunit AcrB	DR76_4822 (2)	-	<i>MdtC</i>
			-	DR88_665 (2)	-
			-	DR88_584 (2)	<i>acrB</i>

^a Genes accessions are indicated for *E. coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* ATCC 13883. The number of mutants in which the genes was found mutated is indicated within parentheses.

^b Genes in bold represent orthologues sharing at least 70% of sequence identity at the protein level.

^c Genes in italic have been functionally tested for their role in resistance to IMP by individual transformation in *E. coli* ATCC 25922 WT (see Table 4).

Table 4. Functional validation of mutation detected in *E. coli* IMP-resistant mutants.

Single knock-in ^a					
Gene ID ^b	Gene Symbol	Source ^c	Mutation		MIC of IMP (µg/mL) ^d
			Nucleotide	Amino acid	
DR76_475	-	M2	G761A	A254V	0.25
DR76_689	<i>wecA</i>	M12	G118A	R40C	0.25-0.5
DR76_727	<i>gidA</i>	M20	C1616T	A539V	0.25
DR76_839	<i>spoT</i>	M14	G413A	A138V	0.25-0.5
DR76_1419 ^e	<i>rpoD</i>	M23	G1331A	A444V	1
DR76_1787	<i>amiC</i>	M20	G1204A	G402R	0.5
DR76_1882	<i>nlpD</i>	M48	C481T	Q161*	0.5
DR76_2503	<i>slt</i>	M14	C1423T	R475*	0.5
DR76_2948	-	M50	C1139T	P380L	0.25
DR76_3362	-	M29	G1285A	A429T	0.25
DR76_3827	<i>yceG</i>	M15	G274A	Q92*	0.25
DR76_3839	<i>rne</i>	M3	C2323T	Q775*	0.5
DR76_4272	<i>tolA</i>	M11	C201T	M67I	0.5
Double knock-in ^a					
Gene 1	Amino acid mutation	Gene 2	Amino acid mutation		MIC of IMP (µg/mL)
		<i>slt</i>	R475*		1
<i>amiC</i>	G402R	<i>yceG</i>	Q92*		0.5
		<i>gidA</i>	A539V		0.5

^a Single knock-in: Mutations in genes were transformed in an individual fashion. Double knock-in: Mutations in two genes were transformed into the same *E. coli* ATCC 25922 cells.

^b Genes in bold had mutations in at least two *E. coli* and *K. pneumoniae* mutants (see Table 3). The gene in italic was mutated in *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*.

^c The mutant whose genomic DNA was used to amplify the mutation by PCR to generate the knock-in cassettes.

^d MICs were monitored with at least three biological replicates

^e The *kan* resistance marker was removed from all transformants using the FLP/FLPe recombinase except for *rpoD*.

Table S1. MICs of IMP for *K. pneumoniae* ATCC 13883 mutants and amino acid substitutions detected in genes shared with *E. coli* mutants.

Strains ^a	Gene ID	DR88_2369	DR88_2261	DR88_3479	DR88_3813	DR88_109	DR88_3339	DR88_3198
	Gene Symbol	<i>amiC</i>	<i>nlpD</i>	<i>wecA</i>	-	<i>slt</i>	<i>gidA</i>	<i>spoT</i>
	MIC (µg/mL) ^b	Amino acid substitutions ^c						
WT	1							
M1	2	P194L						
M2	2							
M3	2		Q90*					
M4	2	G205E						
M5	2			W129*				
M7	2	P194L						
M8	2	R238C						
M10	2	R249C						
M11	2		Q154*					
M12	2		Q140*					
M13	2	Q119*						
M14	2	P368L						
M15	2	E373K						
M16	2	T328I						
M17	2	Q254*				R376*		
M18	2		W259*					
M19	2		W259*					
M20	2		W129*					
M21	2	G402E						
M22	2		W129*		P22S			D667N
M24	2		R363H					
M25	2	G336E		H282				
M27	2		Q80*					
M29	2	G198S			W346*			
M30	2	Q392*						
M31	2	G197S						
M32	2		R363H					
M33	2		Q154*				L297F	
M34	2		Q67*					
M35	2		Q174*					
M36	2	W21*						
M37	2	Q254*						
M38	2	Q325*						
M39	2	G336E						
M40	2		R363C					
M41	2	G18D						
M42	2		Q65*					
M43	2	S263L						
M44	2		W129*					
M45	2	R238C						
M6	4	D149N	W259*					
M9	4	P365S		G52D				
M23	4	G195R		A302T				
M26	4		S368F	P48L	V366M	A152V		
M28	4	Q169*					R256C	P298L

^a Mutants are listed in ascending order of MIC to IMP.

^b MICs were monitored with at least three biological replicates.

^c Mutations correspond to amino acid substitutions and numbers refer to amino acid position in the protein. Asterisks denote stop codons.

Table S8. Strains and plasmids used in this study

Strain_number	Species	MIC of IMP ($\mu\text{g/mL}$) ^a	MIC of EMS (g/mL) ^a	Source
ATCC 13883	<i>K. pneumoniae</i>	1	0.006	Kindly provided by Dr Michel G. Bergeron
ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i>	2	0.003	
ATCC 25922	<i>E. coli</i>	0.25	0.006	ATCC
Plasmids	Resistance marker			
pRedET	Tetracycline			Gene Bridges GmbH
707-Flpe				
pGem ®-T Easy	Ampicillin			Promega

^a MICs were monitored with at least three biological replicates.

Table S9. Primers used to generate the single and double knock-ins

Gene ID	Gene Symbol	Mutant Source of the mutated PCR fragment	Nucleotide substitution	Primers	5'-3'
FRT-scar downstream of the gene					
DR76_475	NA	M2	G761A	Frd_DR76_475 Rv_DR76_475_Kan Frd_DR76_475_Kan Rv_Up_475_Kan Frd_DR76_475_seq Rv_DR76_475_seq	ATGGCTACCAAACCTGCAGGACGGGAA CGCCCTTAGTGAGGGTTAATTT CAATCTAAAACTGCCAGTTTTTCGAGC GCTCGAAAACTGGCAGTTTTAGATTGAAATTA ACCCTCACTAAAGGGCG TTTCTAACCCGCGCAACATTC AACCAAATA ATACGACTCACTATAGGGCTC CGCCGTTGTTACGCCGTGCT CCGTATCTTCGAGTGCCACACA
DR76_727	<i>gidA</i>	M20	C1616T	Frd_DR76_727 Rv_DR76_727_Kan Frd_DR76_727_Kan Rv_Up_727_Kan Frd_DR76_727_seq Rv_DR76_727_seq	CGAGGCAATCACCATGTTTTATCCGG CGCCCTTAGTGAGGGTTAATTT TATGCGCTACGACGCAGCATACCTGT ACAGGGTATGCTGCGTCGTAGCGCATAAAATTA ACCCTCACTAAAGGGCG GGGTGCATACCAGGCATTTTTAATGCGTA ATACGACTCACTATAGGGCTC CCCAGGTCTTTCTCAAGCCGACA AGGAGAGTTTGTGAGCACGGTGA
DR76_1787	<i>amiC</i>	M20	G1204A	Frd_DR76_1787 Rv_DR76_1787_Kan Frd_DR76_1787_Kan Rv_Up_1787_Kan Frd_DR76_1787_seq Rv_DR76_1787_seq	CAGCTTAGATTCTTTTGTCTCGGGAGAGGC CGCCCTTAGTGAGGGTTAATTT TATCCCTTCTCGCCAGCGTCGCCCATC GATGGGGCGACGCTGGCGAGAAGGGGATAAAATTA ACCCTCACTAAAGGGCG AAATATAAATTCATTGAATAAATAAAAA ACAATAACGACTCACTATAGGGCTC TCCCTCGACCAGCTCGGTTT TGCGTATACATTACACGGAAATTGTGCT
DR76_1882	<i>nlpD</i>	M48	C481T	Frd_DR76_1882 Rv_DR76_1882_Kan Frd_DR76_1882_Kan Rv_Up_1882_Kan Frd_DR76_1882_seq Rv_DR76_1882_seq	GGTATTAACCAATTTTTCTCGGGGATAA CGCCCTTAGTGAGGGTTAATTT ATCGCTGCGCAAATAACGCAGCGGGTT AACCCGCTGCGTTATTTGCCGACGCGATAAAATTA ACCCTCACTAAAGGGCG ACATTCAAGCAAAGCCTGGTTCCGCCGATTA ATACGACTCACTATAGGGCTC TGACGCAGCTGGACGAAGGC GCCTTTTCGTCAAAAACCTCAACTCCG
DR76_2503	<i>slt</i>	M14	C1423T	Frd_DR76_2503 Rv_DR76_2503_Kan Frd_DR76_2503_Kan Rv_Up_2503_Kan Frd_DR76_2503_seq Rv_DR76_2503_seq	ACCCTAATACGGTACTGACCTTCGCGC CGCCCTTAGTGAGGGTTAATTT CAGTAACGACGTCCCCATTCCTGGCG CGCCACGGAATGGGGACGTCGTTACTGAAATTA ACCCTCACTAAAGGGCG TACGATAGCATATCATAAACGTGCGGATA ATACGACTCACTATAGGGCTC CGGCGGAACAACCTTTCGCGA CGGTAATGGAGATCGTTTTGGTAGGC
DR76_2948	NA	M50	C1139T	Frd_DR76_2948 Rv_DR76_2948_Kan Frd_DR76_2948_Kan Rv_Up_2948_Kan Frd_DR76_2948_seq Rv_DR76_2948_seq	CAGGAGTGATGACTATGAGTCGTTAGTCGTAG CGCCCTTAGTGAGGGTTAATTT CTACGCAAGCTTAGGAAAGGTAGCAACT AGTTGCTACCTTCTTAAGCTTGCGTAGAA ATTAACCCTCACTAAAGGGCG GTTCCACTTACGGGAGATTAACCGCA TAATACGACTCACTATAGGGCTC CCGCTGGGCGGAATGTCAG AGCTGCGCCGATGCTTGAAGA

(Continued on the next page)

Table S9. (Continued)

Gene ID	Gene Symbol	Mutant Source of the mutated PCR fragment	Nucleotide substitution	Primers	5'-3'
FRT-scar downstream of the gene					
DR76 3362	NA	M29	G1285A	DR76_3362_Frd Rv_DR76_3362_Kan Frd_DR76_3362_Kan Rv_Up_3362_Kan Frd_DR76_3362_seq Rv_DR76_3362_seq	ATTCATCGCTCCCTTTTTCG CGCCCTTAGTGAGGGTTAATTTAACTGCCCAACGACTTGCAGATAG CTATCTGCAAAGTCGTTGGGGCAGTTAAAA TTAACCTCACTAAAGGGCG GGCTTGTTACAAAGTAAGAATGGGAGT TAATACGACTCACTATAGGGCTC TGCCTGCCCTTTATCTCTATGCT GCGACTTAGGACAGTTTCAATCTACGC
DR76 3839	<i>rne</i>	M3	C2323T	Frd_DR76_3839 Rv_DR76_3839_Kan Frd_DR76_3839_Kan Rv_Up_3839_Kan Frd_DR76_3839_seq Rv_DR76_3839_seq	ACACCAGCCGCTCCTGCCAACCTGGG CGCCCTTAGTGAGGGTTAATTTACTCAACAGGTTGCCGACGCGCAGGA TCCTGCGCGTCCGCAACCTGTTGAGTAAA TTAACCTCACTAAAGGGCG CCAGGGCTTGATTGCTTGAGCTAATT ATAATACGACTCACTATAGGGCTC CCCAGTCTGTTTCTCTGATAATTGCGCT GCTCGCTTAAAAACATATCATGAAACTGGG
FRT-scar upstream of the gene					
DR76 689	<i>wecA</i>	M12	G118A	Frd_Kan_dn_DR76_689 Rv_Kan_DR76_689 Frd_Kan_DR76_689 Rv_DR76_689 Frd_DR76_689_seq Rv_DR76_689_seq	TGCTAATAATTTCTCTGAGAGCATGCATTA TTAACCTCACTAAAGGGCG ATCAGTACTCACTGTCAGTAAAT CTACTAATACGACTCACTATAGGGCTC GAGCCCTATAGTGAGTCGATT AGTGAATTTACTGACAGTGAGTACTGAT TTATTTGGTTAAATTTGGGGCTGCCACC TGCTGCGCTGGCGATGTTAGG TCGAGCTCCACTCCTGGCGA
DR76 839	<i>spoT</i>	M14	G413A	Frd_Kan_dn_DR76_839 Rv_Kan_DR76_839 Frd_Kan_DR76_839 Rv_DR76_839 Frd_DR76_839_seq Rv_DR76_839_seq	GGTCGTCGTTAATCACAAAGCGGGTCCGCCA TTAACCTCACTAAAGGGCG CTGATTCAGGCTTTCAAACAGATACAATA ATACGACTCACTATAGGGCTC GAGCCCTATAGTGAGTCGATT ATTGTATCTGTTTGAAGGCTGAATCAG CACGCGCATTCGGGCGAGCA AGGCGGAAAGGATCCGCTGG GTACGCCAACGGCATCTGCG
DR76 3827	<i>yceG</i>	M15	G274A	Frd_Kan_dn_DR76_3827 Rv_Kan_DR76_3827 Frd_Kan_DR76_3827 Rv_DR76_3827 Frd_DR76_3827_seq Rv_DR76_3827_seq	CCACTTTGTGAGCGCCGAATTAGTCA TTAACCTCACTAAAGGGCG CAAGATTATCAATAACACTTTTTT CATTAATACGACTCACTATAGGGCTC GAGCCCTATAGTGAGTCGATT AATGAAAAAGTGTTATTGATAATCTTG TTACTGCGCATTTTTTTCCTTAAGCACTTTCAG ACGGAATGCTGTGCGGCTAAT TCGGCAAGTTGCGTACCGCC

(Continued on the next page)

Table S9. (Continued)

Gene ID	Gene Symbol	Mutant Source of the mutated PCR fragment	Nucleotide substitution	Primers	5'-3'
FRT-scar upstream of the gene					
DR76 4272	<i>tolA</i>	M11	C201T	Frd_Kan_dn_DR76_4272 Rv_Kan_DR76_4272 Frd_Kan_DR76_4272 Rv_DR76_4272 Frd_DR76_4272_seq Rv_DR76_4272_seq	TAACAGGCGAACAGTTTTGGAAACCGAGAAATTAACCCCTACTAAAGGGC G GTCGTTTTGTTTCGGTTGCCTTGACACTAATACGACTACTATAGGGCTC GAGCCCTATAGTGAGTCGTATTAGTGTCAAAGGCAACCGAACAAAACGAC TTACGGTTTGAAGTCCAATGGCGCG CACCAGAGCAGGTGGTGGCG GGCCCCGCCCACTGAAAAG
FRT-flanked PGK-gb2-kan cassette downstream of the gene					
DR76 1419	<i>rpoD</i>	M23	G1331A	Frd_DR76_1419 Rv_DR76_1419_kan Frd_DR76_1419_Kan Rv_Up_1419_Kan Frd_DR76_1419_seq Rv_DR76_1419_seq	TAAGTGTGGATACCGTCTTATGGAGCAAAA CGCCCTTAGTGAGGGTTAATTTAATCGTCCAGGAAGCTACGCAGCACT AGTGCTGCGTAGCTTCTGGACGATTAATAACCCCTACTAAAGGGCG GGCGTAACACCTGATCCGGCCTACCGATAATACGACTACTATAGGGCTC GCACTGAGAGGCAGCGGCAA AGGCGTTGGCGATTCTGGCG

Table S10. Accession numbers of *E. coli* mutants in the SRA database

Mutant Name	Sample Name	Accession
Ecoli_ATCC 25922_WT	Ecoli_ATCC25922	SAMN12187485
M1	Ecoli_EMS_IMP_8X_1	SAMN12187486
M2	Ecoli_EMS_IMP_8X_2	SAMN12187487
M3	Ecoli_EMS_IMP_8X_3	SAMN12187488
M4	Ecoli_EMS_IMP_8X_4	SAMN12187489
M5	Ecoli_EMS_IMP_8X_5	SAMN12187490
M6	Ecoli_EMS_IMP_8X_6	SAMN12187491
M7	Ecoli_EMS_IMP_8X_7	SAMN12187492
M8	Ecoli_EMS_IMP_8X_8	SAMN12187493
M9	Ecoli_EMS_IMP_8X_9	SAMN12187494
M10	Ecoli_EMS_IMP_8X_10	SAMN12187495
M11	Ecoli_EMS_IMP_8X_11	SAMN12187496
M12	Ecoli_EMS_IMP_8X_12	SAMN12187497
M13	Ecoli_EMS_IMP_8X_13	SAMN12187498
M14	Ecoli_EMS_IMP_8X_14	SAMN12187499
M15	Ecoli_EMS_IMP_8X_15	SAMN12187500
M16	Ecoli_EMS_IMP_8X_16	SAMN12187501
M17	Ecoli_EMS_IMP_8X_17	SAMN12187502
M18	Ecoli_EMS_IMP_8X_18	SAMN12187503
M19	Ecoli_EMS_IMP_8X_19	SAMN12187504
M20	Ecoli_EMS_IMP_8X_20	SAMN12187505
M21	Ecoli_EMS_IMP_8X_21	SAMN12187506
M22	Ecoli_EMS_IMP_8X_22	SAMN12187507
M23	Ecoli_EMS_IMP_8X_23	SAMN12187508
M24	Ecoli_EMS_IMP_8X_24	SAMN12187509
M25	Ecoli_EMS_IMP_8X_25	SAMN12187510
M26	Ecoli_EMS_IMP_8X_26	SAMN12187511
M27	Ecoli_EMS_IMP_8X_27	SAMN12187512
M28	Ecoli_EMS_IMP_8X_28	SAMN12187513
M29	Ecoli_EMS_IMP_8X_29	SAMN12187514
M30	Ecoli_EMS_IMP_8X_30	SAMN12187515
M31	Ecoli_EMS_IMP_8X_31	SAMN12187516
M32	Ecoli_EMS_IMP_8X_32	SAMN12187517
M33	Ecoli_EMS_IMP_8X_33	SAMN12187518
M34	Ecoli_EMS_IMP_8X_34	SAMN12187519
M35	Ecoli_EMS_IMP_8X_35	SAMN12187520
M36	Ecoli_EMS_IMP_8X_36	SAMN12187521
M37	Ecoli_EMS_IMP_8X_37	SAMN12187522
M38	Ecoli_EMS_IMP_8X_38	SAMN12187523
M39	Ecoli_EMS_IMP_8X_39	SAMN12187524
M40	Ecoli_EMS_IMP_8X_40	SAMN12187525
M41	Ecoli_EMS_IMP_8X_41	SAMN12187526
M42	Ecoli_EMS_IMP_8X_42	SAMN12187527
M43	Ecoli_EMS_IMP_8X_43	SAMN12187528
M44	Ecoli_EMS_IMP_8X_44	SAMN12187529
M45	Ecoli_EMS_IMP_8X_45	SAMN12187530
M46	Ecoli_EMS_IMP_8X_46	SAMN12187531
M47	Ecoli_EMS_IMP_8X_47	SAMN12187532
M48	Ecoli_EMS_IMP_8X_48	SAMN12187533
M49	Ecoli_EMS_IMP_8X_49	SAMN12187534
M50	Ecoli_EMS_IMP_8X_50	SAMN12187535

Table S11. Accession numbers of *K. pneumoniae* mutants in the SRA database

Mutant_Name	Sample Name	Accession
<i>K. pneumoniae</i> _ATCC 13883_WT	K_pneumoniae_WT	SAMN12187837
M1	Klebsiella_EMS_IMP_4X_1	SAMN12187536
M2	Klebsiella_EMS_IMP_4X_2	SAMN12187537
M3	Klebsiella_EMS_IMP_4X_3	SAMN12187538
M4	Klebsiella_EMS_IMP_4X_4	SAMN12187539
M5	Klebsiella_EMS_IMP_4X_5	SAMN12187540
M6	Klebsiella_EMS_IMP_4X_6	SAMN12187541
M7	Klebsiella_EMS_IMP_4X_7	SAMN12187542
M8	Klebsiella_EMS_IMP_4X_8	SAMN12187543
M9	Klebsiella_EMS_IMP_4X_9	SAMN12187544
M10	Klebsiella_EMS_IMP_4X_10	SAMN12187545
M11	Klebsiella_EMS_IMP_4X_11	SAMN12187546
M12	Klebsiella_EMS_IMP_4X_12	SAMN12187547
M13	Klebsiella_EMS_IMP_4X_13	SAMN12187548
M14	Klebsiella_EMS_IMP_4X_14	SAMN12187549
M15	Klebsiella_EMS_IMP_4X_15	SAMN12187550
M16	Klebsiella_EMS_IMP_4X_16	SAMN12187551
M17	Klebsiella_EMS_IMP_4X_17	SAMN12187552
M18	Klebsiella_EMS_IMP_4X_18	SAMN12187553
M19	Klebsiella_EMS_IMP_4X_19	SAMN12187554
M20	Klebsiella_EMS_IMP_4X_20	SAMN12187555
M21	Klebsiella_EMS_IMP_4X_21	SAMN12187556
M22	Klebsiella_EMS_IMP_4X_22	SAMN12187557
M23	Klebsiella_EMS_IMP_4X_23	SAMN12187558
M24	Klebsiella_EMS_IMP_4X_24	SAMN12187559
M25	Klebsiella_EMS_IMP_4X_25	SAMN12187560
M26	Klebsiella_EMS_IMP_4X_26	SAMN12187561
M27	Klebsiella_EMS_IMP_4X_27	SAMN12187562
M28	Klebsiella_EMS_IMP_4X_28	SAMN12187563
M29	Klebsiella_EMS_IMP_4X_29	SAMN12187564
M30	Klebsiella_EMS_IMP_4X_30	SAMN12187565
M31	Klebsiella_EMS_IMP_4X_31	SAMN12187566
M32	Klebsiella_EMS_IMP_4X_32	SAMN12187567
M33	Klebsiella_EMS_IMP_4X_33	SAMN12187568
M34	Klebsiella_EMS_IMP_4X_34	SAMN12187569
M35	Klebsiella_EMS_IMP_4X_35	SAMN12187570
M36	Klebsiella_EMS_IMP_4X_36	SAMN12187571
M37	Klebsiella_EMS_IMP_4X_37	SAMN12187572
M38	Klebsiella_EMS_IMP_4X_38	SAMN12187573
M39	Klebsiella_EMS_IMP_4X_39	SAMN12187574
M40	Klebsiella_EMS_IMP_4X_40	SAMN12187575
M41	Klebsiella_EMS_IMP_4X_41	SAMN12187576
M42	Klebsiella_EMS_IMP_4X_42	SAMN12187577
M43	Klebsiella_EMS_IMP_4X_43	SAMN12187578
M44	Klebsiella_EMS_IMP_4X_44	SAMN12187579
M45	Klebsiella_EMS_IMP_4X_45	SAMN12187580

Table S12. Accession numbers of *P. aeruginosa* mutants in the SRA database

Mutant_Name	Sample Name	Accession
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853_WT	P_aeruginosa_WT	SAMN12187838
M1	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_1	SAMN12187597
M2	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_2	SAMN12187598
M3	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_3	SAMN12187599
M4	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_4	SAMN12187600
M5	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_5	SAMN12187601
M6	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_6	SAMN12187602
M7	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_7	SAMN12187603
M8	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_8	SAMN12187604
M9	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_9	SAMN12187605
M10	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_10	SAMN12187606
M11	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_11	SAMN12187607
M12	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_12	SAMN12187608
M13	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_13	SAMN12187609
M14	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_14	SAMN12187610
M15	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_15	SAMN12187611
M16	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_16	SAMN12187612
M17	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_17	SAMN12187613
M18	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_18	SAMN12187614
M19	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_19	SAMN12187615
M20	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_20	SAMN12187616
M21	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_21	SAMN12187617
M22	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_22	SAMN12187618
M23	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_23	SAMN12187619
M24	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_24	SAMN12187620
M25	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_25	SAMN12187621
M26	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_26	SAMN12187622
M27	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_27	SAMN12187623
M28	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_28	SAMN12187624
M29	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_29	SAMN12187625
M30	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_30	SAMN12187626
M31	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_31	SAMN12187627
M32	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_32	SAMN12187628
M33	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_33	SAMN12187629
M34	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_34	SAMN12187630
M35	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_35	SAMN12187631
M36	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_36	SAMN12187632
M37	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_37	SAMN12187633
M38	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_38	SAMN12187634
M39	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_39	SAMN12187635
M40	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_40	SAMN12187636
M41	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_41	SAMN12187637
M42	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_42	SAMN12187638
M43	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_43	SAMN12187639
M44	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_44	SAMN12187640
M45	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_45	SAMN12187641
M46	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_46	SAMN12187642
M47	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_47	SAMN12187643
M48	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_48	SAMN12187644
M49	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_49	SAMN12187645
M50	Pseudomonas_EMS_IMP_4X_50	SAMN12187646

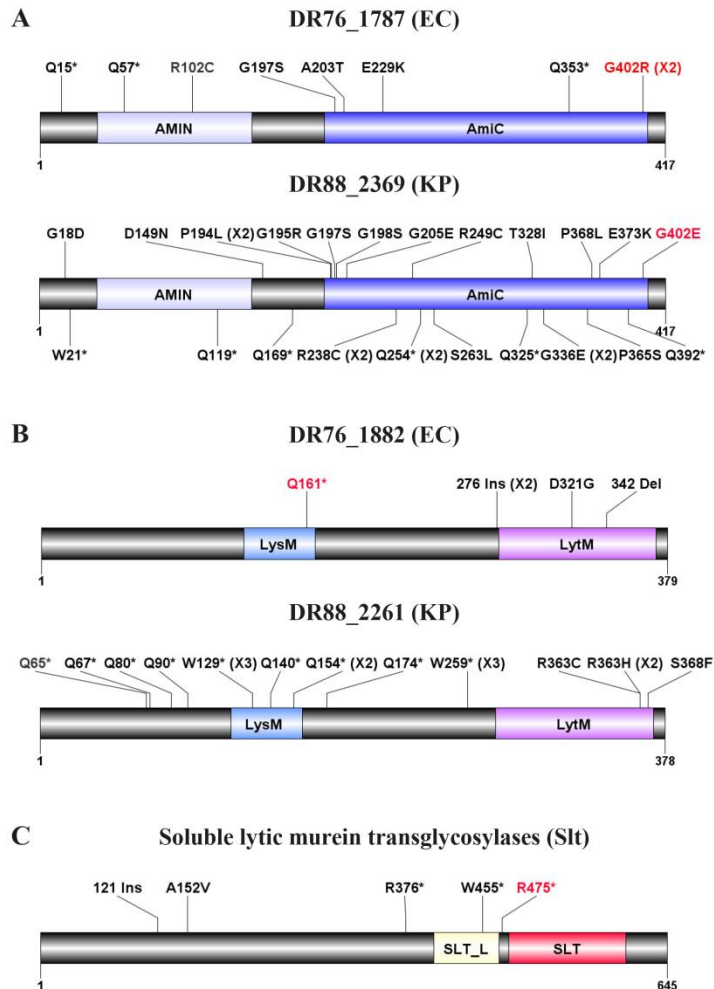


Figure S1. Schematic presentation of the domains of (A) AmiC (DR76_1787, DR88_2639), (B) NlpD (DR76_1882, DR88_2261), (C) Slt and their respective mutations in *E. coli* and *K. pneumoniae*.

The Pfam protein families database was used to determine the domains of each proteins and the software DOG2.0 was used for the visualization of the protein domain structures. Mutations marked in red are the one used to generate the single knock-in. Numbers between parentheses indicate the recurrence of the mutation occurring more than once. For Slt (C), the scheme represents the protein in *E. coli* (EC) (121 Ins, W455* and R475*) and *K. pneumoniae* (KP) (A152V, R376*).

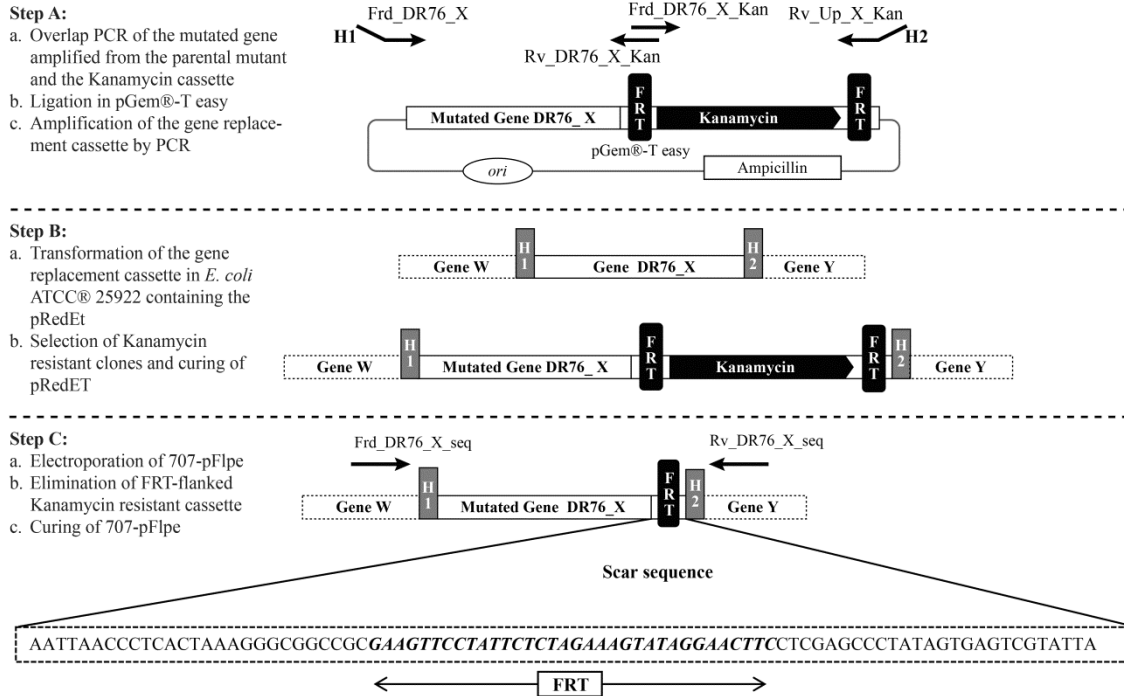


Figure S2. Gene replacement by recombineering. This strategy was previously described by Sukhija *et al.* and Pyne M *et al.* (1,2).

References

- Sukhija K, Pyne M, Ali S, Orr V, Abedi D, Moo-Young M, Chou CP. 2012. Developing an extended genomic engineering approach based on recombineering to knock-in heterologous genes to Escherichia coli genome. *Mol Biotechnol* 51:109-18.
- Pyne ME, Moo-Young M, Chung DA, Chou CP. 2015. Coupling the CRISPR/Cas9 System with Lambda Red Recombineering Enables Simplified Chromosomal Gene Replacement in Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol* 81:5103-14.

Chapitre 9 – Discussion générale

« Pour chaque fin il y a toujours un nouveau départ »

Antoine de Saint-Exupéry (1900 – 1944)

9.1. Réponse transcriptomique de *S. pneumoniae* à la pénicilline

Dans la première partie de cette thèse, nous avons utilisé la technique de l'ARN-Seq pour évaluer les conséquences métaboliques d'une exposition à la PEN chez *S. pneumoniae*. La capacité de *S. pneumoniae* à être transformée naturellement et d'acquérir ainsi de l'ADN exogène produit un taux élevé de polymorphisme au sein des souches cliniques. Par conséquent, l'effet du temps d'exposition à une concentration de la PEN correspondant à la CMI sur l'expression des gènes a été évalué chez la souche non capsulée *S. pneumoniae* R6 (dérivée de *S. pneumoniae* D39) ainsi que chez deux souches cliniques sensibles CCRI-8970 et CCRI-21487. Afin de faciliter la comparaison entre les souches et de diminuer l'effet du rythme de croissance bactérien, les deux souches cliniques ont été sélectionnées en fonction de leurs profils de croissance et de sensibilité à la PEN, comparativement similaires à ceux de *S. pneumoniae* R6. Afin de standardiser les résultats entre les différentes souches, les temps d'exposition ont été choisis en fonction du taux de survie cellulaire (~85% (T1), ~70% (T2) et ~50% (T3)). En outre, la réponse transcriptomique à une augmentation croissante de la concentration de la PEN a été évaluée suite à l'exposition de *S. pneumoniae* R6 à 0.5X CMI, 1X CMI, 5X CMI et 10X CMI pour 15 minutes. Malgré ces considérations, les réponses transcriptomiques des trois souches à la suite du traitement par la PEN ont été différentes. En considérant le nombre élevé de gènes dont l'expression a été significativement modulée en présence de l'antibiotique chez chacune des trois souches (Chap.7, Tableaux 1, S1 et S2), l'expression uniquement de huit gènes a été modulée d'une manière commune aux trois souches (Chap.7, Tableau 3).

9.1.1. La pénicilline et le métabolisme de la glutamine

De façon intéressante, les opérons *glnRA* et *glnPQ* ont été sous-exprimés chez les deux isolats cliniques et chez *S. pneumoniae* R6 peu importe le modèle expérimental utilisé chez cette dernière (Chap.7, Tableaux 1, 2 et 3). En fait, le régulateur transcriptionnel GlnR induit la répression transcriptionnelle de son propre opéron *glnRA* (spr0443, spr0444), celles de l'opéron *glnPQ-zwf* (spr1120-1121 et spr1122) et du gène *gdhA* (spr1181) en se liant à une séquence d'opérateur conservée (295) (Figure 12). Le gène *glnA* code pour la glutamine synthétase GlnA qui convertit le glutamate et l'ammonium en glutamine. De plus, GlnA stimule la liaison de GlnR à la séquence de son opérateur (295). Les gènes *glnPQ* codent pour le principal transporteur de la glutamine et du glutamate. Le gène *zwf* code pour la glucose-6-phosphate-1-déshydrogénase, une enzyme clé de la voie du pentose phosphate (295). L'expression de *zwf* est initiée à partir de deux promoteurs, un promoteur dépendant de GlnR en amont de *glnP* et un second promoteur dans la région intergénique *glnQ-zwf* (295). Le gène *gdhA* code pour une glutamate déshydrogénase, qui forme le glutamate à partir de 2-oxoglutarate et d'ammonium. L'expression de ce gène est également sous le contrôle d'une autre protéine régulatrice, CodY (295). Dans notre étude, l'expression de *zwf*, *gdhA* et *codY* n'a pas été modulée en présence de la PEN dans aucune des trois souches. Outre l'exigence de la GlnA pour la répression totale des gènes ciblés par GlnR, ce dernier est également sensible aux fortes concentrations de glutamine, du glutamate et d'ammonium (Figure 12). Suite à l'exposition à la PEN des trois souches de *S. pneumoniae* étudiées, l'étude de métabolomique ciblée par LC-MS a révélé une augmentation considérable des concentrations de glutamine de 4 à 20 fois par rapport à celle des bactéries témoins non traitées, ainsi qu'une augmentation modérée (2 à 4 fois) du taux du glutamate par rapport aux bactéries non traitées au même moment (Chap.7, Figure 2). L'utilisation d'un milieu chimiquement défini nous permettrait de connaître plus précisément les concentrations de glutamine dans nos expériences. En fait, nous avions l'intention d'utiliser le milieu C+Y pour l'expérience de LC-MS, mais malheureusement les conditions expérimentales étaient trop différentes pour faire une comparaison entre les données transcriptomiques, obtenues en utilisant le milieu BHI, et les données métabolomiques. Ainsi nous avons choisi de conserver le milieu BHI afin de minimiser les biais pouvant provenir du milieu de culture.

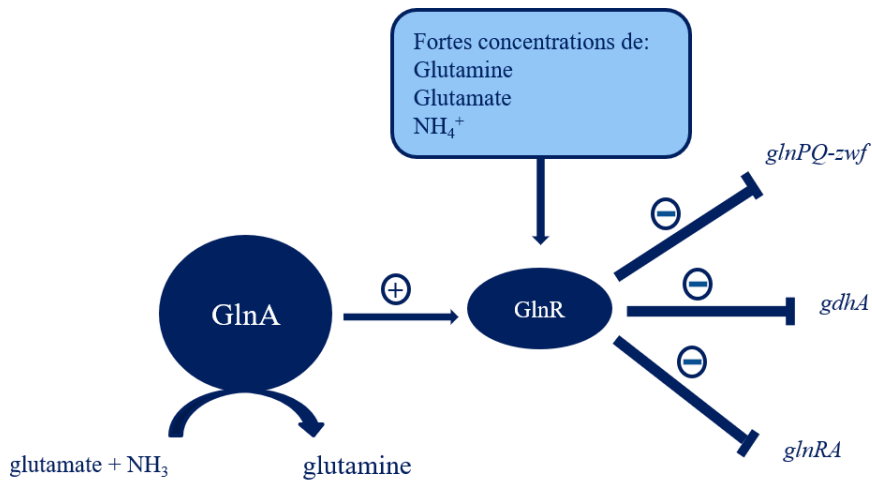


Figure 12. Le régulon GlnR de *S. pneumoniae*

GlnR régule l'expression des opérons *glnRA* et *glnPQ-zwf* ainsi que celle du gène *gdhA*. La répression de l'expression de ces gènes par GlnR est sensible aux fortes concentrations de glutamine, du glutamate et d'ammonium. En plus, la régulation par GlnR nécessite la présence de GlnA pour une répression complète des gènes cibles. Adaptée de Hendriksen W.T. *et al*, 2008 (296)).

Le métabolisme de la glutamine joue un rôle important dans la physiologie bactérienne. En effet, la glutamine est nécessaire pour la biosynthèse d'une variété de composés contenant de l'azote et pour la synthèse des protéines (297). Une analyse génomique chez *S. pneumoniae* D39 a permis de prédire six systèmes d'absorption de la glutamine (297). Quatre de ces opérons sont formés des gènes *glnHPQ*, à l'exception de deux qui ne contiennent pas *glnH* codant pour une protéine soluble liant la glutamine. Les six systèmes sont constitués d'une perméase, la GlnP qui contient six domaines transmembranaires et d'une protéine cytoplasmique, la GlnQ qui hydrolyse l'ATP pour fournir de l'énergie au transport (297). Chez *S. pneumoniae* R6 traitée à la PEN, l'expression d'un seul de ces six opérons, le *glnHPQ* (spr1120-1121) a été modulée (Chap.7, Tableaux 1 et 2), alors que chez les deux souches cliniques CCRI-8970 et CCRI-21487, les gènes de deux opérons étaient sous-exprimés, spr1120-1121 et spr0532-0534 (Chap.7, Tableau S3).

La glutamine et le glutamate sont impliqués dans la synthèse du PG, en effet la première réaction de cette synthèse est catalysée par la GlnS qui transforme le fructose-6-phosphate en glucosamine-6-phosphate en utilisant la L-glutamine comme source d'azote qui à son tour sera transformée en L-glutamate (298). En outre, en deuxième position du pentapeptide du lipide II, le résidu D-Glu peut être amidé en un résidu D-iGln par le complexe MurT/GatD amidotransférase chez de nombreuses bactéries à Gram positif (Figure 13) (175). MurT est homologue aux ligases « Mur » qui ajoutent le fragment pentapeptide à l'UDP-NAG pour produire le précurseur cytoplasmique du PG, l'UDP-NAM-pentapeptide. GatD appartient à la glutaminase de classe I qui hydrolyse la L-Gln pour générer de l'ammoniac qui est utilisé par MurT pour l'amidation du lipide II (299). Il s'est avéré que le lipide II amidé est le substrat préféré pour la transpeptidation par les PLPs chez *S. pneumoniae* (175).

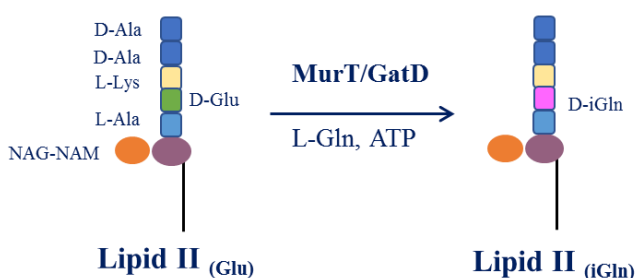


Figure 13. Schéma de la réaction d'amidation du lipide II par MurT/GatD

Adaptée de Zapun *et al.* (175).

Des études *in vitro* d'adhésion aux cellules épithéliales pharyngiennes humaines de mutants de *S. pneumoniae* dépourvus des gènes *glnA* et *glnP* et *in vivo* de la virulence chez des souris (296) ont montré que les deux gènes *glnA* et *glnP* sont importants pour la survie de *S. pneumoniae* dans le sang et les poumons, respectivement. En outre, GlnA est essentielle pour la colonisation du nasopharynx, alors que GlnP peut faciliter la transition de la bactérie des poumons vers la circulation sanguine (296), ainsi qu'un double mutant $\Delta glnAP$ devient avirulent chez des souris infectées par voie intraveineuse (296). Au cours d'infection *in vivo*, le développement d'une infection systémique chez un mutant déficient en *glnP* (*spd1098* (chez D39) ou *spr1120* (chez R6)) a été arrêté en retardant la dissémination de *S. pneumoniae* du tissu muqueux vers les poumons et le sang (297). Ceci

est probablement dû à l'incapacité de ce mutant à résister au stress oxydatif rencontré dans les macrophages, ce qui induit efficacement sa phagocytose (297).

9.1.1.1. Interprétation des observations

D'une part, la PEN inhibe l'activité des PLPs empêchant ainsi l'étape finale de la biosynthèse de la paroi cellulaire ; la réticulation du PG (288). D'autre part, une concentration élevée de glutamine active le répresseur GlnR qui à son tour réprime *glnPQ* et *glnRA* (295). Ainsi, deux cas de figures seront possibles et peuvent être sujets à des investigations futures. La première possibilité serait que l'inhibition de la synthèse du PG par la PEN pourrait aboutir à la libération de la glutamine dans le milieu intracellulaire. La deuxième possibilité serait que la PEN, en plus de cibler les PLPs, pourrait empêcher les enzymes GlnS et MurT/GatD d'utiliser leur substrat, en l'occurrence la glutamine. Dans les deux cas, ceci se traduit par une augmentation des taux de glutamine détectée par LC-MS, cette forte concentration de cet acide aminé active le répresseur GlnR, induisant une sous-expression des opérons *glnRA* et *glnPQ* détectée par l'ARN-Seq et validée par qRT-PCR (Chap.7, Figure 1). Vu l'implication de GlnA et GlnP dans la virulence, la sous-expression de leurs gènes induite par la PEN pourrait suggérer qu'en plus d'induire la mort cellulaire, la PEN atténue la virulence de *S. pneumoniae*. L'inhibition de l'activité de GlnA par L-méthionine sulfoximine (MSO) sensibilise *S. pneumoniae* à la PEN. En effet, en combinant MSO à la PEN, il y a eu une réduction de la CMI de la PEN et ce phénotype a été inversé en ajoutant de la glutamine au milieu (Chap.7, Tableau 4). Par conséquent, l'utilisation d'un adjuvant inhibant cette enzyme en bithérapie avec la PEN pourrait aider à combattre les souches résistantes en réduisant leur virulence.

9.1.2. La pénicilline et le système à deux composants CiaRH

La réponse transcriptomique de *S. pneumoniae* mesurée par puces à ADN suite à l'exposition à la vancomycine (300), à la PEN (301) ou à des peptides antimicrobiens (302) a démontré que tous ces antibiotiques induisent la surexpression du système à deux composants « CiaRH » chez des souches sensibles. Ce système est impliqué dans la

régulation de plusieurs fonctions chez *S. pneumoniae* dont la compétence, la virulence et la sensibilité aux β -lactames (303). Ceci est en corrélation avec notre étude où *ciaR* et *ciaH* étaient surexprimés au cours du temps sous la pression de la PEN (Chap.7, Tableau 1). Remarquablement, de nombreux gènes, connus pour être régulés par ce système (304), étaient sous-exprimés en présence de la PEN chez *S. pneumoniae* R6. Parmi ceux-ci, nous avons trouvé les gènes *celB*, *cglA*, *cglB*, *cglC* et *cglD* codant pour des protéines de compétence, *comX1* et *comX2* codant pour des modulateurs de transcription globaux spécifiques à la compétence, et *ssbB* codant pour une protéine de liaison à l'ADN simple brin (Chap.7, Tableau 1). Leur expression semble être affectée par la surexpression du système *ciaRH*, qui s'est produite au même moment (30 et 40 min) (Chap.7, Tableau 1). D'autres gènes tels que *orf51*, *dprA* et *acca*, connus pour être régulés par ce système, ont également été sous-exprimés, mais leur expression a diminué avant la surexpression de *ciaRH* (à 15 min) (Chap.7, Tableau 1). Il a été démontré que CiaR active 15 promoteurs (305). De nombreux gènes transcrits sous le contrôle de ces promoteurs ont été surexprimés en présence de la PEN en même temps que *ciaRH*, tels que ceux codant pour la protéine foldase PrsA, l'acétylxylane estérase Axe1, la maltodextrine phosphorylase MalP, la sérine protéase HtrA et la protéine de ségrégation des chromosomes SpoOJ (Chap.7, Tableau 1). De plus, cinq promoteurs activés par CiaR dirigent l'expression de petits ARNs non codants (305), qui à leur tour activent une série de gènes, parmi lesquels nous pourrions détecter *nirC* codant pour un transporteur de formate/nitrate (Chap.7, Tableau 1). Chez la souche CCRI-8970, l'opéron *ciaRH* a été sur-exprimé à T3 (85 min) sans pouvoir détecter une altération dans l'expression des autres gènes qu'il régule, excepté pour *sphtrA* (Chap.7, Tableau S1). L'expression de *ciaRH* n'a pas été modulée chez CCRI-21487 (Chap.7, Tableau S2). Dans le deuxième modèle expérimental étudiant la réponse transcriptomique de *S. pneumoniae* R6 à une augmentation croissante de la concentration de la PEN, l'opéron *ciaRH* n'a pas été modulé, même à la concentration la plus élevée (10X MIC) ; cela pourrait être lié à la courte durée du traitement (15 min) (Chap.7, Tableau 2). En raison de ce qui précède, des optimisations du protocole expérimental comme la prolongation du temps de traitement avant l'extraction de l'ARNm pourraient nous aider à mieux comprendre le lien entre la PEN, CiaRH et les gènes régulés par ce dernier.

9.1.3. Perspectives

Certaines expériences supplémentaires pourraient être réalisées afin d'élucider le mécanisme liant la PEN au métabolisme de la glutamine.

Notre étude de transcriptomique par ARN-Seq n'a pas montré une altération dans l'expression des gènes *glmS* (spr0245), *murT* (spr1443) et *gatD* (spr1444), ainsi une validation par qRT-PCR serait pertinente du fait que ces gènes codent pour des protéines utilisant la glutamine comme substrat.

De nombreuses stratégies permettent d'analyser le protéome des échantillons biologiques de manière efficace et fiable. La stratégie de protéomique quantitative peut être ciblée (relative ou absolue) ou globale. Cette dernière peut être réalisée avec (relative) ou sans marquage (relative ou absolue). Chacune de ces techniques représente des avantages et des inconvénients et doit être choisie selon la problématique et le nombre d'échantillons à comparer (306). Ainsi, étant donné que le niveau d'expression des ARNm ne corrèle pas toujours avec l'abondance des protéines correspondantes (216, 307), une étude protéomique globale complémentaire à notre approche transcriptomique révélera l'ensemble des protéines affectées par un traitement avec la PEN chez *S. pneumoniae*. Enfin, la réalisation d'une étude métabolomique non ciblée pourrait aider à élucider le mécanisme par lequel PEN mène à la mort cellulaire en révélant l'ampleur des altérations métaboliques qui lui sont associées.

Enfin, au cours de l'analyse bioinformatique des données de séquençage, les séquences de lecture des souches cliniques CCRI-8970 et CCRI-21487 ont été alignées au génome de référence de *S. pneumoniae* R6. Cependant, un assemblage *de novo* nous permettra d'en tirer plus d'informations des données de ces deux souches.

9.2. Étude de la résistance à l'imipénème par Mut-Seq chez trois bactéries à Gram négatif

Autant que la compréhension des principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques soit essentielle, il est aussi utile d'examiner les mécanismes de résistance secondaires et les mutations qui sont nécessaires aux bactéries pour vivre avec un génotype de résistance. D'une part, ces mutations pourraient être indispensables pour compenser un éventuel coût biologique associé à la résistance ou pourraient être nécessaire pour les adaptations physiologiques ou génétiques des bactéries en présence d'antibiotiques. D'autre part, les gènes mutés pourraient refléter le mode d'action de l'antibiotique. Nous croyons que les approches globales sont idéales pour identifier à la fois des mécanismes de résistance primaires et secondaires, ainsi que de mieux comprendre le mode d'action des antibiotiques, enfin, ceci pourrait nous mener à proposer des cibles d'adjuvants thérapeutiques potentielles. Plus spécifiquement, la résistance aux carbapénèmes chez les bactéries à Gram négatif devient de plus en plus problématique et une meilleure compréhension de ce phénomène revêt une importance cruciale. Au cours de la deuxième partie de cette thèse, nous avons appliqué un criblage chimiogénomique (159, 243, 308) combinant la mutagenèse chimique et le SNG pour obtenir des clones d'*E. coli*, de *K. pneumoniae* et de *P. aeruginosa* ayant une sensibilité réduite à l'IMP. Ainsi, en comparant les trois espèces, nous avons criblé certaines réponses partagées entre les espèces mais aussi d'autres qui étaient spécifiques à chaque espèce. Les gènes mutés les plus récurrents codés pour les protéines impliquées dans la transcription, la transduction du signal et la biogenèse de l'enveloppe membranaire (Chap.8, Figure 2 et Tableau S5). Le nombre de mutants étudiés nous a permis d'avoir une vision globale de la réponse à l'IMP et de concentrer notre travail fonctionnel sur les mutations les plus récurrentes. Comme prévu, la réponse d'*E. Coli* et de *K. pneumoniae* à l'IMP présentait plus de similitudes que celle de *P. aeruginosa* (Figure 14). Nous nous sommes concentrés sur les gènes mutés dans la plupart des mutants, mais il est fort possible que des gènes spécifiques de certains mutants soient également importants pour la réponse à l'IMP et notre ensemble de données peut être utile pour approfondir notre compréhension de la réponse à l'IMP et pour trouver des stratégies pour inverser la résistance aux carbapénèmes chez les bactéries à Gram négatif.

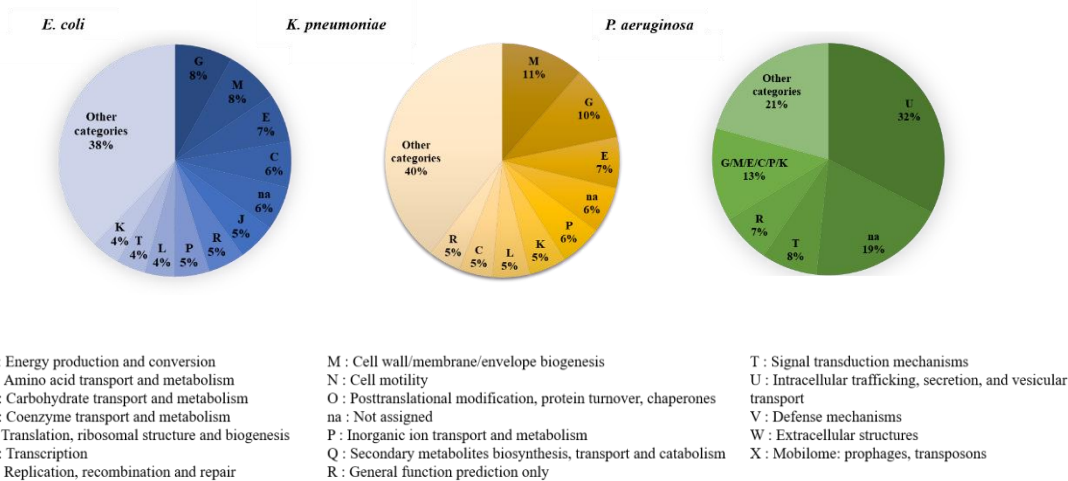


Figure 14. Pourcentage des mutations appartenant aux catégories fonctionnelles les plus récurrentes des COGs chez *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa*

9.2.1. Réponses communes aux trois espèces

La classification des COGs nous a permis de regrouper les protéines communes dont les gènes ont été mutés chez les trois espèces étudiées selon la catégorie fonctionnelle à laquelle elles appartenaient. Les deux principales catégories étaient celles des protéines jouant un rôle dans la transcription (K) et dans les mécanismes de transduction du signal (T) (Chap.8, Figure 2).

La catégorie « transcription » a été représentée par deux groupes fonctionnels : 1) l'ARN polymérase dirigée par l'ADN (COG0568) représenté par les gènes codant pour la RpoD et la RpoC, et 2) les régulateurs de transcription se liant à l'ADN (COG0583, COG1309 et COG1414) représenté par une quarantaine de protéines chez les trois espèces avec une récurrence d'une seule fois pour la majorité (Chap.8, Tableau S5). Nous avons utilisé *E. coli* pour la validation fonctionnelle. Ainsi pour cette catégorie, nous avons choisi de valider le rôle de *rpoD* muté dans la résistance à l'IMP car c'était le gène le plus récurrent dans cette catégorie, comme il se trouvait dans dix mutants, dont huit chez *E. coli* (Chap.8, Tableau S5).

L'ARN polymérase dépendante de l'ADN existe sous deux formes : une enzyme principale « core » et une holoenzyme. L'enzyme principale constituée de cinq sous-unités est catalytiquement active, mais elle doit être associée au facteur $\sigma 70$ codé par le gène *rpoD* pour initier la transcription de manière efficace et spécifique ; ensemble, elles forment l'holoenzyme (309). Dans cette étude, une mutation de la région $\sigma 70_r1.1$ de RpoD impliquée dans la liaison au promoteur (310) a été détectée chez un mutant de chaque espèce, G20S, E20K et A72V chez *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *E. coli*, respectivement (Chap.8, Figure 3A). De plus, deux mutations différentes dans la région $\sigma 70_r2$ en position 444 se sont produites chez six mutants indépendants d'*E. coli* (Chap.8, Figure 3A). Cette région est hautement conservée et elle est responsable de la liaison à l'enzyme principale, au site -10 du promoteur et de la dénaturation de l'ADN (311). Le mutant d'*E. coli* *rpoD*^{G1331A}::*kan* contenant la mutation A444V augmentait de 4 fois la CMI d'IMP (Chap.8, Tableau 4) et présentait un avantage de croissance par rapport à la souche sauvage (WT) allant jusqu'à 2 $\mu\text{g/mL}$ (Chap.8, Figures 3B et 3C).

Le gène *rpoD* représente une cible antibactérienne prometteuse pour de nombreuses raisons (312) : 1) les facteurs sigma ne se trouvent pas chez les cellules eucaryotes, 2) la séquence du *rpoD* partage un très faible pourcentage d'homologie avec les ARN polymérases dépendante de l'ADN des eucaryotes, alors que les séquences de différentes régions de *rpoD* partagent de grandes similitudes entre plusieurs espèces bactériennes, et 3) c'est un gène essentiel pour la survie et la prolifération des bactéries et il est également impliqué dans la modulation de l'expression de nombreux gènes essentiels, y compris *seqA*, *ftsZ*, *mazF*, *prfB*, *rpoS*, *tufB*, et *yjgD*. La stratégie antibactérienne anti-sens consiste à inactiver des gènes essentiels par des analogues des acides nucléiques anti-sens. En effet, un acide nucléique peptidique anti-*rpoD* (PPNA) a montré une activité antibactérienne sur de nombreuses bactéries à Gram négatif, entre autres *E. coli* et *K. pneumoniae* (312).

La catégorie « T » était représentée par de nombreux gènes codant pour des systèmes de transduction du signal à deux composants, ces gènes étaient diversifiés mais deux parmi eux, l'*evgS* et *phoQ* étaient communs aux trois espèces (Chap.8, Tableau S5).

Notre stratégie ne permettait pas d'introduire les mutations ponctuelles chez la souche sauvage d'*E. coli* en raison de l'arrangement génique et de la proximité étroite de leurs régulateurs respectifs, *evgA* et *phoP*. Ainsi, afin d'étudier le rôle de ces gènes dans la résistance à l'IMP, des techniques d'inactivation de ces gènes ou bien de leur surexpression peuvent être appliquées.

Enfin, d'autres catégories étaient communes aux trois espèces dont nous n'avons pas validées dans le cadre de cette étude. À titre d'exemple, de nombreux gènes codant pour divers transporteurs MFS ou de multi-drogues ont été mutés (Chap.8, Tableau S5).

9.2.2. Un lien entre certains gènes mutés et la division cellulaire

La division cellulaire chez *E. coli* se déroule brièvement comme suit, premièrement, l'assemblage au milieu de la cellule de l'anneau en Z par polymérisation de la protéine FtsZ fixé au feuillet interne de la membrane interne par la protéine FtsA, deuxièmement, formation du divisome complet par association d'autres protéines (telles que EnvC, FtsI (PLP3) et PLP1b) à l'anneau FtsZ, et troisièmement, l'activation du divisome par FtsN pour synthétiser le PG septal (313). Ce dernier doit être divisé par des amidases qui clivent les liaisons dans la matrice du PG afin de séparer les cellules filles (313). Ces amidases AmiB et AmiC sont auto-inhibées et doivent être activées par les protéines du divisome EnvC et NlpD, respectivement (314). Le complexe Tol-Pal est nécessaire pour une invagination efficace de la membrane externe, il a été démontré que ce complexe est impliqué dans la régulation du clivage de la paroi cellulaire lors de la division cellulaire en activant NlpD (315), ainsi que dans la modulation de la synthèse de PG (316).

D'une façon intéressante, *amiC* et *nlpD* étaient parmi les gènes mutés les plus récurrents chez *K. pneumoniae* et *E. coli* (Chap.8, Tableau 3), de plus *tolA* faisant partie du complexe Tol-Pal a été muté chez trois mutants d'*E. coli* (Chap.8, Tableau 1). Les mutants d'*E. coli* exprimant l'une des mutations suivantes G402R, Q161* ou M67I dans AmiC, NlpD ou TolA respectivement augmentaient la CMI de l'IMP de 2X par rapport à la souche sauvage (Chap.8, Tableau 4). De nombreux mutants de *K. pneumoniae* et *E. coli* avaient

des mutations non-sens chez *amiC* et *nlpD* (Chap.8, Figure S1A et S1B), et étant donné que TolA active NlpD qui à son tour active AmiC, nous pouvons déduire que les mutations de *tolA* induisent aussi une perte de fonction.

Parmi les neuf LTs identifiées chez *E. coli*, *mltG* (ou *yceG*) était muté dans 20 mutants d'*E. coli* (Chap.8, Tableau 1), *mltA*, *mltB*, *mltD* et *rplA* étaient mutés dans quatre mutants indépendants d'*E. coli*, *mltB* et *mltA* se trouvaient aussi mutés chez trois mutants indépendants de *K. pneumoniae* (Chap.8, Tableaux S2 et S3). Enfin, *slt* a été trouvé dans cinq mutants indépendants (trois chez *E. coli* et deux chez *K. pneumoniae*) avec une majorité de mutants ayant une mutation non-sens (Chap.8, Figure S1C). L'inactivation de Slt (R475*) chez *E. coli* augmente de 2 fois la résistance à l'IMP et un double Knock-in d'AmiC (G402R) et de Slt (R475*) augmente la résistance de 4 fois par rapport à la souche sauvage (Chap.8, Tableau 4). Par contre, ni un mutant ayant la mutation Q92* dans YceG, ni quand cette mutation a été associée à AmiC (G402R) n'ont changé la susceptibilité d'*E. coli* à l'IMP (Chap.8, Tableau 4). Cependant, par comparaison avec la souche sauvage, les deux mutants d'*E. coli* Slt (R475*) et YceG (Q92*) présentaient une déficience de croissance sur gélose à des concentrations sous-toxiques d'IMP (Figure 15).

Précédemment, l'inactivation de *slt* a eu des effets différentiels sur la sensibilité aux β -lactamines en fonction du profil génétique. Chez *E. coli* sauvage, il en résulte une hypersensibilité au mécillinaam (317), mais chez un mutant de *Salmonella typhimurium* déjà modérément résistant à l'antibiotique, une augmentation de la résistance a été observée en raison de l'inactivation de *slt* (318). En outre, chez *E. coli*, lorsque le niveau de FtsZ est normal, le mutant Δ *slt* avait une CMI 10X inférieure à celle de la souche sauvage, mais chez une souche surproduisant la FtsZ et défectueuse pour Slt, une résistance d'environ 33X a été observée (319). Ainsi, le mécanisme de résistance à l'IMP induit par l'inactivation de *slt* pourrait impliquer une certaine régulation de la FtsZ.

Il a été démontré que YceG forme un complexe avec PLP1b et qu'en l'absence de cette dernière, la surproduction de YceG est létale (184). En revanche, la perte de la fonction de YceG n'est pas mortelle, mais son inactivation aboutit à une augmentation importante de la longueur de la chaîne de glycane dans la matrice du PG mature (184).

Ainsi, comme l'IMP inactive PLP1b, une activation de YceG pourrait probablement avoir lieu pour compenser, or, la surproduction de YceG est mortelle pour les cellules, ainsi, l'inactivation d'YceG suite à un traitement à l'IMP pourrait constituer un mécanisme de défense des cellules pour éviter son activation qui pourrait induire la mort. Des études supplémentaires seront utiles pour élucider ce mécanisme.

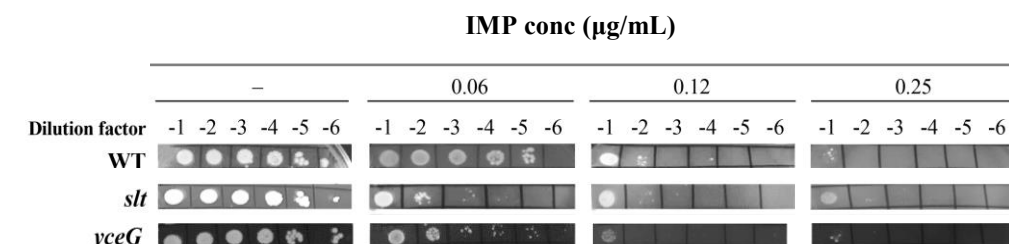


Figure 15. L'effet du traitement à l'imipénème sur la croissance d'*E. coli* ATCC 25922 WT et des mutants ayant des mutations dans Slt (R475*) ou YceG (Q92*)

Finalement, nos observations sont cohérentes avec celles des études précédentes, où des mutants d'*E. coli* dépourvus de NlpD ou d'amidases et de plusieurs transglycosylases lytiques ($\Delta amiA amiB amiC mltD mltE$) présentaient une lyse retardée en réponse à l'ampicilline (196, 205). Il est à noter que Slt, MltD et MltG semblent être des cibles antibactériennes potentielles chez *P. aeruginosa*. En effet, leur inhibition par la Bulgécine A augmente l'efficacité du méropénème (320).

Chez *E. coli*, le domaine N-terminal (acides aminés 1–529) de la ribonucléase RNase E contient l'activité de l'endonucléase (321), et le domaine C-terminal (530–1061) sert de support pour l'interaction avec d'autres protéines afin de former le complexe de dégradation requis pour le traitement des petits ARN régulateurs, ARNt et ARNr et pour la dégradation de la plupart des ARNm. Les sites de liaison des protéines dégradables à la RNase E sont les suivants : Rhlb (628-790), émolase (823-850) et PNPase (1039-1061) (322). Cinq mutations non-sens du site de liaison à RhlB ont été découvertes chez des mutants d'*E. coli* sélectionnés dans cette étude (Chap.8, Tableau 1). L'introduction de la mutation non-sens Q775* dans la souche sauvage a augmenté sa résistance à l'IMP de 2 fois (Chap.8, Tableau 4). La résistance peut être due à une perturbation du dégradosome. Néanmoins, il a été démontré que l'inactivation du domaine N-ter affecte le rapport FtsZ/FtsA en diminuant le niveau de FtsZ et en augmentant le niveau de FtsA, ce qui

entraîne la croissance de cellules d'*E. coli* sous forme de chaînes filamenteuses en culture liquide (323, 324). Notamment, ce phénotype est restauré par l'expression d'un gène plasmidique codant pour un fragment N-ter RNaseE tronqué, indiquant que la formation de dégradosome n'est pas impliquée dans l'altération du taux de FtsZ (324). Dans notre étude, deux substitutions (P250L et R335C) se sont également produites (Chap.8, Tableau 1) suggérant qu'un autre mécanisme impliquant une altération du niveau de FtsZ, et par la suite la division cellulaire pourrait induire une résistance à l'IMP.

Selon l'analyse COG, la Rnase E fait partie de la catégorie « J » incluant les protéines jouant un rôle dans la traduction ainsi que dans la structure et la biogenèse des ribosomes. En effet, 5% des SNVs chez *E. coli* faisaient partie de cette catégorie incluant divers aminoacyl-ARNt synthétases. De ce fait, le lien entre l'IMP et la traduction sera une piste à exploitée dans des travaux futurs.

9.2.2. La résistance à l'imipénème et les systèmes à deux composants

Le mécanisme de résistance le plus répandu chez *P. aeruginosa* inclut des mutations dans la porine OprD ou bien sa régulation négative par des systèmes à deux composants (ex : CzcSR et CopRS) (109). Notre stratégie de Mut-Seq nous a permis d'identifier des mutations dans OprD ainsi que dans des homologues au système CzcSR (A4W92_13070, A4W92_13065 et A4W92_04840). De plus, deux mutations (E198K et Q258*) chez l'histidine kinase PhoQ (A4W92_05675) ont été détectées dans deux clones indépendants (Chap.8, Tableau 2). Chez *P. aeruginosa*, l'inactivation de PhoQ induit une résistance aux polymyxines en modifiant le lipide A du LPS (325). Chez des souches dépourvues de *phoQ*, l'expression des allèles mutés de deux systèmes à deux composants *colRS* et *cprS* amélioreraient la résistance à la polymyxine. Cela indique que la modification du lipide A n'est pas le seul mécanisme régulé par PhoPQ requis pour la résistance et que des mutations dans d'autres systèmes à deux composants peuvent contribuer à une résistance élevée (326). Considérant que l'IMP n'a pas besoin d'interagir avec le LPS pour pénétrer dans *P. aeruginosa*, nos mutants hébergeant des altérations dans PhoQ pourraient médier la résistance à l'IMP en régulant d'autres mécanismes. Le mutant M5, ayant une

CMI de 16 µg/mL, possède une mutation Q258* dans son PhoQ et la mutation A252V dans une autre histidine kinase (A4W92_13070). Probablement, ces deux protéines, qui font partie de deux systèmes à deux composants indépendants, collaborent pour induire un niveau élevé de résistance à l'IMP. Il sera intéressant de comprendre le rôle que joue *phoQ* dans la résistance à l'IMP, surtout que ce gène a été muté chez les trois espèces étudiées (Chap.8, Tableau S5).

Comme nous avons mentionné dans la section 9.2.1, divers histidine kinases ainsi que leurs régulateurs ont été mutés chez les trois espèces étudiées (Chap.8, Tableau S5). En effet, les histidines kinases sont considérées comme une cible antibactérienne prometteuse, de nombreux inhibiteurs de divers histidines kinases chez de nombreux organismes, entre autres *P. aeruginosa* et *E. coli* ont été examinés (327).

9.2.3. Perspectives

Comme nous venons de voir, les mécanismes de résistance à l'IMP impliquant *rpoD*, *rne* et *slt* peuvent impliquer une certaine régulation de la FtsZ, ainsi, il sera pertinent de tester le niveau d'expression du *ftsZ* par qRT-PCR chez les mutants portant ces gènes mutés. Nous pouvons aussi quantifier le taux de FtsZ par Western Blot puisque des anticorps contre la FtsZ d'*E. coli* sont disponibles.

Étant donné que plusieurs gènes impliqués dans la division cellulaire ont également été mutés en présence d'IMP, nous pouvons utiliser la microscopie électronique à balayage (« SEM ») pour observer les changements morphologiques des cellules à la suite du traitement à l'IMP.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons réalisé les vérifications fonctionnelles chez *E. coli*, il sera sûrement intéressant de valider le rôle des mutations dans la résistance à l'IMP chez *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* surtout pour les gènes spécifiques à ces deux espèces. Finalement, nous n'avons pas déterminé tous les gènes mutés responsables de la résistance, ainsi dans le futur d'autres validations pourront être complétées.

Notre stratégie de Mut-Seq s'est avérée utile puisqu'elle nous a permis de détecter des anciens et de nouveaux gènes impliqués dans la résistance à l'IMP et dans son mode d'action chez les trois bactéries à Gram négatif, ainsi que d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles. Les principaux avantages de cette technique sont les suivants: 1) la génération rapide de mutants résistants à comparer avec les techniques traditionnelles de sélection de mutants en présence de l'antibiotique, et 2) les mutations créées peuvent engendrer une perte ou un gain de fonction. Par contre, les principaux inconvénients sont comme suit : 1) à l'exception des mutations non-sens, la détermination de l'effet de la mutation sur la fonction de la protéine nécessite des analyses supplémentaires d'inactivation ou de surexpression des gènes d'intérêt, et 2) en raison du nombre élevé de mutations produites par le traitement chimique, le criblage des gènes mutés probablement impliqués dans la résistance nécessite le séquençage d'un nombre élevé de mutants. Nous avons aussi appliqué cette technique afin d'étudier la résistance à la ciprofloxacine et afin de mieux comprendre son mode d'action chez *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii*. Chez les quatre bactéries, nous avons pu détecter des mutations dans l'ADN gyrase; la cible primaire de la ciprofloxacine. De nombreux autres gènes ont été mutés, les analyses des données sont en cours afin de déterminer les gènes communs aux quatre espèces ainsi que ceux spécifiques à chacune d'elles.

A une échelle globale d'autres techniques peuvent être employées, en considérant que des validations fonctionnelles seront toujours nécessaires, peu importe la technique utilisée. Afin de déterminer les gènes dont la surexpression induit une résistance nous pouvons appliquer la stratégie du « Plas-Seq ». Cette technique consiste à générer une banque génomique de plasmide de la bactérie en question et de la transformer dans une bactérie hôte transformable. Ensuite les transformants seront sélectionnés étape par étape en utilisant différentes concentrations de l'antibiotique allant de sous- aux sur toxiques. Les plasmides isolés à chaque étape de sélection seront séquencés à haut débit. Plas-Seq est déjà optimisée chez *E. coli* dans notre laboratoire et s'est avérée efficace pour l'étude de la résistance à cinq antibiotiques (328). Au contraire, si notre but est de déterminer les gènes dont l'inactivation induit la résistance, la technique de TraDIS (« Transposon Directed Insertion-site Sequencing ») serait un bon choix. Cette technique consiste à insérer de

manière aléatoire des gènes de transposon dans des millions de cellules et d'évaluer les effets de la perturbation sur la viabilité des cellules. Si le site où le transposon a été inséré était essentiel à la survie de la cellule, la cellule meurt. En séquençant l'ADN des millions de cellules qui survivent, aucune donnée ne sera récupérée à partir des gènes essentiels. Ainsi, en faisant croître l'ensemble des mutants en présence de l'antibiotique, la contribution relative de chaque gène non essentiel à la tolérance ou à la résistance à l'antibiotique peut être mesurée. Il faut d'abord construire une banque de transposons, pour ce faire, il faut construire le complexe du transposome composé d'un transposon et d'une cassette de résistance (*p.ex.* Kan) mélangés à une transposase, ensuite le complexe sera électroporé dans des bactéries compétentes suivi d'une sélection sur gélose supplémentée par Kan. La procédure doit être répétée plusieurs fois afin de récupérer des millions de colonies. Un aliquot de la banque de transposons sera ensuite exposé ou pas à une certaine concentration de l'antibiotique à étudier (*p. ex.* IMP), l'ADN des cultures sera extrait et séquencé. Les séquences contenant l'étiquette du transposon seront alignées au génome de référence afin de déterminer le nombre d'insertions de transposons par gène et les différences d'insertion entre les bactéries exposées et non exposées à l'antibiotique. Cette technique a été déjà utilisée avec succès chez *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* (329-332).

D'autres techniques utilisant la technologie de CRISPR pourraient être utilisées pour un criblage fonctionnel à l'échelle du génome entier chez les bactéries (333, 334). La Cas9 est une nucléase d'ADN double brin guidée par l'ARN ou « sgRNA » (pour single guide RNA) qui participe à la défense immunitaire des procaryotes contre les virus. Le complexe Cas9-sgRNA se lie à un site cible spécifique de l'ADN génomique, créant une rupture double brin. La dCas9 (« dead Cas9 ») est une version mutée de Cas9 défectueuse en activité endonucléase mais qui conserve son activité de liaison à l'ADN (335). La technologie CRISPR ouvre la voie à la modulation de l'expression de plusieurs gènes en raison des sgRNAs uniques qui dirigent dCas9 pour altérer la transcription des gènes cibles. Les techniques « CRISPR interférence » (CRISPRi) et « CRISPR activation » (CRISPRa) basées sur le complexe dCas9-sgRNA peuvent induire une répression ou une activation de la transcription, respectivement. En effet, le complexe dCas9-sgRNA active l'expression du

gène lorsque dCas9 est fusionnée avec la sous-unité oméga de l'ARN polymérase, alors qu'il réprime l'expression des gènes quand dCas9 se lie à des séquences du promoteur ou à un terminateur de transcription (335). Il faut d'abord synthétiser sur une puce à ADN une banque d'oligonucléotides contenant la séquence des sgRNAs ciblant les gènes d'intérêt. Ensuite, les oligonucléotides sont amplifiés et clonés dans des plasmides d'expression et transformés dans la bactérie à étudier (*p. ex. E. coli*) exprimant la protéine dCas9, donnant lieu à des banques de cellules. Par la suite, les banques de cellules sont cultivées en présence ou non de l'antibiotique. Les bibliothèques de SNG sont construites à partir des plasmides extraits. En comptant le nombre de séquences de lecture des sgRNAs entre les conditions de sélection et de contrôle et selon la technique choisie (CRISPRi ou CRISPRa), nous pourrions déterminer les gènes dont la répression ou l'activation est probablement responsable de la résistance (333). La technique de « CRISPRi » a été déjà utilisée à une échelle génomique chez *E. coli* (334).

Conclusion

À une époque de résistance croissante aux antibiotiques et de pénurie de nouvelles molécules, de nouvelles stratégies sont nécessaires pour augmenter l'activité des antibiotiques actuels contre les bactéries sensibles et résistantes.

Notre étude de la réponse transcriptomique de *S. pneumoniae* à la PEN a montré un nouveau lien entre le métabolisme de la glutamine et la sensibilité à la PEN. La recherche d'adjuvants aux antibiotiques est maintenant un domaine d'étude intensive (336) et l'inhibition des voies métaboliques est une stratégie prometteuse (268, 337). D'un point de vue théorique, l'interférence avec le métabolisme de la glutamine, par exemple en inhibant l'activité de la GlnA, pourrait augmenter la sensibilité à la PEN mais aussi réduire la virulence de *S. pneumoniae*. Ainsi, le ciblage de cette voie en combinaison avec un traitement à la PEN pourrait avoir un double effet sur *S. pneumoniae*.

Des efforts ont été déployés pour lutter contre les agents pathogènes à Gram négatif multirésistants. En effet, certaines molécules ont démontré un potentiel dans le traitement futur des infections causées par ces bactéries (338, 339). De nouveaux antibiotiques issus des classes d'antimicrobiens existants, tels que la plazomicine et l'éravacyline, dérivés respectivement des classes des aminoglycosides et de la tétracycline, ont montré une activité *in vitro* contre les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes (285). En outre, des thérapies combinées comprenant un β -lactame et un inhibiteur de β -lactamase (*p.ex.* IMP-Relebactam et méropénem-vaborbactam) ou une céphalosporine et un inhibiteur de β -lactamase (*p.ex.* Ceftolozane-tazobactam) ont montré des résultats prometteurs contre *P. aeruginosa* (286, 287, 291, 340). Malheureusement, l'utilisation des mêmes classes d'antimicrobiens n'empêche pas l'apparition de résistance et jusqu'à ce que de nouveaux traitements deviennent accessibles, il est impératif de maintenir l'efficacité clinique des molécules disponibles.

Notre criblage chimiogénomique avec *E. coli*, *K. pneumoniae* et *P. aeruginosa* a mis en évidence une réponse à l'IMP commune ainsi que spécifique à chaque espèce.

En concentrant notre validation fonctionnelle sur les mutations les plus récurrentes, nous avons pu déterminer certains gènes dont les mutations testées étaient associées à une diminution de la susceptibilité de la souche sauvage à l'IMP. De façon intéressante, certains des gènes identifiés tels que *slt*, *rpoD* et les histidines kinases sont déjà envisagés comme des cibles thérapeutiques prometteuses, ainsi nos résultats pourraient être bénéfiques pour prévoir les mécanismes de résistance qui pourrait se produire dans le futur suite à une bithérapie ciblant ces gènes.

Enfin, en utilisant des approches omiques diverses nous avons pu détecter de nouveaux gènes de résistance mais aussi des gènes déjà décrits dans la littérature, ce qui montre le pouvoir de ces approches quant à la prédiction des mécanismes de résistance de nouvelles molécules prometteuses. Ceci nous permettra de mieux comprendre le mode d'action des antibiotiques et également de mettre en place des stratégies afin de contourner ces mécanismes de résistance avant qu'ils aient un impact clinique et ainsi, de protéger l'efficacité de nouveaux antibiotiques.

Bibliographies

1. Rastogi S, Kaphle K. 2011. Sustainable traditional medicine: taking the inspirations from ancient veterinary science. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011:151435.
2. Aboelsoud NH. 2010. Herbal medicine in ancient Egypt. *Journal of Medicinal Plants Research* 4:082-086.
3. Gould K. 2016. Antibiotics: from prehistory to the present day. *J Antimicrob Chemother* 71:572-5.
4. Bassett EJ, Keith MS, Armelagos GJ, Martin DL, Villanueva AR. 1980. Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (A.D. 350). *Science* 209:1532-4.
5. Gest H. 2004. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni Van Leeuwenhoek, fellows of the Royal Society. *Notes Rec R Soc Lond* 58:187-201.
6. Lane N. 2015. The unseen world: reflections on Leeuwenhoek (1677) 'Concerning little animals'. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370.
7. Sakula A. 1983. Robert Koch (1843-1910): Founder of the Science of Bacteriology and Discoverer of the Tubercle Bacillus : A Study of his Life and Work. *Can Vet J* 24:124-7.
8. Berche P. 2012. Louis Pasteur, from crystals of life to vaccination. *Clin Microbiol Infect* 18 Suppl 5:1-6.
9. Levy SB. 2002. *The Antibiotic Paradox*. Perseus Publishing, Cambridge, MA, USA.
10. Witkop B. 1999. Paul Ehrlich and his Magic bullets--revisited. *Proc Am Philos Soc* 143:540-57.
11. Aminov RI. 2010. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol* 1:134.
12. Fleming A. 2001. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929. *Bull World Health Organ* 79:780-90.
13. Chain E, Florey, H. W., Gardner, A. D., Heatley, N. G., Jennings, M. A., Orr-Ewing, J., and Sanders, A. G. . 2005. The classic: penicillin as a chemotherapeutic agent. 1940. *Clinical Orthopaedics and Related Research*:23-26.
14. Armstrong GL, Conn LA, Pinner RW. 1999. Trends in infectious disease mortality in the United States during the 20th century. *JAMA* 281:61-6.
15. van Duijkeren E, Schink AK, Roberts MC, Wang Y, Schwarz S. 2018. Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Microbiol Spectr* 6.
16. Wright GD. 2010. Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biol* 8:123.
17. WHO. 2014. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. World Health Organization,
18. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Cars O. 2013. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis* 13:1057-98.

19. McEwen SA, Collignon PJ. 2018. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol Spectr* 6.
20. CDC. 2013. Antibiotic Resistance Threats In The United States. CDC, USA.
21. Garner MJ, Carson C, Lingohr EJ, Fazil A, Edge VL, Trumble Waddell J. 2015. An assessment of antimicrobial resistant disease threats in Canada. *PLoS One* 10:e0125155.
22. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outterson K, Patel J, Cavaleri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N. 2018. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 18:318-327.
23. Gadakh B, Van Aerschot, A. 2015. Renaissance in Antibiotic Discovery: Some Novel Approaches for Finding Drugs to Treat Bad Bugs. *Curr Med Chem* 22:2140-58.
24. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. 2010. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a000414.
25. Zhang G, Meredith TC, Kahne D. 2013. On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 16:779-85.
26. Rojas ER, Billings G, Odermatt PD, Auer GK, Zhu L, Miguel A, Chang F, Weibel DB, Theriot JA, Huang KC. 2018. The outer membrane is an essential load-bearing element in Gram-negative bacteria. *Nature* 559:617-621.
27. Nikaido H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:593-656.
28. Matias VR, Beveridge TJ. 2005. Cryo-electron microscopy reveals native polymeric cell wall structure in *Bacillus subtilis* 168 and the existence of a periplasmic space. *Mol Microbiol* 56:240-51.
29. Matias VR, Beveridge TJ. 2006. Native cell wall organization shown by cryo-electron microscopy confirms the existence of a periplasmic space in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 188:1011-21.
30. Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. 2015. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat Rev Microbiol* 13:620-30.
31. Watson DA, Musher DM, Jacobson JW, Verhoef J. 1993. A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. *Clin Infect Dis* 17:913-24.
32. Kellogg JA, Bankert DA, Elder CJ, Gibbs JL, Smith MC. 2001. Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited. *J Clin Microbiol* 39:3373-5.
33. Brooks LRK, Mias GI. 2018. *Streptococcus pneumoniae*'s Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention. *Front Immunol* 9:1366.
34. Whatmore AM, Efstratiou A, Pickerill AP, Broughton K, Woodard G, Sturgeon D, George R, Dowson CG. 2000. Genetic relationships between clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus mitis*: characterization of "Atypical" pneumococci and organisms allied to *S. mitis* harboring *S. pneumoniae* virulence factor-encoding genes. *Infect Immun* 68:1374-82.

35. Hanage WP, Kaijalainen T, Herva E, Saukkoriipi A, Syrjanen R, Spratt BG. 2005. Using multilocus sequence data to define the pneumococcus. *J Bacteriol* 187:6223-30.
36. Henriques-Normark B, Tuomanen EI. 2013. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3.
37. Wahl B, O'Brien KL, Greenbaum A, Majumder A, Liu L, Chu Y, Luksic I, Nair H, McAllister DA, Campbell H, Rudan I, Black R, Knoll MD. 2018. Burden of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b disease in children in the era of conjugate vaccines: global, regional, and national estimates for 2000-15. *Lancet Glob Health* 6:e744-e757.
38. Moffitt K, Malley R. 2016. Rationale and prospects for novel pneumococcal vaccines. *Hum Vaccin Immunother* 12:383-92.
39. Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, Konradsen HB, Nahm MH. 2015. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clin Microbiol Rev* 28:871-99.
40. Grabenstein JD, Klugman KP. 2012. A century of pneumococcal vaccination research in humans. *Clin Microbiol Infect* 18 Suppl 5:15-24.
41. Jones RN, Sader HS, Mendes RE, Flamm RK. 2013. Update on antimicrobial susceptibility trends among *Streptococcus pneumoniae* in the United States: report of ceftaroline activity from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2011). *Diagn Microbiol Infect Dis* 75:107-9.
42. Shulman ST, Friedmann HC, Sims RH. 2007. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? *Clin Infect Dis* 45:1025-9.
43. York MK, Baron EJ, Clarridge JE, Thomson RB, Weinstein MP. 2000. Multilaboratory validation of rapid spot tests for identification of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 38:3394-8.
44. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2:123-40.
45. Leimbach A, Hacker J, Dobrindt U. 2013. *E. coli* as an all-rounder: the thin line between commensalism and pathogenicity. *Curr Top Microbiol Immunol* 358:3-32.
46. NCDHHS. 2019. <https://epi.publichealth.nc.gov/cd/diseases/ecoli.html>
47. Khalil IA, Troeger C, Blacker BF, Rao PC, Brown A, Atherly DE, Brewer TG, Engmann CM, Houpt ER, Kang G, Kotloff KL, Levine MM, Luby SP, MacLennan CA, Pan WK, Pavlinac PB, Platts-Mills JA, Qadri F, Riddle MS, Ryan ET, Shoultz DA, Steele AD, Walson JL, Sanders JW, Mokdad AH, Murray CJL, Hay SI, Reiner RC, Jr. 2018. Morbidity and mortality due to shigella and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea: the Global Burden of Disease Study 1990-2016. *Lancet Infect Dis* 18:1229-1240.
48. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. 2013. *Escherichia coli* in Europe: an overview. *Int J Environ Res Public Health* 10:6235-54.
49. (ed). 2019. *Klebsiella Pneumonia*, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/acces.bibl.ulaval.ca/books/NBK519004/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncbi/ncbi.nlm.nih.gov/acces.bibl.ulaval.ca/books/NBK519004/). StatPearls, Accessed
50. Martin RM, Bachman MA. 2018. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol* 8:4.
51. Vading M, Naucler P, Kalin M, Giske CG. 2018. Invasive infection caused by *Klebsiella pneumoniae* is a disease affecting patients with high comorbidity and associated with high long-term mortality. *PLoS One* 13:e0195258.

52. Paczosa MK, Meccas J. 2016. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:629-61.
53. Anonymous. 2013. Vital signs: carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 62:165-70.
54. Campos AC, Albiero J, Ecker AB, Kuroda CM, Meirelles LE, Polato A, Tognim MC, Wingeter MA, Teixeira JJ. 2016. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K pneumoniae*: A systematic review. *Am J Infect Control* 44:1374-1380.
55. Anonymous. 1984. Classics in infectious diseases. On the blue and green coloration that appears on bandages. By Carle Gessard (1850-1925). *Rev Infect Dis* 6 Suppl 3:S775-6.
56. King A, Phillips I. 1978. The identification of pseudomonads and related bacteria in a clinical laboratory. *J Med Microbiol* 11:165-76.
57. Azam MW, Khan AU. 2019. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov Today* 24:350-359.
58. Rakhimova E, Wiehlmann L, Brauer AL, Sethi S, Murphy TF, Tummler B. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* population biology in chronic obstructive pulmonary disease. *J Infect Dis* 200:1928-35.
59. Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. 2010. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 74:621-41.
60. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock RE, Lory S, Olson MV. 2000. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406:959-64.
61. Moradali MF, Ghods S, Rehm BH. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front Cell Infect Microbiol* 7:39.
62. Lu Q, Eggimann P, Luyt CE, Wolff M, Tamm M, Francois B, Mercier E, Garbino J, Laterre PF, Koch H, Gafner V, Rudolf MP, Mus E, Perez A, Lazar H, Chastre J, Rouby JJ. 2014. *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes. *Crit Care* 18:R17.
63. Thrane SW, Taylor VL, Freschi L, Kukavica-Ibrulj I, Boyle B, Laroche J, Pirnay JP, Levesque RC, Lam JS, Jelsbak L. 2015. The Widespread Multidrug-Resistant Serotype O12 *Pseudomonas aeruginosa* Clone Emerged through Concomitant Horizontal Transfer of Serotype Antigen and Antibiotic Resistance Gene Clusters. *MBio* 6:e01396-15.
64. Shortridge D, Gales AC, Streit JM, Huband MD, Tsakris A, Jones RN. 2019. Geographic and Temporal Patterns of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Over 20 Years From the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2016. *Open Forum Infect Dis* 6:S63-S68.
65. CDC. *Pseudomonas aeruginosa* in Healthcare Settings, <https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>.
66. Etebu E, Arikekpar, I. 2016. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int J Appl Microbiol Biotechnol Res*:90-101.

67. Walsh C. 2003. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. ASM Press, USA.
68. Lewis K. 2013. Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov* 12:371-87.
69. Bugg TDH, Walsh, C.T. 1992. Intracellular steps of bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis: enzymology, antibiotics, and antibiotic resistance. *Natural Product Reports* 9:199-215
70. Schneider T, Muller A, Miess H, Gross H. 2014. Cyclic lipopeptides as antibacterial agents - potent antibiotic activity mediated by intriguing mode of actions. *Int J Med Microbiol* 304:37-43.
71. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. 2008. Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev* 21:449-65.
72. Silverman JA, Perlmutter NG, Shapiro HM. 2003. Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2538-44.
73. Espeli O, Mariani KJ. 2004. Untangling intracellular DNA topology. *Mol Microbiol* 52:925-31.
74. Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao X. 2008. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother* 52:385-92.
75. Munoz R, De La Campa AG. 1996. ParC subunit of DNA topoisomerase IV of *Streptococcus pneumoniae* is a primary target of fluoroquinolones and cooperates with DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype. *Antimicrob Agents Chemother* 40:2252-7.
76. Chen CR, Malik M, Snyder M, Drlica K. 1996. DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone-induced DNA cleavage. *J Mol Biol* 258:627-37.
77. Kim L, McGee L, Tomczyk S, Beall B. 2016. Biological and Epidemiological Features of Antibiotic-Resistant *Streptococcus pneumoniae* in Pre- and Post-Conjugate Vaccine Eras: a United States Perspective. *Clin Microbiol Rev* 29:525-52.
78. Rothstein DM. 2016. Rifamycins, Alone and in Combination. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6.
79. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol* 8:423-35.
80. Hong W, Zeng J, Xie J. 2014. Antibiotic drugs targeting bacterial RNAs. *Acta Pharm Sin B* 4:258-65.
81. Epe B, Woolley P. 1984. The binding of 6-demethylchlortetracycline to 70S, 50S and 30S ribosomal particles: a quantitative study by fluorescence anisotropy. *EMBO J* 3:121-6.
82. Rahal JJ, Jr., Simberkoff MS. 1979. Bactericidal and bacteriostatic action of chloramphenicol against meningial pathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 16:13-18.
83. Roberts E, Sethi A, Montoya J, Woese CR, Luthey-Schulten Z. 2008. Molecular signatures of ribosomal evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:13953-8.
84. Bermingham A, Derrick JP. 2002. The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: evaluation of potential for antibacterial drug discovery. *Bioessays* 24:637-48.
85. Amyes SG. 1982. Bactericidal activity of trimethoprim alone and in combination with sulfamethoxazole on susceptible and resistant *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob Agents Chemother* 21:288-93.

86. Nepka M, Perivolioti E, Kraniotaki E, Politi L, Tsakris A, Pournaras S. 2016. *In Vitro* Bactericidal Activity of Trimethoprim-Sulfamethoxazole Alone and in Combination with Colistin against Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 60:6903-6906.
87. Estrada A, Wright DL, Anderson AC. 2016. Antibacterial Antifolates: From Development through Resistance to the Next Generation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6.
88. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell* 130:797-810.
89. Dwyer DJ, Kohanski MA, Hayete B, Collins JJ. 2007. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol* 3:91.
90. Foti JJ, Devadoss B, Winkler JA, Collins JJ, Walker GC. 2012. Oxidation of the guanine nucleotide pool underlies cell death by bactericidal antibiotics. *Science* 336:315-9.
91. Liu Y, Imlay JA. 2013. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. *Science* 339:1210-3.
92. Keren I, Wu Y, Inocencio J, Mulcahy LR, Lewis K. 2013. Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. *Science* 339:1213-6.
93. Wigle TJ, Sexton JZ, Gromova AV, Hadimani MB, Hughes MA, Smith GR, Yeh LA, Singleton SF. 2009. Inhibitors of RecA activity discovered by high-throughput screening: cell-permeable small molecules attenuate the SOS response in *Escherichia coli*. *J Biomol Screen* 14:1092-101.
94. Lu TK, Collins JJ. 2009. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:4629-34.
95. Kohanski MA, Dwyer DJ, Wierzbowski J, Cottarel G, Collins JJ. 2008. Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell* 135:679-90.
96. Fani F, Leprohon P, Legare D, Ouellette M. 2011. Whole genome sequencing of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* reveals mutations in penicillin-binding proteins and in a putative iron permease. *Genome Biol* 12:R115.
97. Ferrandiz MJ, de la Campa AG. 2014. The fluoroquinolone levofloxacin triggers the transcriptional activation of iron transport genes that contribute to cell death in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 58:247-57.
98. Karlin S, Theriot J, Mrazek J. 2004. Comparative analysis of gene expression among low G+C gram-positive genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6182-7.
99. Yesilkaya H, Andisi VF, Andrew PW, Bijlsma JJ. 2013. *Streptococcus pneumoniae* and reactive oxygen species: an unusual approach to living with radicals. *Trends Microbiol* 21:187-95.
100. Tettelin H, Nelson KE, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Peterson S, Heidelberg J, DeBoy RT, Haft DH, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn M, Kolonay JF, Nelson WC, Peterson JD, Umayam LA, White O, Salzberg SL, Lewis MR, Radune D, Holtzapple E, Khouri H, Wolf AM, Utterback TR, Hansen CL, McDonald LA, Feldblyum TV, Angiuoli S, Dickinson T, Hickey EK, Holt IE, Loftus BJ, Yang F, Smith HO, Venter JC, Dougherty BA, Morrison DA, Hollingshead SK, Fraser CM. 2001. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 293:498-506.

101. Chiang SM, Schellhorn HE. 2012. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. *Arch Biochem Biophys* 525:161-9.
102. Van Acker H, Coenye T. 2017. The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Mediated Killing of Bacteria. *Trends Microbiol* 25:456-466.
103. Anonymous. 2013. How antibiotics kill bacteria: new models needed? *Nature Medicine* 19.
104. Bhullar K, Waglechner N, Pawlowski A, Koteva K, Banks ED, Johnston MD, Barton HA, Wright GD. 2012. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One* 7:e34953.
105. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD. 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477:457-61.
106. Arzanlou M, Chai WC, Venter H. 2017. Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays Biochem* 61:49-59.
107. Zgurskaya HI, Lopez CA, Gnanakaran S. 2015. Permeability Barrier of Gram-Negative Cell Envelopes and Approaches To Bypass It. *ACS Infect Dis* 1:512-522.
108. Rice LB. 2012. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to beta-lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. *Mayo Clin Proc* 87:198-208.
109. Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 22:582-610.
110. Jacoby GA. 2009. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 22:161-82, Table of Contents.
111. Blake KL, O'Neill AJ. 2013. Transposon library screening for identification of genetic loci participating in intrinsic susceptibility and acquired resistance to antistaphylococcal agents. *J Antimicrob Chemother* 68:12-6.
112. Liu A, Tran L, Becket E, Lee K, Chinn L, Park E, Tran K, Miller JH. 2010. Antibiotic sensitivity profiles determined with an *Escherichia coli* gene knockout collection: generating an antibiotic bar code. *Antimicrob Agents Chemother* 54:1393-403.
113. Munita JM, Arias CA. 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* 4.
114. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 13:42-51.
115. Griffith F. 1928. The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)* 27:113-59.
116. Cobb M. 2014. Oswald Avery, DNA, and the transformation of biology. *Curr Biol* 24:R55-60.
117. Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P, Claverys JP. 2014. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol* 12:181-96.
118. Lederberg J, Tatum EL. 1946. Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature* 158:558.
119. Chen I, Christie PJ, Dubnau D. 2005. The ins and outs of DNA transfer in bacteria. *Science* 310:1456-60.

120. Mascaretti OA. 2003. Bacteria versus antibacterial agents : an integrated approach. ASM Press, USA.
121. Chomet P, Martienssen R. 2017. Barbara McClintock's Final Years as Nobelist and Mentor: A Memoir. *Cell* 170:1049-1054.
122. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. 2018. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* 31.
123. Courvalin P, Carlier C. 1986. Transposable multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Gen Genet* 205:291-7.
124. Colavecchio A, Cadieux B, Lo A, Goodridge LD. 2017. Bacteriophages Contribute to the Spread of Antibiotic Resistance Genes among Foodborne Pathogens of the *Enterobacteriaceae* Family - A Review. *Front Microbiol* 8:1108.
125. Lermينياux NA, Cameron ADS. 2019. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J Microbiol* 65:34-44.
126. Shin J, Ko KS. 2015. A Plasmid Bearing the bla(CTX-M-15) Gene and Phage P1-Like Sequences from a Sequence Type 11 *Klebsiella pneumoniae* Isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 59:6608-10.
127. Rolain JM, Fancello L, Desnues C, Raoult D. 2011. Bacteriophages as vehicles of the resistome in cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 66:2444-7.
128. Ramirez M, Severina E, Tomasz A. 1999. A high incidence of prophage carriage among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 181:3618-25.
129. Wyres KL, van Tonder A, Lambertsen LM, Hakenbeck R, Parkhill J, Bentley SD, Brueggemann AB. 2013. Evidence of antimicrobial resistance-conferring genetic elements among pneumococci isolated prior to 1974. *BMC Genomics* 14:500.
130. Wilson DN. 2014. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat Rev Microbiol* 12:35-48.
131. Shin SY, Bae IK, Kim J, Jeong SH, Yong D, Kim JM, Lee K. 2012. Resistance to carbapenems in sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* is related to DHA-1 and loss of OmpK35 and/or OmpK36. *J Med Microbiol* 61:239-45.
132. Cattoir V. 2004. [Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria]. *Pathol Biol (Paris)* 52:607-16.
133. Padilla E, Llobet E, Domenech-Sanchez A, Martinez-Martinez L, Bengoechea JA, Alberti S. 2010. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother* 54:177-83.
134. Ogawa W, Onishi M, Ni R, Tsuchiya T, Kuroda T. 2012. Functional study of the novel multidrug efflux pump KexD from *Klebsiella pneumoniae*. *Gene* 498:177-82.
135. Llanes C, Kohler T, Patry I, Dehecq B, van Delden C, Plesiat P. 2011. Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 55:5676-84.
136. Wolter DJ, Smith-Moland E, Goering RV, Hanson ND, Lister PD. 2004. Multidrug resistance associated with mexXY expression in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Texas hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 50:43-50.
137. Garvey MI, Baylay AJ, Wong RL, Piddock LJ. 2011. Overexpression of patA and patB, which encode ABC transporters, is associated with fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 55:190-6.

138. Stewart BA, Johnson AP, Woodford N. 1999. Relationship between mutations in *parC* and *gyrA* of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* and resistance to ciprofloxacin and grepafloxacin. *J Med Microbiol* 48:1103-6.
139. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. 2005. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents* 25:358-73.
140. Deguchi T, Fukuoka A, Yasuda M, Nakano M, Ozeki S, Kanematsu E, Nishino Y, Ishihara S, Ban Y, Kawada Y. 1997. Alterations in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 41:699-701.
141. Gorgani N, Ahlbrand S, Patterson A, Pourmand N. 2009. Detection of point mutations associated with antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 34:414-8.
142. Schmitz FJ, Perdikouli M, Beeck A, Verhoef J, Fluit AC. 2001. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole and modifications in genes coding for dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase in European *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother* 48:935-6.
143. Maskell JP, Sefton AM, Hall LM. 2001. Multiple mutations modulate the function of dihydrofolate reductase in trimethoprim-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1104-8.
144. Miller K, O'Neill AJ, Chopra I. 2004. *Escherichia coli* mutators present an enhanced risk for emergence of antibiotic resistance during urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 48:23-9.
145. Vedantam G, Guay GG, Austria NE, Doktor SZ, Nichols BP. 1998. Characterization of mutations contributing to sulfathiazole resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 42:88-93.
146. Farrell DJ, Douthwaite S, Morrissey I, Bakker S, Poehlsgaard J, Jakobsen L, Felmingham D. 2003. Macrolide resistance by ribosomal mutation in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the PROTEKT 1999-2000 study. *Antimicrob Agents Chemother* 47:1777-83.
147. Pihlajamaki M, Kataja J, Seppala H, Elliot J, Leinonen M, Huovinen P, Jalava J. 2002. Ribosomal mutations in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 46:654-8.
148. Wolter N, Smith AM, Farrell DJ, Schaffner W, Moore M, Whitney CG, Jorgensen JH, Klugman KP. 2005. Novel mechanism of resistance to oxazolidinones, macrolides, and chloramphenicol in ribosomal protein L4 of the pneumococcus. *Antimicrob Agents Chemother* 49:3554-7.
149. Marvig RL, Sondergaard MS, Damkiaer S, Hoiby N, Johansen HK, Molin S, Jelsbak L. 2012. Mutations in 23S rRNA confer resistance against azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 56:4519-21.
150. Villa L, Feudi C, Fortini D, Garcia-Fernandez A, Carattoli A. 2014. Genomics of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 512 clone highlights the role of RamR and ribosomal S10 protein mutations in conferring tigecycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 58:1707-12.
151. Lupien A, Gingras H, Leprohon P, Ouellette M. 2015. Induced tigecycline resistance in *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals mutations in ribosomal proteins and rRNA. *J Antimicrob Chemother* 70:2973-80.

152. Beabout K, Hammerstrom TG, Perez AM, Magalhaes BF, Prater AG, Clements TP, Arias CA, Saxer G, Shamoo Y. 2015. The ribosomal S10 protein is a general target for decreased tigecycline susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 59:5561-6.
153. Chiu SK, Huang LY, Chen H, Tsai YK, Liou CH, Lin JC, Siu LK, Chang FY, Yeh KM. 2017. Roles of ramR and tet(A) Mutations in Conferring Tigecycline Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 61.
154. Sibold C, Henrichsen J, Konig A, Martin C, Chalkley L, Hakenbeck R. 1994. Mosaic pbpX genes of major clones of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* have evolved from pbpX genes of a penicillin-sensitive *Streptococcus oralis*. *Mol Microbiol* 12:1013-23.
155. Jost C, Bidet P, Carrere T, Mariani-Kurkdjian P, Bonacorsi S. 2016. Susceptibility of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to azithromycin in France and analysis of resistance mechanisms. *J Antimicrob Chemother* 71:1183-7.
156. Schroeder MR, Stephens DS. 2016. Macrolide Resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol* 6:98.
157. Zhou Y, Yu H, Guo Q, Xu X, Ye X, Wu S, Guo Y, Wang M. 2010. Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29:1349-53.
158. Then RL. 1982. Mechanisms of resistance to trimethoprim, the sulfonamides, and trimethoprim-sulfamethoxazole. *Rev Infect Dis* 4:261-9.
159. Gingras H, Patron K, Bhattacharya A, Leprohon P, Ouellette M. 2019. Gain and loss of function screens coupled to next generation sequencing for antibiotic mode of action and resistance studies in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* doi:10.1128/AAC.02381-18.
160. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. 2017. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 41:252-275.
161. Poirel L, Madec JY, Lupo A, Schink AK, Kieffer N, Nordmann P, Schwarz S. 2018. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 6.
162. Fernandez L, Hancock RE. 2012. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev* 25:661-81.
163. Motta SS, Cluzel P, Aldana M. 2015. Adaptive resistance in bacteria requires epigenetic inheritance, genetic noise, and cost of efflux pumps. *PLoS One* 10:e0118464.
164. Sandegren L, Andersson DI. 2009. Bacterial gene amplification: implications for the evolution of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 7:578-88.
165. Perfeito L, Fernandes L, Mota C, Gordo I. 2007. Adaptive mutations in bacteria: high rate and small effects. *Science* 317:813-5.
166. Fernandez L, Gooderham WJ, Bains M, McPhee JB, Wiegand I, Hancock RE. 2010. Adaptive resistance to the "last hope" antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS. *Antimicrob Agents Chemother* 54:3372-82.
167. Braoudaki M, Hilton AC. 2004. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *J Clin Microbiol* 42:73-8.

168. Pinho MG, Kjos M, Veening JW. 2013. How to get (a)round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. *Nat Rev Microbiol* 11:601-14.
169. Tomasz A, Albino A, Zanati E. 1970. Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. *Nature* 227:138-40.
170. Moreillon P, Markiewicz Z, Nachman S, Tomasz A. 1990. Two bactericidal targets for penicillin in pneumococci: autolysis-dependent and autolysis-independent killing mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother* 34:33-9.
171. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA. 2008. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* 32:149-67.
172. Filipe SR, Tomasz A. 2000. Inhibition of the expression of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by inactivation of cell wall muropeptide branching genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4891-6.
173. Gautam A, Vyas R, Tewari R. 2011. Peptidoglycan biosynthesis machinery: a rich source of drug targets. *Crit Rev Biotechnol* 31:295-336.
174. van Heijenoort J. 2007. Lipid intermediates in the biosynthesis of bacterial peptidoglycan. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:620-35.
175. Zapun A, Philippe J, Abrahams KA, Signor L, Roper DI, Breukink E, Vernet T. 2013. In vitro reconstitution of peptidoglycan assembly from the Gram-positive pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *ACS Chem Biol* 8:2688-96.
176. Ruiz N. 2015. Lipid Flippases for Bacterial Peptidoglycan Biosynthesis. *Lipid Insights* 8:21-31.
177. Sham LT, Butler EK, Lebar MD, Kahne D, Bernhardt TG, Ruiz N. 2014. Bacterial cell wall. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science* 345:220-2.
178. Kumar S, Rubino FA, Mendoza AG, Ruiz N. 2019. The bacterial lipid II flippase MurJ functions by an alternating-access mechanism. *J Biol Chem* 294:981-990.
179. Kocaoglu O, Tsui HC, Winkler ME, Carlson EE. 2015. Profiling of beta-lactam selectivity for penicillin-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Antimicrob Agents Chemother* 59:3548-55.
180. Dik DA, Fisher JF, Mobashery S. 2018. Cell-Wall Recycling of the Gram-Negative Bacteria and the Nexus to Antibiotic Resistance. *Chem Rev* 118:5952-5984.
181. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 32:234-58.
182. Dhar S, Kumari H, Balasubramanian D, Mathee K. 2018. Cell-wall recycling and synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* - their role in the development of resistance. *J Med Microbiol* 67:1-21.
183. Sutaria DS, Moya B, Green KB, Kim TH, Tao X, Jiao Y, Louie A, Drusano GL, Bulitta JB. 2018. First Penicillin-Binding Protein Occupancy Patterns of beta-Lactams and beta-Lactamase Inhibitors in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 62.
184. Yunck R, Cho H, Bernhardt TG. 2016. Identification of MltG as a potential terminase for peptidoglycan polymerization in bacteria. *Mol Microbiol* 99:700-18.
185. Jacq M, Arthaud C, Manuse S, Mercy C, Bellard L, Peters K, Gallet B, Galindo J, Doan T, Vollmer W, Brun YV, VanNieuwenhze MS, Di Guilmi AM, Vernet T, Grangeasse C, Morlot C. 2018. The cell wall hydrolase Pmp23 is important for

- assembly and stability of the division ring in *Streptococcus pneumoniae*. *Sci Rep* 8:7591.
186. Park JT, Uehara T. 2008. How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiol Mol Biol Rev* 72:211-27, table of contents.
 187. Vermassen A, Leroy S, Talon R, Provot C, Popowska M, Desvaux M. 2019. Cell Wall Hydrolases in Bacteria: Insight on the Diversity of Cell Wall Amidases, Glycosidases and Peptidases Toward Peptidoglycan. *Front Microbiol* 10:331.
 188. Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S. 2008. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev* 32:259-86.
 189. Bartual SG, Straume D, Stamsas GA, Munoz IG, Alfonso C, Martinez-Ripoll M, Havarstein LS, Hermoso JA. 2014. Structural basis of PcsB-mediated cell separation in *Streptococcus pneumoniae*. *Nat Commun* 5:3842.
 190. Bai XH, Chen HJ, Jiang YL, Wen Z, Huang Y, Cheng W, Li Q, Qi L, Zhang JR, Chen Y, Zhou CZ. 2014. Structure of pneumococcal peptidoglycan hydrolase LytB reveals insights into the bacterial cell wall remodeling and pathogenesis. *J Biol Chem* 289:23403-16.
 191. Eldholm V, Johnsborg O, Haugen K, Ohnstad HS, Havarstein LS. 2009. Fratricide in *Streptococcus pneumoniae*: contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC. *Microbiology* 155:2223-34.
 192. Abdullah MR, Gutierrez-Fernandez J, Pribyl T, Gisch N, Saleh M, Rohde M, Petruschka L, Burchhardt G, Schwudke D, Hermoso JA, Hammerschmidt S. 2014. Structure of the pneumococcal l,d-carboxypeptidase DacB and pathophysiological effects of disabled cell wall hydrolases DacA and DacB. *Mol Microbiol* 93:1183-206.
 193. E P, B D, C F, O D, T V, Am DG. 2008. The Inactivation of a New Peptidoglycan Hydrolase Pmp23 Leads to Abnormal Septum Formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Open Microbiol J* 2:107-14.
 194. Tsui HC, Zheng JJ, Magallon AN, Ryan JD, Yunck R, Rued BE, Bernhardt TG, Winkler ME. 2016. Suppression of a deletion mutation in the gene encoding essential PBP2b reveals a new lytic transglycosylase involved in peripheral peptidoglycan synthesis in *Streptococcus pneumoniae* D39. *Mol Microbiol* 100:1039-65.
 195. Heidrich C, Templin MF, Ursinus A, Merdanovic M, Berger J, Schwarz H, de Pedro MA, Holtje JV. 2001. Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 41:167-78.
 196. Uehara T, Dinh T, Bernhardt TG. 2009. LytM-domain factors are required for daughter cell separation and rapid ampicillin-induced lysis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 191:5094-107.
 197. Lee M, Heseck D, Llarrull LI, Lastochkin E, Pi H, Boggess B, Mobashery S. 2013. Reactions of all *Escherichia coli* lytic transglycosylases with bacterial cell wall. *J Am Chem Soc* 135:3311-4.
 198. Yakhnina AA, McManus HR, Bernhardt TG. 2015. The cell wall amidase AmiB is essential for *Pseudomonas aeruginosa* cell division, drug resistance and viability. *Mol Microbiol* 97:957-73.

199. Rivera I, Molina R, Lee M, Mobashery S, Hermoso JA. 2016. Orthologous and Paralogous AmpD Peptidoglycan Amidases from Gram-Negative Bacteria. *Microb Drug Resist* 22:470-6.
200. Boersma MJ, Kuru E, Rittichier JT, VanNieuwenhze MS, Brun YV, Winkler ME. 2015. Minimal Peptidoglycan (PG) Turnover in Wild-Type and PG Hydrolase and Cell Division Mutants of *Streptococcus pneumoniae* D39 Growing Planktonically and in Host-Relevant Biofilms. *J Bacteriol* 197:3472-85.
201. Johnson JW, Fisher JF, Mobashery S. 2013. Bacterial cell-wall recycling. *Ann N Y Acad Sci* 1277:54-75.
202. Rúben Fernandes PAaCP. 2013. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. *Reviews in Medical Microbiology* 24:7–17.
203. Rodloff AC, Goldstein EJ, Torres A. 2006. Two decades of imipenem therapy. *J Antimicrob Chemother* 58:916-29.
204. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. 2011. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother* 55:4943-60.
205. Heidrich C, Ursinus A, Berger J, Schwarz H, Holtje JV. 2002. Effects of multiple deletions of murein hydrolases on viability, septum cleavage, and sensitivity to large toxic molecules in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184:6093-9.
206. Novak R, Charpentier E, Braun JS, Tuomanen E. 2000. Signal transduction by a death signal peptide: uncovering the mechanism of bacterial killing by penicillin. *Mol Cell* 5:49-57.
207. Spratt BG. 1975. Distinct penicillin binding proteins involved in the division, elongation, and shape of *Escherichia coli* K12. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:2999-3003.
208. Kitano K, Tomasz A. 1979. Triggering of autolytic cell wall degradation in *Escherichia coli* by beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 16:838-48.
209. Bi E, Lutkenhaus J. 1993. Cell division inhibitors Sula and MinCD prevent formation of the FtsZ ring. *J Bacteriol* 175:1118-25.
210. Miller C, Thomsen LE, Gaggero C, Mosseri R, Ingmer H, Cohen SN. 2004. SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science* 305:1629-31.
211. Varma A, Young KD. 2004. FtsZ collaborates with penicillin binding proteins to generate bacterial cell shape in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 186:6768-74.
212. Vollmer W, Tomasz A. 2002. Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylase, a putative virulence factor in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 70:7176-8.
213. Tait-Kamradt AG, Cronan M, Dougherty TJ. 2009. Comparative genome analysis of high-level penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Drug Resist* 15:69-75.
214. Tran TD, Kwon HY, Kim EH, Kim KW, Briles DE, Pyo S, Rhee DK. 2011. Decrease in penicillin susceptibility due to heat shock protein ClpL in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 55:2714-28.
215. Novak R, Cauwels A, Charpentier E, Tuomanen E. 1999. Identification of a *Streptococcus pneumoniae* gene locus encoding proteins of an ABC phosphate transporter and a two-component regulatory system. *J Bacteriol* 181:1126-33.
216. Soualhine H, Brochu V, Menard F, Papadopoulou B, Weiss K, Bergeron MG, Legare D, Drummel-Smith J, Ouellette M. 2005. A proteomic analysis of penicillin

- resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals a novel role for PstS, a subunit of the phosphate ABC transporter. *Mol Microbiol* 58:1430-40.
217. Muller M, Marx P, Hakenbeck R, Bruckner R. 2011. Effect of new alleles of the histidine kinase gene *ciaH* on the activity of the response regulator *CiaR* in *Streptococcus pneumoniae* R6. *Microbiology* 157:3104-12.
 218. Zerfass I, Hakenbeck R, Denapate D. 2009. An important site in PBP2x of penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: mutational analysis of Thr338. *Antimicrob Agents Chemother* 53:1107-15.
 219. Fani F, Brotherton MC, Leprohon P, Ouellette M. 2013. Genomic analysis and reconstruction of cefotaxime resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 68:1718-27.
 220. Fani F, Leprohon P, Zhanel GG, Bergeron MG, Ouellette M. 2014. Genomic analyses of DNA transformation and penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 58:1397-403.
 221. Abraham EP, Chain E. 1988. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Rev Infect Dis* 10:677-8.
 222. Bush K. 2013. Proliferation and significance of clinically relevant beta-lactamases. *Ann N Y Acad Sci* 1277:84-90.
 223. Bush K. 2013. The ABCD's of beta-lactamase nomenclature. *J Infect Chemother* 19:549-59.
 224. Bush K, Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54:969-76.
 225. Queenan AM, Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 20:440-58, table of contents.
 226. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. 2011. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol* 19:588-95.
 227. Johnson AP, Woodford N. 2013. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *J Med Microbiol* 62:499-513.
 228. van Boxtel R, Wattel AA, Arenas J, Goessens WH, Tommassen J. 2017. Acquisition of Carbapenem Resistance by Plasmid-Encoded-AmpC-Expressing *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 61.
 229. Goessens WH, van der Bij AK, van Boxtel R, Pitout JD, van Ulsen P, Melles DC, Tommassen J. 2013. Antibiotic trapping by plasmid-encoded CMY-2 beta-lactamase combined with reduced outer membrane permeability as a mechanism of carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 57:3941-9.
 230. Bialek-Davenet S, Mayer N, Vergalli J, Duprilot M, Brisse S, Pages JM, Nicolas-Chanoine MH. 2017. In-vivo loss of carbapenem resistance by extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* during treatment via porin expression modification. *Sci Rep* 7:6722.
 231. Zamorano L, Moya B, Juan C, Mulet X, Blazquez J, Oliver A. 2014. The *Pseudomonas aeruginosa* CreBC two-component system plays a major role in the response to beta-lactams, fitness, biofilm growth, and global regulation. *Antimicrob Agents Chemother* 58:5084-95.

232. Zincke D, Balasubramanian D, Silver LL, Mathee K. 2016. Characterization of a Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme, PoxB, in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother* 60:936-45.
233. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. 2012. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol Med* 18:263-72.
234. Adler M, Anjum M, Andersson DI, Sandegren L. 2016. Combinations of mutations in *envZ*, *ftsI*, *mrda*, *acrB* and *acrR* can cause high-level carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 71:1188-98.
235. Done HY, Venkatesan AK, Halden RU. 2015. Does the Recent Growth of Aquaculture Create Antibiotic Resistance Threats Different from those Associated with Land Animal Production in Agriculture? *AAPS J* 17:513-24.
236. Manyi-Loh C, Mamphweli S, Meyer E, Okoh A. 2018. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules* 23.
237. Marshall BM, Levy SB. 2011. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microbiol Rev* 24:718-33.
238. Jabes D. 2011. The antibiotic R&D pipeline: an update. *Curr Opin Microbiol* 14:564-9.
239. Jenkins SG, Farrell DJ. 2009. Increase in pneumococcus macrolide resistance, United States. *Emerg Infect Dis* 15:1260-4.
240. Morones-Ramirez JR, Winkler JA, Spina CS, Collins JJ. 2013. Silver enhances antibiotic activity against gram-negative bacteria. *Sci Transl Med* 5:190ra81.
241. Shatalin K, Shatalina E, Mironov A, Nudler E. 2011. H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria. *Science* 334:986-90.
242. Baker S, Thomson N, Weill FX, Holt KE. 2018. Genomic insights into the emergence and spread of antimicrobial-resistant bacterial pathogens. *Science* 360:733-738.
243. Robins WP, Faruque SM, Mekalanos JJ. 2013. Coupling mutagenesis and parallel deep sequencing to probe essential residues in a genome or gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E848-57.
244. Kokes M, Dunn JD, Granek JA, Nguyen BD, Barker JR, Valdivia RH, Bastidas RJ. 2015. Integrating chemical mutagenesis and whole-genome sequencing as a platform for forward and reverse genetic analysis of Chlamydia. *Cell Host Microbe* 17:716-25.
245. Du H, Pan B, Chen T. 2017. Evaluation of chemical mutagenicity using next generation sequencing: A review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 35:140-158.
246. Feng J, Lupien A, Gingras H, Wasserscheid J, Dewar K, Legare D, Ouellette M. 2009. Genome sequencing of linezolid-resistant *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals novel mechanisms of resistance. *Genome Res* 19:1214-23.
247. Koser CU, Ellington MJ, Peacock SJ. 2014. Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. *Trends Genet* 30:401-7.
248. Rimoldi SG, Gentile B, Pagani C, Di Gregorio A, Anselmo A, Palozzi AM, Fortunato A, Pittiglio V, Ridolfo AL, Gismondo MR, Rizzardini G, Lista F. 2017. Whole genome sequencing for the molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated at the Italian ASST Fatebenefratelli Sacco Hospital, 2012-2014. *BMC Infect Dis* 17:666.

249. Rehman A, Patrick WM, Lamont IL. 2019. Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: new approaches to an old problem. *J Med Microbiol* 68:1-10.
250. Karger BL, Guttman A. 2009. DNA sequencing by CE. *Electrophoresis* 30 Suppl 1:S196-202.
251. Heather JM, Chain B. 2016. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics* 107:1-8.
252. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. 2012. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol* 2012:251364.
253. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, et al. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269:496-512.
254. Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453-62.
255. Hoskins J, Alborn WE, Jr., Arnold J, Blaszczyk LC, Burgett S, DeHoff BS, Estrem ST, Fritz L, Fu DJ, Fuller W, Geringer C, Gilmour R, Glass JS, Khoja H, Kraft AR, Lagace RE, LeBlanc DJ, Lee LN, Lefkowitz EJ, Lu J, Matsushima P, McAhren SM, McHenney M, McLeaster K, Mundy CW, Nicas TI, Norris FH, O'Gara M, Peery RB, Robertson GT, Rockey P, Sun PM, Winkler ME, Yang Y, Young-Bellido M, Zhao G, Zook CA, Baltz RH, Jaskunas SR, Rosteck PR, Jr., Skatrud PL, Glass JI. 2001. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. *J Bacteriol* 183:5709-17.
256. Greenleaf WJ, Sidow A. 2014. The future of sequencing: convergence of intelligent design and market Darwinism. *Genome Biol* 15:303.
257. Illumina. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology, www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html.
258. Shendure J, Ji H. 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 26:1135-45.
259. Kukurba KR, Montgomery SB. 2015. RNA Sequencing and Analysis. *Cold Spring Harb Protoc* 2015:951-69.
260. Croucher NJ, Thomson NR. 2010. Studying bacterial transcriptomes using RNA-seq. *Curr Opin Microbiol* 13:619-24.
261. McClure R, Balasubramanian D, Sun Y, Bobrovskyy M, Sumbly P, Genco CA, Vanderpool CK, Tjaden B. 2013. Computational analysis of bacterial RNA-Seq data. *Nucleic Acids Res* 41:e140.
262. Wolf JB. 2013. Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial. *Mol Ecol Resour* 13:559-72.
263. Bullard JH, Purdom E, Hansen KD, Dudoit S. 2010. Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments. *BMC Bioinformatics* 11:94.
264. Patti GJ, Yanes O, Siuzdak G. 2012. Innovation: Metabolomics: the apogee of the omics trilogy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13:263-9.
265. Martinez JL, Rojo F. 2011. Metabolic regulation of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 35:768-89.

266. Lee SW, Foley EJ, Epstein JA. 1944. Mode of Action of Penicillin: I. Bacterial Growth and Penicillin Activity-*Staphylococcus aureus* FDA. J Bacteriol 48:393-9.
267. Linares JF, Moreno R, Fajardo A, Martinez-Solano L, Escalante R, Rojo F, Martinez JL. 2010. The global regulator Crc modulates metabolism, susceptibility to antibiotics and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. Environ Microbiol 12:3196-212.
268. Peng B, Su YB, Li H, Han Y, Guo C, Tian YM, Peng XX. 2015. Exogenous alanine and/or glucose plus kanamycin kills antibiotic-resistant bacteria. Cell Metab 21:249-262.
269. Lupien A, Gingras H, Bergeron MG, Leprohon P, Ouellette M. 2015. Multiple mutations and increased RNA expression in tetracycline-resistant *Streptococcus pneumoniae* as determined by genome-wide DNA and mRNA sequencing. J Antimicrob Chemother 70:1946-59.
270. Pitt JJ. 2009. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. Clin Biochem Rev 30:19-34.
271. Davis-Turak J, Courtney SM, Hazard ES, Glen WB, Jr., da Silveira WA, Wesselman T, Harbin LP, Wolf BJ, Chung D, Hardiman G. 2017. Genomics pipelines and data integration: challenges and opportunities in the research setting. Expert Rev Mol Diagn 17:225-237.
272. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA. 2010. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome Res 20:1297-303.
273. Tatusov RL, Galperin MY, Natale DA, Koonin EV. 2000. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. Nucleic Acids Res 28:33-6.
274. Galperin MY, Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. 2015. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database. Nucleic Acids Res 43:D261-9.
275. Galperin MY, Kristensen DM, Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. 2017. Microbial genome analysis: the COG approach. Brief Bioinform doi:10.1093/bib/bbx117.
276. Restrepo MI, Babu BL, Reyes LF, Chalmers JD, Soni NJ, Sibila O, Faverio P, Cilloniz C, Rodriguez-Cintron W, Aliberti S. 2018. Burden and risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* community-acquired pneumonia: a multinational point prevalence study of hospitalised patients. Eur Respir J 52.
277. Nathwani D, Raman G, Sulham K, Gavaghan M, Menon V. 2014. Clinical and economic consequences of hospital-acquired resistant and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections: a systematic review and meta-analysis. Antimicrob Resist Infect Control 3:32.
278. Castanheira M, Deshpande LM, Mendes RE, Canton R, Sader HS, Jones RN. 2019. Variations in the Occurrence of Resistance Phenotypes and Carbapenemase Genes Among *Enterobacteriaceae* Isolates in 20 Years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Open Forum Infect Dis 6:S23-S33.
279. Pfaller MA, Mendes RE, Duncan LR, Flamm RK, Sader HS. 2018. In Vitro Activities of Ceftaroline and Comparators against *Streptococcus pneumoniae*

- Isolates from U.S. Hospitals: Results from Seven Years of the AWARE Surveillance Program (2010 to 2016). *Antimicrob Agents Chemother* 62.
280. Brooks WA, Chang LJ, Sheng X, Hopfer R. 2015. Safety and immunogenicity of a trivalent recombinant PcpA, PhtD, and PlyD1 pneumococcal protein vaccine in adults, toddlers, and infants: A phase I randomized controlled study. *Vaccine* 33:4610-7.
 281. Odutola A, Ota MOC, Antonio M, Ogundare EO, Saidu Y, Foster-Nyarko E, Owiafe PK, Ceesay F, Worwui A, Idoko OT, Owolabi O, Bojang A, Jarju S, Drammeh I, Kampmann B, Greenwood BM, Alderson M, Traskine M, Devos N, Schoonbroodt S, Swinnen K, Verlant V, Dobbelaere K, Borys D. 2017. Efficacy of a novel, protein-based pneumococcal vaccine against nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in infants: A phase 2, randomized, controlled, observer-blind study. *Vaccine* 35:2531-2542.
 282. Yang F, Gu J, Yang L, Gao C, Jing H, Wang Y, Zeng H, Zou Q, Lv F, Zhang J. 2017. Protective Efficacy of the Trivalent *Pseudomonas aeruginosa* Vaccine Candidate PcrV-OprI-Hcp1 in Murine Pneumonia and Burn Models. *Sci Rep* 7:3957.
 283. Hegerle N, Choi M, Sinclair J, Amin MN, Ollivault-Shiflett M, Curtis B, Laufer RS, Shridhar S, Brammer J, Toapanta FR, Holder IA, Pasetti MF, Lees A, Tennant SM, Cross AS, Simon R. 2018. Development of a broad spectrum glycoconjugate vaccine to prevent wound and disseminated infections with *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 13:e0203143.
 284. Merakou C, Schaefers MM, Priebe GP. 2018. Progress Toward the Elusive *Pseudomonas aeruginosa* Vaccine. *Surg Infect (Larchmt)* 19:757-768.
 285. Sheu CC, Chang YT, Lin SY, Chen YH, Hsueh PR. 2019. Infections Caused by Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: An Update on Therapeutic Options. *Front Microbiol* 10:80.
 286. Zhanel GG, Lawrence CK, Adam H, Schweizer F, Zelenitsky S, Zhanel M, Lagace-Wiens PRS, Walkty A, Denisuk A, Golden A, Gin AS, Hoban DJ, Lynch JP, 3rd, Karlowsky JA. 2018. Imipenem-Relebactam and Meropenem-Vaborbactam: Two Novel Carbapenem-beta-Lactamase Inhibitor Combinations. *Drugs* 78:65-98.
 287. Schmidt-Malan SM, Mishra AJ, Mushtaq A, Brinkman CL, Patel R. 2018. In Vitro Activity of Imipenem-Relebactam and Ceftolozane-Tazobactam against Resistant Gram-Negative Bacilli. *Antimicrob Agents Chemother* 62.
 288. Tomasz A. 1986. Penicillin-binding proteins and the antibacterial effectiveness of beta-lactam antibiotics. *Rev Infect Dis* 8 Suppl 3:S260-78.
 289. Janga SC, Contreras-Moreira B. 2010. Dissecting the expression patterns of transcription factors across conditions using an integrated network-based approach. *Nucleic Acids Res* 38:6841-56.
 290. Queenan AM, Shang W, Flamm R, Bush K. 2010. Hydrolysis and inhibition profiles of beta-lactamases from molecular classes A to D with doripenem, imipenem, and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 54:565-9.
 291. Lob SH, Hackel MA, Kazmierczak KM, Young K, Motyl MR, Karlowsky JA, Sahm DF. 2017. In Vitro Activity of Imipenem-Relebactam against Gram-Negative ESKAPE Pathogens Isolated by Clinical Laboratories in the United States in 2015 (Results from the SMART Global Surveillance Program). *Antimicrob Agents Chemother* 61.

292. Chia JH, Siu LK, Su LH, Lin HS, Kuo AJ, Lee MH, Wu TL. 2009. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* in Taiwan: resistance due to combined CMY-2 production and porin deficiency. *J Chemother* 21:621-6.
293. Fang ZL, Zhang LY, Huang YM, Qing Y, Cao KY, Tian GB, Huang X. 2014. OprD mutations and inactivation in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from China. *Infect Genet Evol* 21:124-8.
294. Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. 2009. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 53:4783-8.
295. Kloosterman TG, Hendriksen WT, Bijlsma JJ, Bootsma HJ, van Hijum SA, Kok J, Hermans PW, Kuipers OP. 2006. Regulation of glutamine and glutamate metabolism by GlnR and GlnA in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* 281:25097-109.
296. Hendriksen WT, Kloosterman TG, Bootsma HJ, Estevao S, de Groot R, Kuipers OP, Hermans PW. 2008. Site-specific contributions of glutamine-dependent regulator GlnR and GlnR-regulated genes to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 76:1230-8.
297. Hartel T, Klein M, Koedel U, Rohde M, Petruschka L, Hammerschmidt S. 2011. Impact of glutamine transporters on pneumococcal fitness under infection-related conditions. *Infect Immun* 79:44-58.
298. Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. 2014. Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res* 42:D199-205.
299. Morlot C, Straume D, Peters K, Hegnar OA, Simon N, Villard AM, Contreras-Martel C, Leisico F, Breukink E, Gravier-Pelletier C, Le Corre L, Vollmer W, Pietrancosta N, Havarstein LS, Zapun A. 2018. Structure of the essential peptidoglycan amidotransferase MurT/GatD complex from *Streptococcus pneumoniae*. *Nat Commun* 9:3180.
300. Haas W, Kaushal D, Sublett J, Obert C, Tuomanen EI. 2005. Vancomycin stress response in a sensitive and a tolerant strain of *Streptococcus pneumoniae*. *J Bacteriol* 187:8205-10.
301. Rogers PD, Liu TT, Barker KS, Hilliard GM, English BK, Thornton J, Swiatlo E, McDaniel LS. 2007. Gene expression profiling of the response of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin. *J Antimicrob Chemother* 59:616-26.
302. Majchrzykiewicz JA, Kuipers OP, Bijlsma JJ. 2010. Generic and specific adaptive responses of *Streptococcus pneumoniae* to challenge with three distinct antimicrobial peptides, bacitracin, LL-37, and nisin. *Antimicrob Agents Chemother* 54:440-51.
303. Guenzi E, Gasc AM, Sicard MA, Hakenbeck R. 1994. A two-component signal-transducing system is involved in competence and penicillin susceptibility in laboratory mutants of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol* 12:505-15.
304. Mascher T, Zahner D, Merai M, Balmelle N, de Saizieu AB, Hakenbeck R. 2003. The *Streptococcus pneumoniae* cia regulon: CiaR target sites and transcription profile analysis. *J Bacteriol* 185:60-70.
305. Halfmann A, Kovacs M, Hakenbeck R, Bruckner R. 2007. Identification of the genes directly controlled by the response regulator CiaR in *Streptococcus*

- pneumoniae*: five out of 15 promoters drive expression of small non-coding RNAs. Mol Microbiol 66:110-26.
306. Thermofisher. <https://www.thermofisher.com/ca/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/quantitative-proteomics.html>. Accessed
 307. Feng J, Billal DS, Lupien A, Racine G, Winstall E, Legare D, Leprohon P, Ouellette M. 2011. Proteomic and transcriptomic analysis of linezolid resistance in *Streptococcus pneumoniae*. J Proteome Res 10:4439-52.
 308. Lehrbach NJ, Ji F, Sadreyev R. 2017. Next-Generation Sequencing for Identification of EMS-Induced Mutations in *Caenorhabditis elegans*. Curr Protoc Mol Biol 117:7 29 1-7 29 12.
 309. Borukhov S, Nudler E. 2008. RNA polymerase: the vehicle of transcription. Trends Microbiol 16:126-34.
 310. Bowers CW, Dombroski AJ. 1999. A mutation in region 1.1 of sigma70 affects promoter DNA binding by *Escherichia coli* RNA polymerase holoenzyme. EMBO J 18:709-16.
 311. Campbell EA, Muzzin O, Chlenov M, Sun JL, Olson CA, Weinman O, Trester-Zedlitz ML, Darst SA. 2002. Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. Mol Cell 9:527-39.
 312. Bai H, You Y, Yan H, Meng J, Xue X, Hou Z, Zhou Y, Ma X, Sang G, Luo X. 2012. Antisense inhibition of gene expression and growth in gram-negative bacteria by cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids targeted to rpoD gene. Biomaterials 33:659-67.
 313. Lutkenhaus J, Pichoff S, Du S. 2012. Bacterial cytokinesis: From Z ring to divisome. Cytoskeleton (Hoboken) 69:778-90.
 314. Peters NT, Dinh T, Bernhardt TG. 2011. A fail-safe mechanism in the septal ring assembly pathway generated by the sequential recruitment of cell separation amidases and their activators. J Bacteriol 193:4973-83.
 315. Tsang MJ, Yakhnina AA, Bernhardt TG. 2017. NlpD links cell wall remodeling and outer membrane invagination during cytokinesis in *Escherichia coli*. PLoS Genet 13:e1006888.
 316. Gray AN, Egan AJ, Van't Veer IL, Verheul J, Colavin A, Koumoutsi A, Biboy J, Altelaar AF, Damen MJ, Huang KC, Simorre JP, Breukink E, den Blaauwen T, Typas A, Gross CA, Vollmer W. 2015. Coordination of peptidoglycan synthesis and outer membrane constriction during *Escherichia coli* cell division. Elife 4.
 317. Templin MF, Edwards DH, Holtje JV. 1992. A murein hydrolase is the specific target of bulgecin in *Escherichia coli*. J Biol Chem 267:20039-43.
 318. Costa CS, Anton DN. 2006. High-level resistance to mecillinam produced by inactivation of soluble lytic transglycosylase in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. FEMS Microbiol Lett 256:311-7.
 319. Cho H, Uehara T, Bernhardt TG. 2014. Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. Cell 159:1300-11.
 320. Dik DA, Madukoma CS, Tomoshige S, Kim C, Lastochkin E, Boggess WC, Fisher JF, Shrout JD, Mobashery S. 2019. Slt, MltD, and MltG of *Pseudomonas aeruginosa* as Targets of Bulgecin A in Potentiation of beta-Lactam Antibiotics. ACS Chem Biol 14:296-303.

321. McDowall KJ, Cohen SN. 1996. The N-terminal domain of the rne gene product has RNase E activity and is non-overlapping with the arginine-rich RNA-binding site. *J Mol Biol* 255:349-55.
322. Nurmohamed S, Vaidialingam B, Callaghan AJ, Luisi BF. 2009. Crystal structure of *Escherichia coli* polynucleotide phosphorylase core bound to RNase E, RNA and manganese: implications for catalytic mechanism and RNA degradosome assembly. *J Mol Biol* 389:17-33.
323. Cam K, Rome G, Krisch HM, Bouche JP. 1996. RNase E processing of essential cell division genes mRNA in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 24:3065-70.
324. Tamura M, Lee K, Miller CA, Moore CJ, Shirako Y, Kobayashi M, Cohen SN. 2006. RNase E maintenance of proper FtsZ/FtsA ratio required for nonfilamentous growth of *Escherichia coli* cells but not for colony-forming ability. *J Bacteriol* 188:5145-52.
325. Miller AK, Brannon MK, Stevens L, Johansen HK, Selgrade SE, Miller SI, Hoiby N, Moskowitz SM. 2011. PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother* 55:5761-9.
326. Gutu AD, Sgambati N, Strasbourger P, Brannon MK, Jacobs MA, Haugen E, Kaul RK, Johansen HK, Hoiby N, Moskowitz SM. 2013. Polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* phoQ mutants is dependent on additional two-component regulatory systems. *Antimicrob Agents Chemother* 57:2204-15.
327. Bem AE, Velikova N, Pellicer MT, Baarlen P, Marina A, Wells JM. 2015. Bacterial histidine kinases as novel antibacterial drug targets. *ACS Chem Biol* 10:213-24.
328. Gingras H, Dridi B, Leprohon P, Ouellette M. 2018. Coupling next-generation sequencing to dominant positive screens for finding antibiotic cellular targets and resistance mechanisms in *Escherichia coli*. *Microb Genom* 4.
329. Cowley LA, Low AS, Pickard D, Boinett CJ, Dallman TJ, Day M, Perry N, Gally DL, Parkhill J, Jenkins C, Cain AK. 2018. Transposon Insertion Sequencing Elucidates Novel Gene Involvement in Susceptibility and Resistance to Phages T4 and T7 in *Escherichia coli* O157. *MBio* 9.
330. Schembri MA, Zakour NL, Phan MD, Forde BM, Stanton-Cook M, Beatson SA. 2015. Molecular Characterization of the Multidrug Resistant *Escherichia coli* ST131 Clone. *Pathogens* 4:422-30.
331. Jana B, Cain AK, Doerrler WT, Boinett CJ, Fookes MC, Parkhill J, Guardabassi L. 2017. The secondary resistome of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Sci Rep* 7:42483.
332. Nolan LM, Whitchurch CB, Barquist L, Katrib M, Boinett CJ, Mayho M, Goulding D, Charles IG, Filloux A, Parkhill J, Cain AK. 2018. A global genomic approach uncovers novel components for twitching motility-mediated biofilm expansion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Genom* 4.
333. Tian P, Wang J, Shen X, Rey JF, Yuan Q, Yan Y. 2017. Fundamental CRISPR-Cas9 tools and current applications in microbial systems. *Synth Syst Biotechnol* 2:219-225.
334. Wang T, Guan C, Guo J, Liu B, Wu Y, Xie Z, Zhang C, Xing XH. 2018. Pooled CRISPR interference screening enables genome-scale functional genomics study in bacteria with superior performance. *Nat Commun* 9:2475.

335. Bikard D, Jiang W, Samai P, Hochschild A, Zhang F, Marraffini LA. 2013. Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res* 41:7429-37.
336. Wright GD. 2016. Antibiotic Adjuvants: Rescuing Antibiotics from Resistance. *Trends Microbiol* 24:862-871.
337. Meisel JW, Patel MB, Garrad E, Stanton RA, Gokel GW. 2016. Reversal of Tetracycline Resistance in *Escherichia coli* by Noncytotoxic bis(Tryptophan)s. *J Am Chem Soc* 138:10571-7.
338. Hsueh SC, Lee YJ, Huang YT, Liao CH, Tsuji M, Hsueh PR. 2019. In vitro activities of cefiderocol, ceftolozane/tazobactam, ceftazidime/avibactam and other comparative drugs against imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, and *Stenotrophomonas maltophilia*, all associated with bloodstream infections in Taiwan. *J Antimicrob Chemother* 74:380-386.
339. Watkins RR, Van Duin D. 2019. Current trends in the treatment of pneumonia due to multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *F1000Res* 8.
340. Karaiskos I, Galani I, Souli M, Giamarellou H. 2019. Novel beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations: expectations for the treatment of carbapenem-resistant Gram-negative pathogens. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 15:133-149.

Annexes

La grande taille de certains tableaux supplémentaires du chapitre 8 ne nous permet pas de les inclure dans un fichier word, ainsi ils seront fournis en annexe dans des fichiers excels :

Table S2. *E. coli* mutants and their corresponding mutations

Table S3. *K. pneumoniae* mutants and their corresponding mutations

Table S4. *P. aeruginosa* mutants and their corresponding mutations

Table S5. Common COGs amongst the three species

Table S6. Common mutated genes amongst *E. coli* mutants

Table S7. Common mutated genes amongst *P. aeruginosa* mutants