HAL open science

Mécanismes de la résistance à la colistine chez les bactéries à gram négatif

Sophie Baron

To cite this version:

Sophie Baron. Mécanismes de la résistance à la colistine chez les bactéries à gram négatif. Sciences pharmaceutiques. 2017. dumas-01587854

HAL Id: dumas-01587854

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01587854v1

Submitted on 14 Sep 2017

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

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

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le Vendredi 8 Septembre 2017

Par Mme **Sophie BARON**.
Née le 16 Juin 1989 à Toulon

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

MECANISMES DE LA RESISTANCE A LA COLISTINE CHEZ LES BACTERIES A GRAM NEGATIF.

----oOo----

JURY :

Président : Mr le Professeur Philippe COLSON

Membres : Pr Jean-Marc ROLAIN – Directeur de Thèse

Pr Pierre-Edouard FOURNIER - Professeur des Université-Praticien Hospitalier AP-HM.

Dr Gregory DUBOURG – Pharmacien Assistant Hospitalo-Universitaire AP-HM

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le Vendredi 8 Septembre 2017

Par Mme **Sophie BARON**.
Née le 16 Juin 1989 à Toulon

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

MECANISMES DE LA RESISTANCE A LA COLISTINE CHEZ LES BACTERIES A GRAM NEGATIF.

----oOo----

JURY :

Président : Mr le Professeur Philippe COLSON

Membres : Pr Jean-Marc ROLAIN – Directeur de Thèse

Pr Pierre-Edouard FOURNIER - Professeur des Université-Praticien Hospitalier AP-HM.

Dr Gregory DUBOURG – Pharmacien Assistant Hospitalo-Universitaire AP-HM

Faculté de Pharmacie
Aix-Marseille Université

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

Doyen :	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Vice-Doyens :	M. Jean-Paul BORG, M. Philippe CHARPIOT, M. Pascal RATHELOT
Chargés de Mission :	M. David BERGE-LEFRANC, M. François DEVRED, Mme Caroline DUCROS, Mme Pascale BARBIER
Conseiller du Doyen :	M. Patrice VANELLE
Doyens honoraires :	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
Professeurs émérites :	M. José SAMPOL, M. Jean-Pierre REYNIER
Professeurs honoraires :	M. Guy BALANSARD, M. Jacques BARBE, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI,
Chef des Services Administratifs :	Mme Florence GAUREL
Chef de Cabinet :	Mme Sandrine NOURIAN
Responsable de la Scolarité :	Mme Myriam TORRE

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Philippe PICCERELLE

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 bd Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12 - www.pharmacie.univ-mrs.fr

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	M. Robert GILLI Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER M. François DEVRED Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pascal PRINDERRE M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
NUTRITION ET DIETETIQUE	M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

CULTURE ET THERAPIE CELLULAIRE	M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS	Mme Caroline MONTET

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Philippe CHARPIOT
BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN Mme Florence SABATIER-MALATERRE
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 bd Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12 - www.pharmacie.univ-mrs.fr

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Nathalie BARDIN Mme Dominique ARNOUX Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Sylvie COINTE

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Henri PORTUGAL Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 bd Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12 - www.pharmacie.univ-mrs.fr

PROFESSEURS ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (P.A.S.T.)

GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE	M. Jean-Pierre CALISSI

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Elisabeth SCHREIBER-DETURMENY Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Catherine DIANA Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Thierry ATHUYT
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	M. Philippe BESSON

AHU

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	Mme Manon ROCHE

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	Mme Camille DESGROUAS

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 bd Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12 - www.pharmacie.univ-mrs.fr

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE
Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Athanassios ILIADIS
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	Mme Suzanne MOUTERDE-MONJANEL
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Hot BUN M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD M. Stéphane HONORÉ Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACODYNAMIE	M. Philippe GARRIGUE

ATER

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlel BOUHLEL

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 bd Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12 - www.pharmacie.univ-mrs.fr

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Nathalie AUSIAS, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Gérard CARLES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Nicole FRANCOIS, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Christine PENOT-RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Alain RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

Mise à jour le 1er décembre 2015

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 bd Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12 - www.pharmacie.univ-mrs.fr

Remerciements,

Au Professeur Didier Raoult, qui m'a accueillie dans son laboratoire.

Au Professeur Philippe Colson qui m'a fait l'honneur d'être mon Président de Thèse.

Au Professeur Pierre-Edouard Fournier, qui a gentiment accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Au Professeur Jean-Marc Rolain, qui m'a accueilli dans son équipe il y a trois ans pour mon Master II, qui a initié ce travail et m'a donné le goût de la recherche.

Au Docteur Gregory Dubourg, qui a accepté d'être membre de mon jury de thèse après avoir été mon co-interne, mon assistant, mon conseiller professionnel et relecteur de papiers. Merci pour ta disponibilité et pour ton humour légendaire.

Au Docteur Frédérique Gouriet qui m'a fait aimer et apprendre la bactériologie pendant mon premier choix. Merci pour ton énergie, ton franc-parler et ta façon de rendre toute anecdote drôle.

Au Docteur Jean-Paul Casalta, qui m'a fait confiance et m'offre toujours le petit-déjeuner et de bonnes histoires en astreinte.

Merci à mes co-internes durant toutes ces années, d'abord les plus vieux en particulier la team hémato, Lakhdar, Vanessa, Pierre-Antoine, Pierre, Nader et Manal qui m'ont plus appris sur Fifa, le foot, le basket, le tennis et la nourriture libanaise que sur l'hemato. Et les plus jeunes (parfois pas si jeunes) qui sont passés en bactério, Robin, Emma, Pierre, Thomas, Baidy, Paul et les autres…: je me suis parfois énervée mais j'ai toujours passé d'excellents choix à vos côtés.

A Guillaume, mon co-interne de longue date (6 choix ensemble quand même + 1 master II), à l'humour parfois déroutant, espèce rare en provenance de Normandie, préférant le cidre et le camembert au pastis et à la navette et passionné de fonds marins.

A mes premières co-internes, les intrépides et inimitables Raqui, Shishi et Kaka (pour intrépides, l'appellation est actuellement en révision étant donné certains éléments apparus récemment), celles qui ont osées s'exiler dans le grand Nord en 1er choix d'internat ! Cinq années ont passées depuis et des tas de souvenirs, et même si vous vous êtes toutes exilées pendant un temps de Marseille (certaines vont même recommencer, quelle idée !), cette ville n'a pas le même goût sans vous. Mention spéciale au 5ème membre de cette team, Omar,

toujours présent pour deviner des jingles ou une pub tv, et pour refaire le monde jusqu'au bout de la nuit quand les autres dorment sur le canapé…

A l'équipe de recherche du Pr Rolain, et plus particulièrement mes cointernes IPR Stéphanie et Lucie B, ma technicienne/étudiante/coloc de congrès Linda, Liliane et Selma qui ont commencé cette galère en même temps que moi, Win, Teresa, Charbel, Abiola et Amar, qui m'ont tout appris quand je suis arrivée, et tout le reste de l'équipe, Rym, Adèle, Edgarthe, Kodjovi, Rava, Miamyam, Lucie P, Hanane, Najla… toujours disponibles et prêts à me faire découvrir de nouveaux plats délicieux.

A mes colocs de la P1, avec qui j'aurai passé une belle première année: la Caille, ma choupy d'amour, la Goth, la Bourr, et Princesse Patoune. A mes autres colocs de P2, de toutes ces années fac et compagnons des week-ends les plus intenses avec qui nous fêtons 10 ans d'amour déjà, Mama, Beber, Claire la barth, Pierre et Zoe (dont j'écrirai le prénom en entier pour une fois), Toto, Fred, Jo' : j'attends les 10 prochaines avec impatience, combien de fois encore referons-nous la descente de l'Ardèche ? Et à tous les copains qui se sont rajoutés depuis, Chloé, Svet, Guillaume, Thibault, Tim, JB… Damien le Breton, et Toto d'Aix, mes deux expat' réfugiés à Marseille (ou presque), et à Tristan qui ne rentre dans aucune de ces catégories voir aucune catégorie tout court et qui m'aura fait bien rire toutes ces années avec ses histoires et ses galères toujours plus folles. Parce que oui, il est chirurgien, il sait ce qu'il fait !

A mes amis Pharma qui sont parties de l'autre côté de la région PACA, Petite mention aux nuits de révisions avec Jean, où seule l'euphytose est parvenue à bout de nos rires, à Fanny qui même à 5h du matin en sorti du Hush était prête à nous préparer des crêpes, et à Marion C. qui aura fini par m'avouer à la fin que Marseille était une belle ville quand même…

A mes amis Pharma qui eux sont restés du bon côté de la région, mon couple C^2 devenu C^3 il y a peu, qui vous trouvent les meilleurs petits boulots de Marseille, avec soirées endiablées et pause déjeuner dans la piscine, et sont les pros de l'apéro de dernières minutes. Et à Marion M., toujours partante pour l'apéro.

A mon binôme préféré, le seul et l'unique « Loulou », les meilleurs bras qu'on puisse trouver pour les tp, et maintenant le meilleur pharmacien du bd Baille (mais pour combien de temps encore ?). On a été les deux rescapés de l'amphi tout en haut à gauche en P1 et on ne s'est plus quitté après, malgré toutes les frayeurs que j'ai pu te causer avec mon éternel ¼ d'heure de politesse marseillaise…

Même si on ne se voit pas autant que je le voudrais, ces années facs ont été très belles grâce à vous, autant sur les bancs de la fac à s'occuper pendant ces heures pas toujours très passionnantes, que pendant tous ces apéros, soirées pharma et Muevelo réalisés à la perfection !

Aux membres du « staff » du centre Laennec, notamment à ceux des première heures, Anne et Olivier, et aux pères Olivier de Framont et Pierre Clermidy qui m'ont permis de considérer le CCM comme ma maison pendant 8 ans.

A mes amis Toulonnais, mon plus vieil ami Benoit: rencontré à la rentrée des classes à un arrêt de bus en 6ème, tu auras vite fait de devenir omniprésent dans ma vie : dans la même classe en 6ème, dans le même cours de théâtre, habitant à 200 m et squattant tous les jours chez nous ; ma sœur Alice, ma partenaire de vie pendant 17 années, mon quatre mains au piano, mon moi lunaire, mystérieuse et si drôle parfois à son insu; Jojo, mon voisin de table au lycée, partenaire de babyfoot, ensemble tous les jours de 8h à 20 h; et ma Cha, ma voisine pendant plus de 15 ans, à Toulon comme à Marseille et ma partenaire la plus assidue de natation. Parce que Toulon ça mourillone mais qu'on s'y ennuie bien dur de temps en temps, je n'aurai pas pu garder autant de bons souvenirs de cette ville sans vous ! de la danse de vélos au soirées au cabanon, en passant par l'invention de la marque de jeux d'extérieur Sobénal®, de la journée mondiale du gâteau aux yaourt (grand succès), des soirées nouvelle star ou blind test il s'en est passé des choses en 7 ans ! Et c'est pas fini ! Car c'est en s'éloignant qu'on reconnaît ses vrais amis et même si nous n'habitons plus la même ville depuis 10 ans, jamais nous ne nous sommes séparés.

Aux membres du CCGM, Marie, ma partenaire de natation qui passait plus de temps sur les bancs que dans l'eau et qui se retrouve aujourd'hui à faire du triathlon (qui l'aurait cru à cette époque franchement ?) et ma voisine de table en terminale devenue voisine d'appart à Marseille Sarah. Avec vous, j'aurai parcouru les calanques de fond en comble (et il y a encore tant de choses à découvrir Marie), fais des raquettes et construit le plus grand igloo que les Pyrénnées aient connues, descendu l'Ardèche (encore elles) en kayak et bientôt fait le tour du Canigou (j'ai ôté toutes les parties raclettes, soirées et autres pour donner l'impression d'un club très sportif). Petite mention à Camille (1er français à l'Ironman d'Hambourg oui monsieur !), athlète invétéré que l'on soutient à fond toujours partant pour des week-ends sportifs.

A Romano del Potro, M'hamel, la Caille, mon enfant, mon trouple, mon frère, mon ogre, mon coloc, mon voisin, mon correcteur d'orthographe depuis peu, tu auras eu tellement de rôles en

10 ans ! Qu'est-ce qu'il se serait passé si j'avais été sympathique sur ces escalators du centre Mayol ? Alors tu m'auras parfois rendue dingue avec ton humeur d'ogre mais je t'aurais bien rendu la pareille avec mon caractère de dragon. Mais je me demande bien avec qui j'aurai pu boire mon thé de minuit tous les soirs en p1 sans toi, discuter devant un poulet au curry tout en sirotant un petit côti environ 3 fois par semaine pendant 7 ans sans toi, ou savoir où dénicher les meilleurs pains aux raisins sans toi. Et comment j'aurai pu mettre la meilleure ambiance dans mon appart sans toi, parce que oui, ELLE EST OU L'AMBIANCE ?? pas sûre que beaucoup de coloc organise des 19-21h de danse obligatoire, des soirées ski sur le balcon ou des ventresglissent dans le couloir. C'est trop difficile de résumer 10 ans en si peu de place alors merci pour ce soutien infaillible pendant toutes ces années, et merci d'avoir mis Chachoune dans ma vie qui je le sens te remplacera très vite pour les danses de canapé quand elle deviendra (enfin !) ma voisine ;).

A Yo, Jean-Philippe, Sylvie, Jean-Pierre, Anne-Marie et tous les autres membres de cette grande belle-famille Franco-Canado-Marocaine, qui m'ont accueillie à bras ouverts pendant toutes ces années.

A ma grand-mère « Mauri » pour les intimes, ma première fan, la meilleure pizzaïolo de France (et peut être même au-delà) et la meilleure mémé du monde, merci de me faire l'honneur de ta présence et de celle d'André aujourd'hui.

A mes parents, Thierry et Liliane, ces France trotters qui m'auront donné le goût de la découverte et de la science, mais toujours pas réussi à me transmettre l'amour du bridge. Je vous ai toujours laissé un peu en dehors de mes études mais vous m'avez toujours suivis et avez toujours était là pour moi quand j'en avais besoin.

Enfin à Kevin (prononcé à l'américaine, rien à voir avec la vague des boys band des années 90s). Tu as toujours été là pour moi depuis mes 19 ans, depuis que j'ai succombé à ton déhanché en soirée et à tes cicatrices de griffes de tigre, et que nous avons partagé une petite chambre de 9 m^2 à deux. Tu m'auras soutenue et réconfortée à base d'arabies, de pisco, sur un bon fond de patience, d'humour et de gentillesse dans tous les moments, importants comme insignifiants pendant toutes ces années de fac. Nos 9 premières années sont passées si vite et ont été si intenses, j'ai hâte de voir la suite !

« L'UNIVERSITE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES. CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEURS AUTEURS. »

Table des matières

I. INTRODUCTION 9

II. STRUCTURE ET MECANISME D'ACTION DE LA COLISTINE 10

III. MECANISMES DE RESISTANCE A LA COLISTINE CHEZ LES ENTEROBACTERIES 11
1. Mécanismes d'origine chromosomique 11
a. Modification du lipopolysaccharide par ajout du 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-ara4N) et/ou de la phosphoéthanolamine 11
b. Autres modifications du lipopolysaccharide 14
c. Mécanisme d'efflux 15
d. Formation de capsule 16
2. Mécanisme d'origine plasmidique : gène *mcr-1* 16

IV. EPIDEMIOLOGIE DE LA RESISTANCE A LA COLISTINE CHEZ LES ENTEROBACTERIES EN EUROPE 20

V. OBJECTIFS 23

VI. MECANISMES MOLECULAIRES DE LA RESISTANCE A LA COLISTINE CHEZ LES BACTERIES A GRAM NEGATIF. 25

VII. TRAVAUX DE RECHERCHE 35
1. Etude du mécanisme moléculaire de la résistance à la colistine chez *Proteus vulgaris*. 35
2. Etude du rôle de l'efflux dans la résistance à la colistine chez les entérobactéries. 70

VIII. FACTEURS DE RISQUES ET MECANISMES DE RESISTANCE A LA COLISTINE A L'HOPITAL DE LA TIMONE, MARSEILLE. 89
1. Introduction 89
2. Matériels et méthodes 90
a. Design de l'étude et patients. 90
b. Procédures microbiologiques 91
c. Etude statistique 92
3. Résultats 93
a. Facteurs de risque, caractéristiques cliniques et mortalité 93
b. Sensibilité aux antibiotiques. 97
c. Mécanismes moléculaires impliqués. 99
4. Discussion 102

IX. CONCLUSION 105

X. PERSPECTIVES 107

XI. REFERENCES 108

XII. Liste des autres publications scientifiques 118

LISTE DES TABLES ET FIGURES

Figures :

Figure 1. Mécanismes de résistance à la colistine décrits chez *K. pneumoniae*.....18

Figure 2. Mécanismes de résistance à la colistine décrits chez *E. coli* et *Salmonella spp*. En haut à droite. Description génétiques des cassettes de résistance enfermant les gènes *mcr-1* et *mcr-2*. 19

Figure 3. a. Insertion d'une IS10 dans le gène *mgrB* de la souche KP15CR conduisant à l'inactivation du gène. b. Délétion de 10 nucléotides dans le gène *mgrB* de la souche KP8CR conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée. 100

Tableaux :

Tableau 1. Publications rapportant des entérobactéries porteuses du gène *mcr-1* et isolées de l'Homme en Europe. 22

Tableau 2. Liste des amorces utilisées dans cette étude pour la PCR standard et le séquençage des genes de résistance à la colistine. 92

Tableau 3. Résultat de l'analyse univariée des facteurs de risque d'acquisition de *K. pneumoniae* résistante à la colistine comparée aux patients contrôles ayant acquis une souche de *K. pneumoniae* sensible à la colistine (colonnes de gauche) et de l'analyse univariée entre les patients infectés et les patients colonisés à *K. pneumoniae* résistante à la colistine (colonnes de droite). 94

Tableau 4. Taux de résistance et analyse statistique univariées des différents antibiotiques testés des groupes KPCR et KPCS. AMC=amoxicilline + acide clavulanique ; TZP= piperacilline + tazobactam ; CRO= ceftriaxone ; FEP= céfépime ; ETP=ertapénème ; IPM= imipénème ; MER=meropénème ; ATM= aztreonam ; GN= gentamicine ; AK= amikacine ; CIP= ciprofloxacine ; FF= fosfomycine ; DO= doxycycline ; SXT= cotrimoxazole ; RA= rifampicine ; TIGE= tigecycline.....98

Tableau 5. Résumé des caractéristiques biologiques des 16 souches de *K. pneumoniae* pour lequel l'analyse moléculaire a été effectuée. Les mutations en gras ont été évaluées comme potentiellement délétères pour la fonction protéique par le logiciel PROVEAN.....101

I. INTRODUCTION

La résistance bactérienne aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique. L'augmentation de sa prévalence a été particulièrement rapportée chez les bactéries à Gram négatif (1), notamment *Pseudomonas aeruginosa* (2), *Acinetobacter baumannii* (2, 3) et les *Enterobacteriaceae* (4, 5). Les infections causées par ces microorganismes ont amené les cliniciens à utiliser les carbapénèmes, longtemps considérés comme des antibiotiques de dernier recours. L'émergence de bactéries résistantes aux carbapénèmes et leur propagation à l'échelle mondiale, conjuguées à la pénurie de commercialisation de nouveaux antibactériens, ont conduit la communauté médicale à réutiliser d'anciennes molécules, souvent abandonnées du fait de leur toxicité (6-8), en particulier les polymyxines, des peptides cationiques antimicrobiens naturels synthétisés par *Bacillus polymyxa* et découverts en 1947 (9). Seules deux molécules de cette famille sont employées en pratique clinique, la polymyxine B et la polymyxine E ou colistine (6). Après leur utilisation dans les années 1960-1970, du fait de leur néphrotoxicité et de leur neurotoxicité, elles ont été abandonnées au profit des céphalosporines, bêta-lactamines à large spectre apparues dans les années 1980 et beaucoup moins toxiques (10). Les polymyxines étaient néanmoins toujours administrées en aérosol pour traiter les pneumopathies nosocomiales survenant chez les patients atteints de mucoviscidose, et *per os* dans le cadre de protocole de décontamination digestive en raison de l'absence d'absorption intestinale (6). L'augmentation de leur utilisation ces dernières années a abouti à l'émergence de la résistance bactérienne à la colistine (11-13). Jusqu'à récemment, seule la résistance chromosomique était connue, avec une prévalence limitée (11-13). Cependant, un nouveau mécanisme de résistance d'origine plasmidique, - et donc transférable -, nommé *mcr-1*, a été découvert fin 2015 chez les entérobactéries (14), modifiant complètement l'épidémiologie et la prise en charge des patients porteurs de bactéries hébergeant *mcr-1*. Dans cette revue, après avoir rappelé le mécanisme d'action de la colistine, nous détaillerons les différents mécanismes de résistance ainsi que leur prévalence chez les Entérobactéries en Europe.

(Extrait des Feuillets de la Biologie, sous presse, 2017).

Ce travail de thèse va se diviser en 3 parties : une première partie va consister à faire un état des lieux des mécanismes de résistance à la colistine identifiés à ce jour dans la littérature ainsi que de définir l'épidémiologie de la résistance à la colistine, notamment en Europe. Une deuxième partie concernera mes travaux de recherche sur la recherche de nouveaux

mécanismes de résistance à la colistine. Enfin, une troisième partie portera sur une étude cas/témoins des patients chez lequel nous avons isolé des souches de *Klebsiella pneumoniae* résistantes à la colistine.

II. STRUCTURE ET MECANISME D'ACTION DE LA COLISTINE

(Extrait des Feuillets de la Biologie, sous presse, 2017).

La colistine (polymyxine E) est un peptide cationique antimicrobien de la famille des polymyxines (7). Elle possède une forme cyclique avec une chaîne latérale constituée d'un tripeptide acylé en position N-terminal par une chaîne d'acide gras. Les résidus d'acide α,γ-diaminobutyrique (Dab) qui la composent lui confèrent un pôle chargé positivement qui lui donne une forte affinité pour les molécules anioniques (6). Elle agit comme un détergent à la surface des bactéries à Gram négatif en déplaçant les cations divalents présents notamment dans le lipopolysaccharide (LPS), principal constituant de la membrane externe (6). Plus précisément, la colistine déplace les ions Ca^{++} et Mg^{++} présents au niveau des ions phosphate chargés négativement et situés en particulier sur le lipide A (fraction intra-membranaire du LPS) (7). Elle perturbe ainsi l'équilibre hydro-électrolytique de la membrane, créant des pores à sa surface et entraînant une fuite du contenu intracellulaire. Certaines bactéries à Gram négatif sont naturellement résistantes à la colistine, comme *Neisseria* spp., *Campylobacter* spp., *Haemophilus* spp. ou encore certaines bactéries non fermentantes (*Burkholderia* spp.) (7). Généralement, les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* y sont sensibles, à l'exception des représentants des genres *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* et *Morganella*.

III. MECANISMES DE RESISTANCE A LA COLISTINE CHEZ LES ENTEROBACTERIES

Les mécanismes de la résistance à la colistine sont complexes et font intervenir de nombreux gènes de régulation. Ce constat peut s'expliquer par le fait que les bactéries ont développé de nombreux systèmes de défense contre les peptides cationiques antimicrobiens d'origine humaine au cours du temps (15). La résistance à la colistine a été particulièrement étudiée chez les entérobactéries et de nombreux mécanismes chromosomiques ont pu être identifiés. La résistance par modification de la cible de l'antibiotique est essentiellement en cause. Les principales modifications ont lieu au niveau du lipide A, fraction hydrophobe du LPS qui permet l'ancrage à la membrane externe de la bactérie, et de l'acide 3-déoxy-D-manno-oct-2-ulosonique (KDO) présent dans le cœur (*core*) du LPS reliant le lipide A à l'antigène O (16). Brièvement, la bactérie résistante à la colistine active la synthèse de certains sucres qui vont se fixer au niveau des groupements phosphate (électronégatifs) de ces deux structures, diminuant ainsi la charge électrique globale du LPS et l'affinité de la colistine pour sa cible (17, 18). Les deux principaux sucres identifiés à ce jour sont le 4-amino-4-déoxy-L-arabinose (L-ara4N ou plus simplement aminoarabinose) et la phosphoéthanolamine (PEtN) (17, 18). Les mécanismes de résistance décrits ici concernent essentiellement les gènes de régulation qui vont activer la synthèse de ces sucres.

1. Mécanismes d'origine chromosomique

a. Modification du lipopolysaccharide par ajout du 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-ara4N) et/ou de la phosphoéthanolamine

L'addition du L-ara4N sur le lipide A se fait le plus souvent sur le groupement phosphate en position 4', parfois sur celui en 1, ou sur le Kdo (Figure 1) (17). La synthèse et la fixation de ce sucre sont régies par un opéron constitué de sept gènes, l'opéron *arnBCADTEF* (ou *pmrHFIJKLM*) (19). Les gènes *arnB, arnC, arnA* et *arnD* assurent la transformation de l'UDP-acide glucuronique en undécaprenyl phosphate-α -L-Ara4N (19), tandis que le gène *arnT* (20) est responsable de la fixation du sucre sur le lipide A. Les gènes *arnE* et *arnF* (19) sont quant à eux impliqués dans le transport de l'aminoarabinose du cytoplasme vers la membrane externe bactérienne. La synthèse de l'acide-UDP-glucuronique est obtenue à partir de l'UDP-α-D-glucose grâce à une UDP-glucose 6-dehydrogenase (codée par le gène *ugd*) (21, 22).

L'opéron *arn* (ou *pmr*, pour *polymyxin resistance*) est présent chez toutes les entérobactéries, notamment chez *Salmonella* spp., *Klebsiella pneumoniae* (Figure 1), *Enterobacter aerogenes* ou encore *Escherichia coli* (Figure 2) (17, 19). Chez *Proteus mirabilis* (17) et *Serratia marcescens* (23), il est constitutivement activé et ces micoorganismes résistent donc naturellement à la colistine. L'activation de l'opéron *arnBCADTEF* est notamment régulée par deux systèmes à deux composants, PmrAB et PhoPQ (18), composés chacun d'un détecteur de signal, doué d'une activité histidine kinase (respectivement PmrB et PhoQ), et d'un régulateur de réponse (respectivement PmrA et PhoP). Certains stimuli environnementaux vont induire l'activation de ces systèmes régulateurs, notamment dans certaines conditions de survie. La hausse des concentrations en ions ferriques ou aluminium (17) active le système PmrAB tandis que le système PhoPQ est stimulé par de faibles concentrations d'ions magnésium (Figure 2) (17). Les deux systèmes sont également initialisés en cas de diminution du pH ou lors de la phagocytose des bactéries par les macrophages (24). En présence de polymyxines ou en cas de mutations activatrices, ces systèmes à deux composants sont activés et induisent des modifications du lipide A conduisant à une résistance accrue à ces polymyxines (17). L'activation de l'opéron *arnBCADTEF* par ces régulateurs sera directe pour le système PmrAB, et directe ou indirecte via le système PmrAB pour le système PhoPQ (Figure 2) (17). En effet, le système PhoPQ peut stimuler le système PmrAB par l'intermédiaire du gène *pmrD* en cas de faibles concentrations de magnésium (25). Le système PmrAB pourra exercer un rétrocontrôle négatif de l'expression du gène *pmrD* (26). Les mutations dans PmrAB et PhoPQ ont été surtout décrites chez *K. pneumoniae*, *Salmonella enterica* et *E. aerogenes* (17).

L'activation de ces systèmes à deux composants est elle-même modulée par d'autres régulateurs. Le gène *mgrB*, qui code pour une protéine de 47 acides aminés nommée MgrB, réprime l'activation de *phoPQ* (18). L'inactivation de ce gène représente l'un des principaux mécanismes de résistance à la colistine identifié chez *K. pneumoniae* (Figure 1) (18). L'inactivation de *mgrB* par mutation, délétion ou insertion nucléotidiques, provoque la perte du rétrocontrôle négatif du système PhoP/PhoQ conduisant à son activation constitutive et à la surexpression de l'opéron *arnBCADTEF* (18). Ce mécanisme concerne 25,5 % à 86,4 % des souches de *K. pneumoniae* résistantes à la colistine selon les études. Le phénomène le plus fréquemment rapporté est la rupture de *mgrB* par une séquence d'insertion (IS), essentiellement des familles IS5 et IS1. Elles peuvent s'intégrer soit dans le gène (souvent entre les nucléotides 74 et 75), soit dans son promoteur. (18).La résistance à la colistine par

clivage du gène *mgrB* par une IS peut également être associée à la résistance aux béta-lactamines (27,28). En effet, il a récemment été rapporté le cas de deux souches de *K. pneumoniae* pour lesquelles un gène de résistance aux béta-lactamines, associé à l'ISE*cp1* s'était inséré dans le gène *mgrB,* provoquant une résistance croisée aux céphalosporines et /ou carbapénèmes et à la colistine.

L'addition de phosphoéthanolamine sur les groupements phosphate du lipide A et/ou du KDO peut également neutraliser les charges électronégatives du LPS ; elle est réalisée par une phosphoéthanolamine transférase nommée PmrC ou EptA (29) dont l'activation dépend du système à deux composants PmrAB. De ce fait, le système PhoPQ peut également avoir un effet sur l'ajout de phosphoéthanolamine sur le LPS via l'activation du système PmrAB. Deux autres phosphoéthanolamine transférases interviennent dans la régulation de la résistance aux polymyxines. EptB permet l'addition de phosphoéthanolamine sur le Kdo (16,30,31). Le gène codant l'enzyme est présent chez de nombreuses entérobactéries, mais son rôle dans la résistance aux polymyxines et les mécanismes qui contrôlent son activation n'ont été établis que chez *Salmonella* spp. et *E. coli* (Figure 2) (30,32,33). *eptB* est régulé par le système à deux composants PhoP/PhoQ par l'intermédiaire d'un petit ARN non codant (nc) *mgrR*, capable de réprimer sa synthèse. L'ARNnc *micA* lui, est capable de réprimer la synthèse de PhoP (17). Plus récemment, il a été montré qu'un autre ARNnc, SroC, intervient dans la régulation de ce système complexe en réprimant la synthèse de *mgrR* en présence de fortes concentrations d'ions calcium ou magnésium, permettant ainsi l'expression du gène *eptB* (32). Enfin, une troisième phosphoéthanolamine transférase nommée EptC (ou CptA) est produite par *Proteus* spp., *E. coli* ou *Salmonella* spp. (Figure 2) (34–36). Elle assure l'ajout de phosphoéthanolamine au niveau de l'heptose I du noyau (cœur) interne du LPS. L'expression de *eptC* est contrôlée par le système PmrA/PmrB (36) mais le rôle de ce gène dans la résistance aux polymyxines semble mineur. En effet, chez *Salmonella enterica* Typhimurium, son inhibition est associée à une réduction modérée de la survie des bactéries en présence de polymyxine B comparée à la perte du gène *pmrC* (36). Il a également été montré récemment que l'addition de phosphoéthanolamine sur l'heptose I permettait d'obtenir une conformation plus compacte du LPS et d'empêcher un peu plus la polymyxine B d'atteindre les charges électronégatives situées sur le lipide A (37).

Le système PmrAB peut également être régulé par un autre système à deux composants, *crrAB* (*colistin resistance regulation*), constitué d'un senseur, le gène *crrB* et d'un régulateur de réponse, le gène *crrA* (38). Récemment décrit, son rôle physiologique n'est

pas encore connu. Il serait un régulateur négatif de la résistance à la colistine. En effet, il a été montré que l'inactivation du gène *crrB* conduit à la surexpression du système PmrAB et donc à celle de l'opéron *arnBCADTEF* et de la phosphoéthanolamine transférase (Figure 1). L'activation de *pmrAB* par le système *crrAB* serait régie par l'activation du connecteur *crrC* (39). La régulation de la résistance à la colistine pourrait également être contrôlée par l'activation d'une glycosyltransférase qui n'a pas encore été identifiée (38). Ce mécanisme de résistance a pour l'instant été détecté chez *K. pneumoniae* où plusieurs mutations inactivatrices (Q10L, Y31H, W140R, N141I, P151S et S195N) ont été décrites dans la protéine CrrB (39). Cependant, le système *crrAB* n'a pas été retrouvé dans toutes les souches de *K. pneumoniae* et il est par ailleurs absent chez *E. coli* et *S. enterica*.

b. Autres modifications du lipopolysaccharide

D'autres gènes ont été également décrits comme potentiellement impliqués dans la résistance à la colistine. La contribution de l'antigène O dans la résistance à la colistine a été établie chez *P. mirabilis* et *K. pneumoniae* : la mutation d'une O-antigen acétyltransferase chez la première entérobactérie et la perte de l'antigène O chez la seconde étaient associées à une plus grande sensibilité des bactéries aux polymyxines (40).

Le régulateur intrinsèque RamA peut modifier l'expression de nombreux gènes impliqués dans la modification de la membrane et notamment de ceux intervenant dans la synthèse du lipide A. Chez *K. pneumoniae*, il a été montré qu'une surexpression de *ramA* avait pour conséquence un accroissement de la résistance bactérienne aux polymyxines (41).

Enfin, l'ajout d'acide gras sur le lipide A retentit sur la résistance aux polymyxines. Le lipide A des entérobactéries est normalement modifié par une myristoylation grâce au gène *lpxM* (42) et/ou une palmitoylation assurée par les gènes *pagP* et *pagL* qui sont régulés par le système à deux composants PhoP/PhoQ (43). Il convient de mentionner que *pagL* est présent chez *Salmonella* spp. mais absent chez *E. coli* (Figure 2) (16). L'inactivation de ces gènes par mutation chez *K. pneumoniae* ou *S. enterica* Typhimurium conduit à une sensibilité accrue aux polymyxines. De plus, il a été montré que la myristoylation est nécessaire à la fixation du L-ara4N mais pas à l'ajout de phosphoéthanolamine par EptB (42).

c. Mécanisme d'efflux

Plusieurs études ont suggéré un rôle de l'efflux dans la résistance à la colistine. De nombreuses pompes à efflux et leurs régulateurs ont été décrits dans de nombreuses espèces, telles que les protéines Sap (*Sensitive antimicrobial peptides*), la pompe KpnEF, ou le complexe AcrAB-TolC (44–47). Généralement, l'activation de ces pompes confère une résistance croisée à plusieurs antibiotiques. Les protéines Sap, composées de 5 protéines codées par l'opéron s*apABCDF* ont montré une activité contre les peptides antimicrobiens chez *S. enterica* Typhimurium (45). Cependant, celle-ci varie selon la nature du peptide antimicrobien : efficaces pour expulser la melittine et la protamine, elles sont en revanche inefficaces à l'égard des défensines. Chez *P. mirabilis*, il semble que les protéines Sap jouent un rôle dans la résistance à la polymyxine B (44). Le complexe AcrAB-TolC est un transporteur appartenant à la famille RND (*Resistance nodulation cell division*) composé de 3 sous-unités : AcrB, située dans la membrane interne, TolC ancrée dans la membrane externe, et AcrA reliant les deux premières sous-unités (48). Ce transporteur permet l'extrusion de molécules directement du cytosol dans l'environnement extérieur, et ainsi l'efflux de nombreux composés. Son rôle dans l'expulsion de la polymyxine B a été décrit principalement chez *K. pneumoniae* (Figure 1) (46,47) et plus récemment chez des souches de *Enterobacter cloacae* et *Enterobacter asburiae* hétérorésistantes à la colistine (47). Chez les souches d'*Enterobacter,* il a été montré que les régulateurs SoxS et SoxR, en activant la surexpression de AcrAB-TolC, étaient responsables du phénotype d'hétérorésistance à la colistine. Par ailleurs, un inhibiteur de pompe à efflux ciblant AcrB (phénylalanine-arginine-β-naphtylamide ou PABN) entraînait la perte de l'hétérorésistance et la diminution de la concentration minimale inhibitrice de la colistine. L'utilisation de divers inhibiteurs de pompes à efflux a cependant révélé des résultats variables. En effet, les inhibiteurs spécifiques d'AcrB ne montrent pas d'effets sur la résistance à la colistine chez la plupart des entérobactéries (49). En revanche, des inhibiteurs non spécifiques tel que le carbonyl-cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) accroissent fortement la sensibilité à la colistine chez les bactéries résistantes, suggérant un rôle de l'efflux encore non élucidé (18,47,50). Chez *K. pneumoniae*, il a été montré qu'un autre représentant de la famille RND, la pompe KpnEF, contribue à la résistance à la colistine (51).

d. Formation de capsule

Le rôle de la capsule dans la résistance aux polymyxines a été décrit chez certaines bactéries naturellement résistantes à la colistine comme *Neisseria* spp. ou *Campylobacter* spp. Chez *K. pneumoniae,* il a été démontré que la capsule polysaccharidique, de par sa charge électronégative, confère une protection à l'égard des peptides antimicrobiens cationiques (52). Certains systèmes de régulation à deux composants qui agissent sur la formation de la capsule peuvent également activer des gènes impliqués dans la résistance à la colistine, comme la pompe à efflux KpneEF pour le système Cpx (*Conjugative pilus expression*) ou le régulateur PhoPQ pour le complexe Rcs (*Regulator of capsule synthesis*) (18).

2. Mécanisme d'origine plasmidique : gène *mcr-1*

En 2015, Liu *et al*. (14) ont décrit le premier mécanisme de résistance à la colistine d'origine plasmidique, régi par le gène *mcr-1*. Ce gène constitué de 1626 nucléotides (GC % = 49 %) code pour une phosphoéthanolamine transférase transférant la phosphoéthanolamine sur le lipide A, modifiant ainsi l'affinité de la colistine pour sa cible. Initialement retrouvé chez des souches d'*E. coli* d'origine animale, alimentaire et chez quelques souches humaines en Chine, il a depuis été décrit chez de nombreuses entérobactéries telles que *Salmonella* (53), *K. pneumoniae* (54), *Enterobacter* spp. (55), *Citrobacter* spp. (56,57), *Cronobacter* spp. (58), *Kluyvera* spp. (59) ou encore *Shigella* spp. (60). Sa présence a été détectée dans des prélèvements de poulets de Chine datant des années 1980 (61), et les nombreuses publications sur ce sujet ont montré que sa propagation était mondiale, plus d'une trentaine de pays ayant rapporté au moins une souche d'entérobactérie porteuse du gène *mcr-1* (24). Celui-ci est retrouvé dans des souches de toute origine, qu'elles soient humaines, animales, environnementales ou encore alimentaires. La séquence protéique déduite de *mcr-1* est proche de celle des phosphoéthanolamine transférases de *Enhydrobacter aerosaccus* (63 % ; WP_007116571) et de *Moraxella catarrhalis* (59 % ; WP_003672704) (14). L'analyse de la structure protéique elle, montrait des similitudes avec les proteines LptA de *Neisseria meningitidis* et EptC de *Campylobacter jejuni* (respectivement 41 % et 40 % d'identité de séquence avec MCR-1), ces deux espèces étant naturellement résistantes à la colistine (14). Depuis, plusieurs variants de *mcr-1* ont été décrits (62–64). Un nouveau gène *mcr-2*, présentant 76,7 % de similarité nucléotidique et 81 % de similarité protéique avec *mcr-1* a également été identifié dans des souches bovines et porcines d'*E. coli* en provenance de

Belgique (65). Ce gène, constitué de 1 617 paires de bases, code également pour une phosphoéthanolamine transférase.

Différents types de plasmides peuvent porter le gène *mcr-1* comme IncI2, IncHI2, IncP, IncX4, IncFI, et IncFIB (24). Ces plasmides ont des tailles variant de 33 kb (IncX4) à 280 kb (IncHI2) (66). Il ne semble pas exister de spécificité de plasmide ou de clone bactérien se propageant au sein d'une même espèce ou entre différentes espèces. En effet, on rencontre tous ces types de plasmides chez les différentes espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* (66,67). L'environnement génétique du plasmide a été essentiellement étudié chez *E. coli*. La plupart des plasmides portant le gène *mcr-1* ne comprennent pas d'autres gènes de résistance à l'exception des plasmides IncHI2 qui peuvent porter de nombreuses séquences d'insertion (IS) et d'autres gènes de résistance aux antibiotiques. L'IS *ISApl1* est constamment associée au gène *mcr-1* dans les plasmides IncHI2 et permettrait l'insertion du gène *mcr-1* dans le plasmide lorsqu'elle est présente en deux copies (Figure 2) (66,67) : la cassette prend alors la forme *ISApl1-mcr-1-orf-ISApl1* (Figure 2), se conforme ainsi sous forme circulaire lui permettant alors de s'intégrer au plasmide (66,68). Les plasmides IncX4 ainsi que certains plasmides IncI2 ont perdu non seulement l'élément IS *ISApl1*, ce qui leur permet de se stabiliser, mais aussi la capacité au gène de se transférer dans d'autres plasmides (66,67). Les faibles variations de séquences entre les plasmides de la famille de plasmide IncX4 peuvent être donc expliquées par le fait que c'est le plasmide entier qui se propage et non le gène seul. La fonction de l'*orf* associée à *mcr-1* n'est pas encore caractérisée mais une étude a montré qu'elle n'était pas nécessaire à la résistance à la colistine gouvernée par le gène *mcr-1* (69).

Concernant le gène *mcr-2,* du fait du faible nombre de souches l'hébergeant, il est difficile d'établir des généralités sur son environnement. Les seuls plasmides porteurs du gène *mcr-2* décrits à ce jour sont du type IncX4. Dans ces plasmides, *mcr-2* n'est pas associé à l'*ISApl1* mais à une IS apparentée à *IS1595* (714 pb) flanquée de part et d'autre du gène, qui lui permettrait de s'intégrer dans le plasmide IncX4 (Figure 2). Sa transposase présente 75 % d'identité avec une transposase retrouvée chez *Moraxella bovoculi* (souche 58069), supposant une origine probable du gène *mcr-2* chez cette bactérie. Une autre étude a d'ailleurs suggéré que le genre *Moraxella* était une source potentielle de gène de résistance *mcr*-like (70). En effet, différentes phosphoéthanolamine transférases identifiées chez plusieurs espèces de *Moraxella* présentent un pourcentage de similarité élevé avec les gènes *mcr-1* et *mcr-2*.

(Extrait des Feuillets de la Biologie, sous presse, 2017).

Figure 1. Mécanismes de résistance à la colistine décrits chez *K. pneumoniae*.

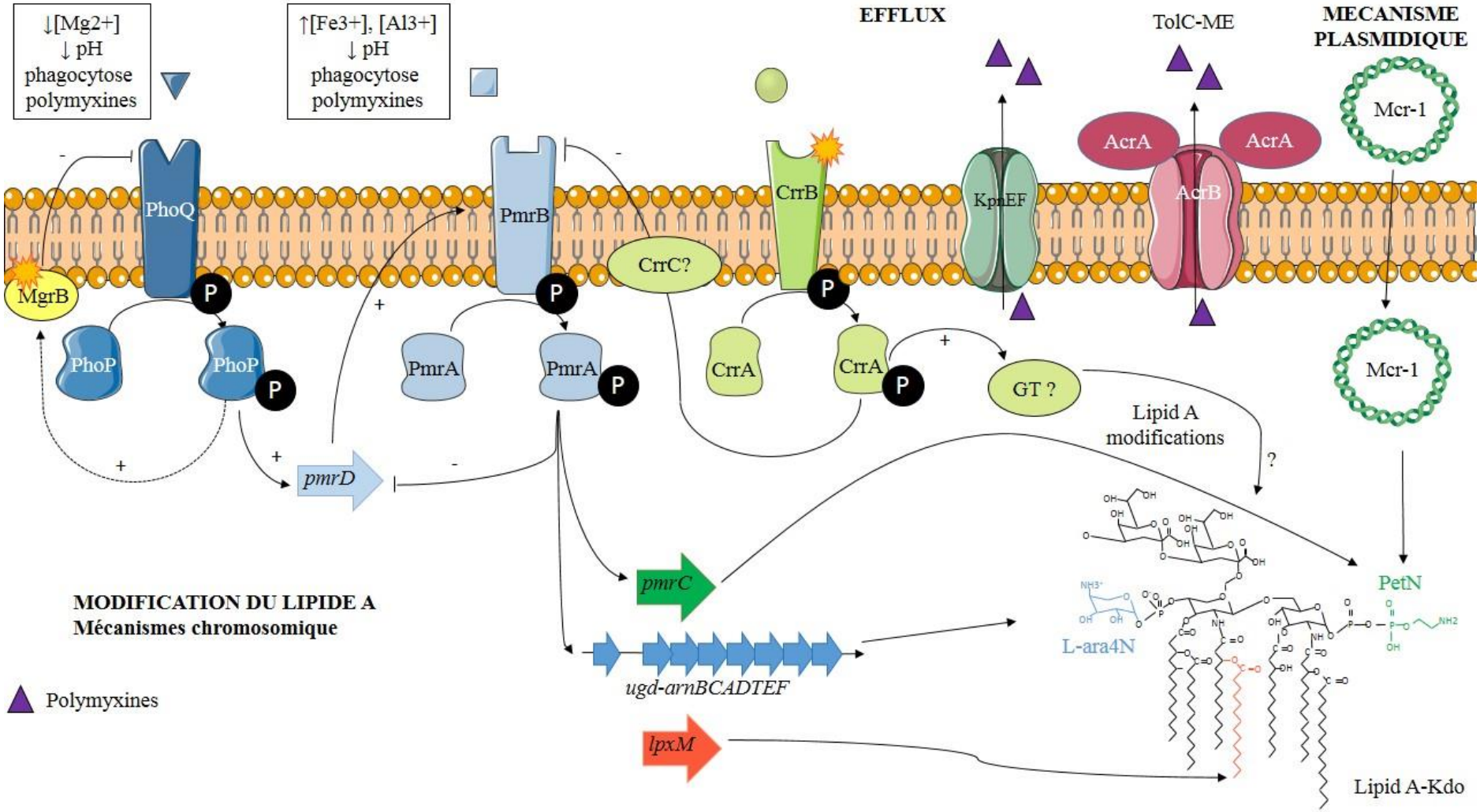
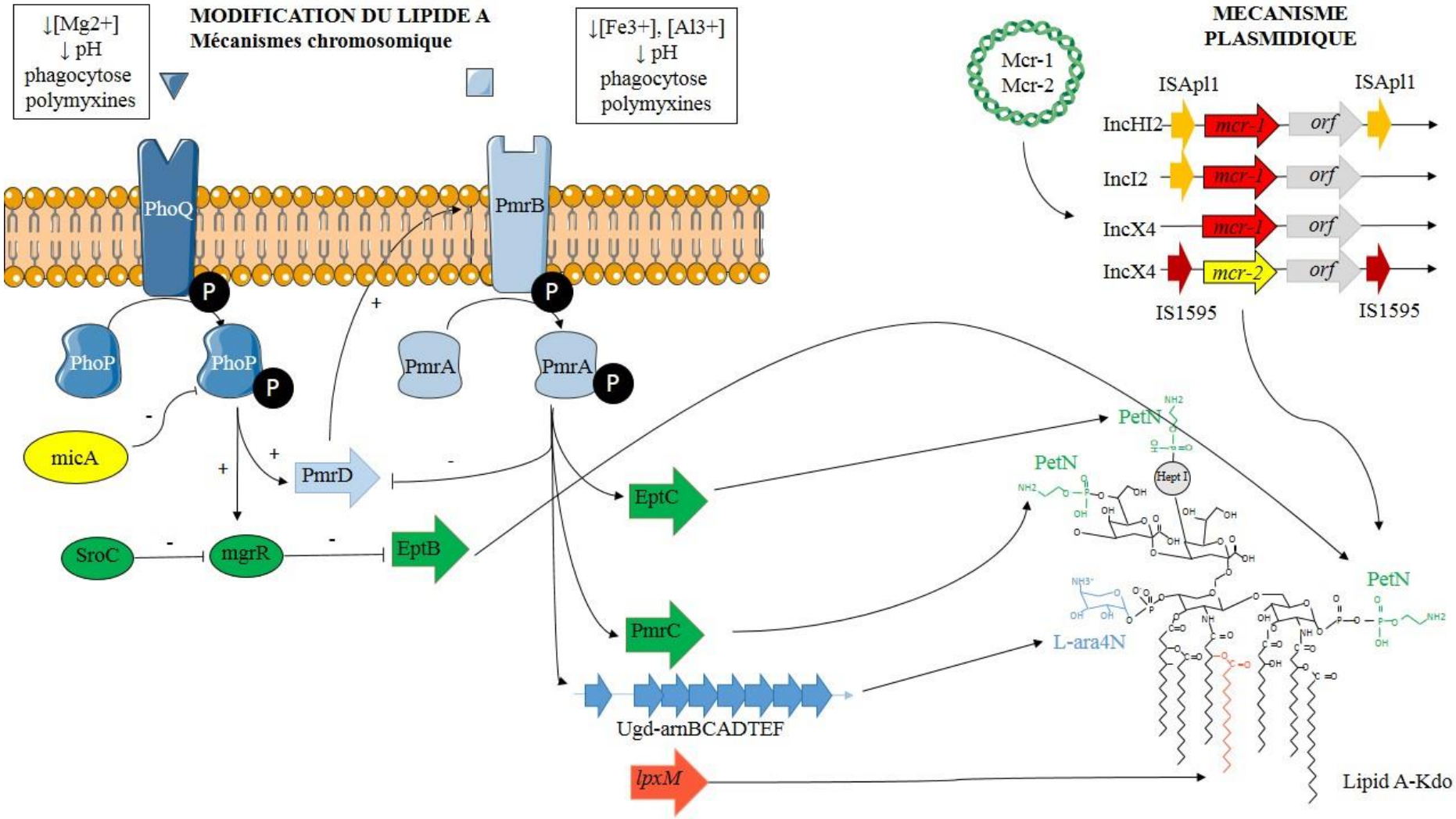


Figure 2. Mécanismes de résistance à la colistine décrits chez *E. coli* et *Salmonella spp*. En haut à droite. Description génétiques des cassettes de résistance enfermant les gènes *mcr-1* et *mcr-2*.



IV. EPIDEMIOLOGIE DE LA RESISTANCE A LA COLISTINE CHEZ LES ENTEROBACTERIES EN EUROPE

Les polymyxines ont globalement une très bonne activité *in vitro* sur les bactéries à Gram négatif, à l'exception des bactéries naturellement résistantes. Il est difficile d'évaluer clairement le taux de résistance à la colistine chez les entérobactéries car cet antibiotique n'est souvent pas testé en première intention du fait de la pénibilité technique de la mesure de son activité *in vitro*. Toutefois, une étude de la sensibilité à la colistine, réalisée en milieu liquide selon les recommandations de l'EUCAST, sur plus de 40 500 bactéries à Gram négatif (dont environ 17 000 souches de *E. coli* et 10 000 de *K. pneumoniae*) isolées entre 2006 et 2009 en Amérique du Nord, Europe, Asie et en Amérique latine a révélé un taux de résistance à cet antibiotique de 0,1 % pour *E. coli* et 1,4 % pour *K. pneumoniae* (72). Cette investigation est la plus importante menée à ce jour sur des entérobactéries. En Europe, la plupart des taux de résistance à la colistine publiés ont été déterminés chez des bactéries résistantes aux carbapénèmes, étant donné que cet antibiotique est généralement testé en dernière intention dans cette situation (71). Le rapport émis en 2015 par le centre européen de prévention et de contrôle des maladies (71) a fait état d'un taux de résistance aux polymyxines de 6,2 % chez les souches de *E. coli* productrices de carbapénémases et seulement de 1,1 % chez celles sensibles aux carbapénèmes. Concernant *K. pneumoniae*, ce taux était là encore bien plus élevé chez les souches productrices de carbapénémases (31,9 %) comparé aux souches ne produisant pas ces enzymes (2,6 %). Les souches résistantes à la fois à la colistine et aux carbapénèmes provenaient majoritairement d'Italie et de Grèce. Une récente étude française portant sur 972 souches d'entérobactéries productrices de carbapénémases (72) a révélé que 43 (4,4 %) étaient résistantes à la colistine, dont 35 parmi 561 (6,2 %) souches de *K. pneumoniae* et 7 parmi 91 (7,7 %) souches de *Enterobacter cloacae*, une fréquence plus faible que celle observée dans d'autres pays d'Europe. En Italie comme en Grèce, le taux de résistance à la colistine chez les souches de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases augmente d'année en année et est globalement, toutes études confondues, 4 fois plus élevé que celui observé chez les souches françaises (75-80). En Grèce, le clone ST258 de *K. pneumoniae* (73,74) a été rapporté comme épidémique tandis qu'en Italie, aucun type ST n'a été associé à la résistance à la colistine, contrairement à la résistance aux carbapénèmes (75). C'est essentiellement chez *K. pneumoniae* que la résistance la plus élevée a été

rapportée. Chez les autres entérobactéries, la résistance aux polymyxines est moins fréquente, même en Grèce, et elle concerne seulement 2,1 % des souches d' *Enterobacter* sp. (76) et 0,8 % des isolats de *Citrobacter* sp. (77). L'utilisation thérapeutique de la colistine à une posologie inappropriée (doses trop faibles ou, au contraire, excessives) ou prophylactique en vue d'une décontamination digestive a été identifiée comme l'un des principaux facteurs d'émergence de la résistance bactérienne à la colistine (78).

La résistance à la colistine liée au gène *mcr-1* a été décrite dans le monde entier (18) et les souches concernées étaient d'origine animale, humaine et environnementale (18). De nombreux pays européens ont rapporté des souches humaines d'entérobactéries hébergeant le gène *mcr-1*, le plus souvent lors de portage digestif mais également au cours d'infections diverses (Tableau). *E. coli* est la principale espèce en cause, suivie par *Salmonella* spp., *K. pneumoniae* et *E. cloacae*. La source de transmission à l'Homme de telles souches reste inconnue mais plusieurs hypothèses ont été avancées. Une transmission de l'animal à l'Homme, notamment de souches issues du porc ou du bétail, par contact direct ou par l'alimentation est une possibilité (79,80). En effet, le gène *mcr-1* a d'abord été détecté chez les animaux, les souches humaines ayant été décrites plus récemment (14,61,81). De plus, certains pays comme l'Italie recourent à la colistine dans l'élevage animal (81) et c'est une des nations qui a rapporté le plus de souches positives (81–84). Les souches humaines décrites ont parfois été acquises lors de voyages à l'étranger, notamment en Asie (85–88). Le gène *mcr-2* n'a pour l'instant été décelé qu'en Belgique et uniquement dans des souches porcines et bovines (65).

(extrait des Feuillets de la Biologie, sous presse, 2017).

Tableau 1. Publications rapportant des entérobactéries porteuses du gène *mcr-1* et isolées de l'Homme en Europe.

Références	Pays d'isolement	Site d'isolement	Espèce (nombre de souches)
89	I	*Non précisé*	*S. enterica* (10)
90	I	Urine, plaie	*E. coli* (8)
91	I	Rectum (3)	*E. coli* (1)
92	I	Sang	*E. coli* (3)
93	RU	Sang, rectum	*S. enterica* (10) *E.coli* (2)
94	D	Rectum (6)	*E. coli* (3) nd (3)
95	N	Intestin	*E. coli* (1)
96	S	Rectum	*E. coli* (1)
105	All, B, E, I, P, R,	Sang, plaie, urine, tractus respiratoire, péritoine	*E. coli* (15)
106	All	Plaie	*E. coli* (1)
107	All	Urine	*E. coli* (1)
108	A	Rectum	*E. coli* (1)
109	B	Pus	*E. coli* (1)
110	D	Sang	*E. coli* (1)
111	D	*Non précisé*	*S. enterica* (1)
112	E	Urine, sang tractus respiratoire plaie	*E. coli* (15)
113	E	Péritoine	*E. coli* (1)
114	F	Rectum	*K. pneumoniae* (2)
115	F	Rectum	*K. pneumoniae* (1)
116	F	Tissu sous-cutané	*E. cloacae* (1)
117	F (N-C)	Estomac, péritoine	*E. coli* (2)
118	P	Urine	*E. coli* (1)
96	S	Rectum	*E. coli* (1)

All : Allemagne ; A : Autriche ; B : Belgique ; D : Danemark ; E : Espagne ; F : France ; I : Italie ; N : Norvège ; N-C : Nouvelle-Calédonie ; P : Pologne ; R : Russie ; RU : Royaume-Uni ; S : Suisse.

V. OBJECTIFS

Les objectifs de ma thèse ont été multiples mais toujours basés sur la compréhension des mécanismes de résistance à la colistine. La première partie de ma thèse a consisté à réaliser une revue complète des mécanismes de résistance à la colistine connus à ce jour, qu'ils soient intrinsèques, acquis, plasmidiques ou chromosomiques et de faire un état des lieux de ce qui est encore inconnu à ce jour.

La deuxième partie de ma thèse a porté sur la recherche de nouveaux mécanismes de résistance à la colistine chez les bactéries à Gram négatifs, en particulier chez les bactéries intrinsèquement résistantes. En effet, nous sommes partis de deux observations : premièrement, depuis l'augmentation de l'utilisation de la colistine, il a été observé dans certains pays une augmentation des infections à germes naturellement résistants à la colistine, comme les bactéries des genres *Serratia spp*., *Morganella spp*. ou *Proteus spp* (89–91) ; deuxièmement, nous avons isolé des souches de *Proteus vulgaris* et *Serratia marcescens* à partir de prélèvements cliniques qui présentaient des phénotypes anormaux de sensibilité à la colistine. L'objectif de ce travail était de comparer ces souches anormalement sensibles à des souches de *P. vulgaris* et de *S. marcescens* issues également de prélèvements cliniques mais résistantes à la colistine. Pour ce faire, nous avons utilisé des techniques de comparaison innovantes basées sur des méthodes phénotypiques (antibiogramme, étude des parois par microscopie électronique et coloration au rouge de ruthénium, étude du lipopolysaccharide par spectrométrie de masse, étude des voies métaboliques par Biolog) et génomiques (comparaison de génomes après séquençage par recherche de gènes absents, délétés ou mutés dans la souche sensible, séquençage des gènes d'intérêt) afin de mettre en évidence un/plusieurs gènes candidats susceptibles d'être responsable de la résistance à la colistine. L'objectif principal de ces études est une meilleure connaissance des mécanismes de résistance chez ces espèces naturellement résistantes à la colistine. En effet, ces bactéries, qui font partie de la famille des *Enterobacteriaceae*, ont cette singularité d'être naturellement résistantes à la colistine, alors que les autres bactéries de cette famille y sont sensibles. La mise en évidence de nouvelles voies et/ou de nouveaux gènes de résistance pourrait ainsi ouvrir de nouvelles pistes concernant cette fois les mécanismes de résistance acquise chez d'autres bactéries et permettre la mise au point de nouvelles cibles thérapeutiques. La mise au point de nouvelles techniques de knock-in et de knock-out au sein du laboratoire est aussi un des objectifs de cette thèse qui permettra de moderniser le laboratoire et de confirmer nos théories.

Enfin, la troisième partie de ma thèse a consisté à rechercher les facteurs de risque d'acquisition de souches de *Klebsiella pneumoniae* résistantes à la colistine et à déterminer les mécanismes de cette résistance chez des patients hospitalisés au sein de l'Assistance publique des Hôpitaux de Marseille (AP-HM) entre 2014 et 2017 ainsi que leurs caractéristiques cliniques et les mécanismes de résistance rencontrés.

VI. MECANISMES MOLECULAIRES DE LA RESISTANCE A LA COLISTINE CHEZ LES BACTERIES A GRAM NEGATIF.

Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns, published in International journal of antimicrobial Agents, (IF: 4,307).

L'un des premiers objectifs de ma thèse a consisté à établir la revue de la littérature des mécanismes de résistance à la colistine chez les bactéries à Gram négatifs. Ces mécanismes sont complexes et variables en fonction des espèces bactériennes. L'augmentation de l'utilisation de la colistine et donc du risque de sélection de la résistance ainsi que la découverte d'un gène transférable de résistance à la colistine nommé *mcr-1* nous a conduit à réaliser un état des lieux des mécanismes moléculaires identifiés à ce jour, et de mettre en évidence les axes encore non élucidés.

ARTICLE IN PRESS

International Journal of Antimicrobial Agents ■■ (2016) ■■–■■

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijantimicag

Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns

Sophie Baron, Linda Hadjadj, Jean-Marc Rolain *, Abiola Olumuyiwa Olaitan **

Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes (URMITE), CNRS-IRD UMR 6236, Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille Université, Marseille, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Colistin
Polymyxin B
mcr-1
Lipid A modification
Antibiotic resistance

ABSTRACT

Colistin, also referred to as polymyxin E, is an effective antibiotic against most multidrug-resistant Gram-negative bacteria and is currently used as a last-line drug for treating severe bacterial infections. Colistin resistance has increased gradually for the last few years, and knowledge of its multifaceted mechanisms is expanding. This includes the newly discovered plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1*, which has been detected in over 20 countries within 3 months of its first report. We previously reported all of the known mechanisms of polymyxin resistance in our first review in 2014, but an update seems necessary in 2016, considering the significant recent discoveries that have been made in this domain. This review provides an update about what is already known, what is new, and some unresolved questions with respect to colistin resistance.

© 2016 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

The increase in antibiotic resistance is a major worldwide health problem. Specifically, severe infections caused by multidrug-resistant bacteria, especially carbapenem-resistant bacteria, as well as the lack of new antibiotics against Gram-negative pathogens have led to a reconsideration of old antibiotics. It is in this context that the use of colistin re-emerged, mainly for infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacteria [1]. Colistin belongs to the polymyxin family and is a polycationic antimicrobial peptide. Unfortunately, the increased and inappropriate use of colistin has led inexorably to the worldwide emergence of colistin-resistant bacteria [2–4].

In 2014, we reviewed all of the reported mechanisms described for polymyxin resistance in clinically important Gram-negative pathogens [5]. However, since then other novel mechanisms have been described, which further unravel the riddle of polymyxin (polymyxin B and colistin) resistance. This has necessitated an update on this subject. This mini-review provides an update about what is known and what is new in colistin resistance, and provides an insight into what is still unknown. It is hoped that this will further provide useful insights regarding which path(s) could be followed with respect to research in polymyxin resistance.

2. Overview of colistin resistance

Studies of the mechanisms of resistance showed that various chromosomal mutations were frequently responsible for acquired colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and, recently, *Klebsiella pneumoniae* [6–8]. Most mechanisms conferring resistance to colistin are directed against modifications of the lipid A moiety of lipopolysaccharide (LPS), which is the primary target of colistin. Mechanisms that are associated with colistin resistance across different bacterial genera may be different, but more often than not the majority always follow the common pathway of lipid A modifications with 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-ara4N) and/or phosphoethanolamine (PEtN).

3. Update on what is known about colistin resistance

3.1. Modification of lipid A or 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid (Kdo) with L-ara4N

Addition of L-ara4N to lipid A is one of the main mechanisms leading to colistin resistance. The most frequent target of L-ara4N is the 4′-phosphate group of lipid A, but it can also be added to the 1-phosphate group or Kdo. The *arnBCADTEF* (also known as *pmrHFIJKLM*) operon synthesises L-ara4N from uridine diphosphate (UDP) glucuronic acid and subsequently transfers it to lipid A [5]. The operon is present in *Salmonella* spp., *K. pneumoniae*, *Escherichia coli* and *P. aeruginosa* but is absent in *A. baumannii* [5].

* Corresponding author. Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes (URMITE), CNRS-IRD UMR 6236, Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille Université, Marseille, France. Fax: +33 4 91 38 77 72
E-mail address: jean-marc.rolain@univ-amu.fr (J.-M. Rolain).
** Corresponding author. Unité de recherche sur les maladies infectieuses et tropicales émergentes (URMITE), CNRS-IRD UMR 6236, Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille Université, Marseille, France.
E-mail address: olaitanmuyi@gmail.com (A.O. Olaitan).

http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023
0924-8579/© 2016 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Sophie Baron, Linda Hadjadj, Jean-Marc Rolain, Abiola Olumuyiwa Olaitan, Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns, International Journal of Antimicrobial Agents (2016), doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023

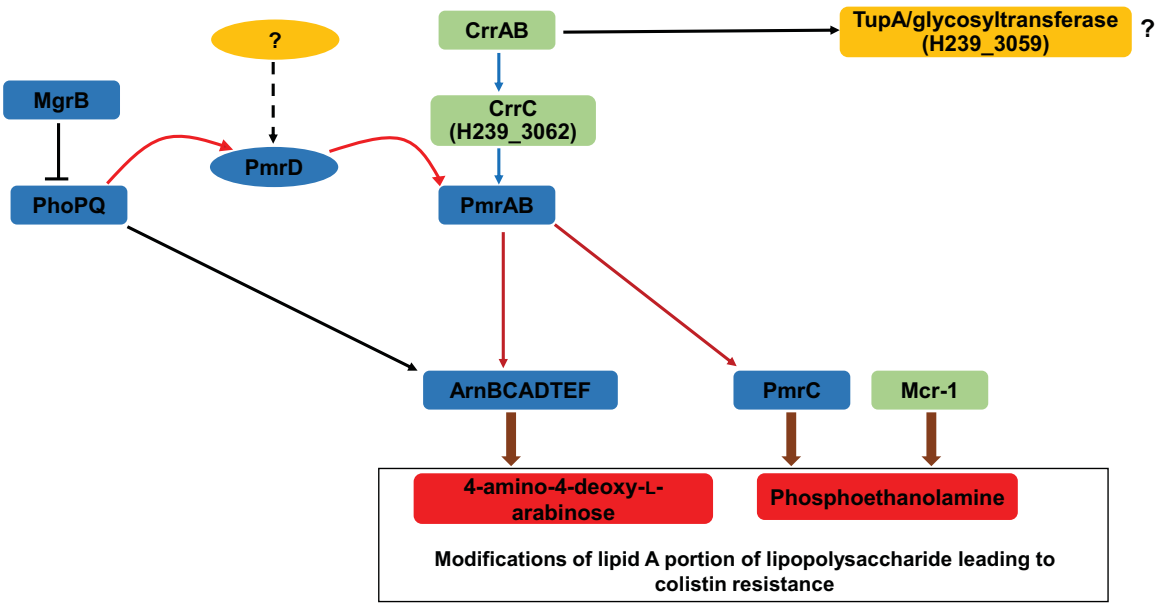


Fig. 1. Model for activation of the two-component systems (TCSs) for colistin resistance in bacteria. Activation of the TCSs, which are mostly, but not exclusively, mutations, stimulates the transcription of lipopolysaccharide (LPS) modification loci *arnBCADTEF* (*pmrHFIJKLM*) and *pmrC*, leading to the synthesis of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose and phosphoethanolamine (PEtN), respectively. The recently discovered TCS CrrAB activates PmrAB but not PhoPQ via H239_3062 (now referred to as CrrC) with subsequent upregulation of *arnBCADTEF* and *pmrC*. In addition, a novel PEtN-encoding gene *mcr-1*, which modifies the lipid A of LPS, was also recently identified. All novel protein-encoding genes are shown in green. The missing links (genes) or pathways not yet fully understood are shown in yellow and dashed lines, respectively. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Mutations in the two-component systems (TCSs), mainly PhoPQ and PmrAB (Fig. 1), activate this operon in these bacteria with additional TCSs: ParRS, ColRS and CprRS in *P. aeruginosa*. Mutations in PmrAB have been found in *Salmonella* spp. [9,10], *P. aeruginosa* [11] and *A. baumannii* [12] and principally occur in *pmrB*. At the same time, mutations, including deletions in PhoPQ, have been shown to lead to colistin resistance/heteroresistance in *K. pneumoniae* [13–15] as well as resistance in *P. aeruginosa* [16–19] and *Salmonella* spp. [20], whereas this TCS is absent in *A. baumannii*.

Inactivation through numerous mutations (nonsense, missense, deletion, insertional inactivation) of *mgrB*, the negative feedback regulator of PhoPQ, is known to result in constitutive activation of PhoPQ, which thereafter directly activates upregulation of the *arnBCADTEF* operon by bypassing PmrD and PmrAB (Fig. 1) [2,8,21,22]. *mgrB* inactivation appears to be the most frequent colistin resistance mechanism found in *K. pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*, according to published data, with a prevalence between 25.5% and 86.4% based on different studies [2,8,23–27]. Of the 192 strains of *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* that have been reported in the literature from 2013 to 2015 (December) with *mgrB* anomalies [2,8,23–33], 77 (40.1%) had an insertion sequence (IS) truncation, 56 (29.2%) had nucleotide deletion(s), 42 (21.9%) had missense or nonsense mutations, and 6 (3.1%) had lost the *mgrB* gene. Among insertions by IS elements, the IS*5* family is the most frequent element found to inactivate *mgrB* (45/77), followed by the IS*1* family (16/77). These ISs can insert in either the promoter or the coding region of *mgrB*, with most insertions occurring between nucleotides 74 and 75 [2,8,24,27,33] within *mgrB*. Stability assays showed that insertional inactivation by an IS was a stable phenomenon [33]. This has been demonstrated for IS*5*-like, IS*3*-like, IS*Kpn14* and IS*102* in different clones that are frequently encountered in clinical samples [33].

3.2. Modification of lipid A or Kdo with PEtN

Lipid A can also be modified by *ept* genes, which add PEtN to lipid A or Kdo. There are different variants of PEtN-encoding genes, such as *eptA* (*pmrC*), *eptB* (*pagC*) and *eptC* (*cptA*), and each is capable of adding PEtN to different parts of LPS [5,21,34]. *pmrC* is regulated by the PmrAB TCS, which itself can be upregulated by PhoPQ. Mutation in *pmrAB* is the main resistance mechanism found in *A. baumannii* [21,34,35], leading to *pmrC* activation and PEtN addition.

3.3. Other lipopolysaccharide modifications

Other genes involved in the LPS biosynthesis pathway have been described as potentially involved in polymyxin resistance. In *Proteus mirabilis*, a mutation in an O-antigen acetyltransferase-encoding gene prevents aminoarabinose fixation, leading to a decrease in colistin resistance. Loss of O-antigen by mutation of genes involved in O-antigen biosynthesis such as *rfaH* in *Yersinia enterocolitica* [36] or *naxD* in *Francisella* spp. [37] decreases polymyxin B resistance, as well as in the *K. pneumoniae* mutant lacking O-antigen [38].

Other regulators recently described that modulate lipid A biosynthesis include *ramA*, a global regulator that can modify the expression of over 68 genes including *lpxC*, *lpxL* and *lpxO*. This regulator is present in some Enterobacteriaceae such as *K. pneumoniae*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. and *Salmonella* spp. The *ramA* locus consists of three genes (*ramA*, *romA* and *ramR*). The latter is a repressor of *ramA* and *romA*. Survival assays in *K. pneumoniae* showed that *ramA* alterations lead to a decrease of colistin susceptibility, suggesting that *ramA*-dependent regulation possesses an alternative pathway for increased resistance to polymyxins [39]. As previously mentioned [5], in addition to modification of lipid A with PEtN, concurrent glycosylation of the phosphate group of lipid A with galactosamine was reported both in laboratory-generated colistin-resistant *A. baumannii* as well as in clinical strains [36].

3.4. Complete loss of lipopolysaccharide

Complete loss of LPS is one of the two resistance mechanisms described in *Acinetobacter* sp. [40]. A mutation occurring in one of the first three genes involved in the lipid A biosynthesis pathway

Please cite this article in press as: Sophie Baron, Linda Hadjadj, Jean-Marc Rolain, Abiola Olumuyiwa Olaitan, Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns, International Journal of Antimicrobial Agents (2016), doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023

(*lpxA*, *lpxB* or *lpxC*) terminates lipid A biosynthesis and LPS formation [41]. A mutation in LptD, an outer membrane protein that allows the final translocation of newly synthesised LPS, also led to a complete loss of LPS [41,42]. Recently, a comparative analysis of metabolites between colistin-susceptible *A. baumannii* and LPS-deficient colistin-resistant *A. baumannii* showed perturbation in specific amino acids and carbohydrate metabolites, particularly in pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle intermediates, as well as a depletion of metabolites of peptidoglycan biosynthesis [43,44]. Previous results regarding the efficacy of some antibiotics on LPS-deficient *A. baumannii* had shown increased susceptibility to azithromycin, rifampicin and vancomycin [45]. These efficacies were explained for azithromycin and rifampicin because LPS plays a role in passive diffusion, but not for vancomycin. These results were also demonstrated in *Acinetobacter nosocomialis*, as well as a decrease in virulence in colistin-resistant strains [46]. Comparative transcriptomic analysis showed a significant level of expression of several genes involved in membrane biogenesis and transport, carbapenem resistance, and lipoprotein biosynthesis and transport. The occurrence of peptidoglycan biosynthesis modifications in LPS-deficient *Acinetobacter* may be related to this increased susceptibility to vancomycin.

3.5. Efflux pump mechanisms

Efflux pump mechanisms have often been suggested as playing a role in colistin resistance. Various efflux pumps or regulators of efflux pumps have been reported in many species, such as Sap (sensitive antimicrobial peptides) proteins, BrlR, KpnEF or the AcrAB–TolC complex. Generally, activation of these pumps leads to an increase in resistance to several antibiotics at the same time, including colistin [47–49]. Sap proteins are composed of five proteins encoded by the *sapABCDF* operon [50].

In *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, it has been demonstrated that Sap proteins are necessary for resistance to some antimicrobial peptides, including melittin and protamine, but they were not effective against defensins. However, this operon appears to play a role in polymyxin resistance as its mutation led to increased susceptibility to polymyxin B in a *P. mirabilis* mutant [51]. In *A. baumannii*, 18 putative efflux transporters are upregulated by a physiological level of NaCl and lead to an increased tolerance of polymyxin, including a porin named CarO [52]. In *P. aeruginosa*, the active efflux pump MexXY–OprM is involved in resistance to various antibiotics such as aminoglycosides, fluoroquinolones and cefepime [53]. Expression of *mexXY* is regulated by *mexZ*, but can also be mediated by the *parRS* TCS by a *mexZ*-independent pathway. This TCS is activated if it is mutated or in case of exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial peptides. This leads to an upregulation of *mexXY* expression, a downregulation of *oprD* leading to carbapenem resistance, and to an upregulation of *pmrAB* TCS and an overexpression of the *arnBCADTEF-ugd* operon. Furthermore, BrlR is a member of the MerR family that is present in *P. aeruginosa* [47]. Interestingly, this multidrug efflux pump activator can bind to the *oprH* promoter of the *oprH–phoPQ* operon and downregulates the *phoPQ* TCS, contributing to increased colistin susceptibility via reduced transcription of the *pmrAB* and *arnT* systems [47]. It is interesting to note that *oprH* was known to mediate in polymyxin resistance in *P. aeruginosa* as far back as 1992 [54].

In *K. pneumoniae*, the efflux pump KpnEF is a member of the Cpx regulon that regulates capsule synthesis and mediates resistance to various antibiotics such as ceftriaxone, erythromycin, rifampicin and colistin [48]. This efflux pump belongs to the SMR (small multidrug resistance protein) family, as EbrAB in *Bacillus subtilis* or AbeS in *A. baumannii.*

Finally, the RND (resistance–nodulation–cell division) transporter AcrAB–TolC is a tripartite transporter known to efficiently extrude drugs directly into the external environment [49]. AcrAB and TolC *E. coli* mutants showed, respectively, an 8-fold and 10,000-fold increase in polymyxin B susceptibility, indicating that polymyxin B is a potential substrate for the AcrAB–TolC efflux pump. Interestingly, the expression of this efflux pump protein is PhoPQ-dependent [55].

Use of efflux pump inhibitors, in particular carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP), showed that the efflux pump did have an impact on colistin resistance in *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* [56], further supporting the involvement of the efflux pump system in colistin resistance.

3.6. Capsule formation

The capsule is believed to play a role in resistance to polymyxin. It has already been described in some naturally polymyxin-resistant bacteria, such as *Neisseria meningitidis* and *Campylobacter jejuni.* In *N. meningitidis*, loss of the capsule only or of the capsule and lipooligosaccharide led to a 10-fold increase in susceptibility to polymyxin B [57]. In *C. jejuni*, truncation of sialic acid, a nine-carbon sugar that decorates cell surface structures, in the lipooligosaccharide increases susceptibility to polymyxin B [58]. In addition, it has been observed that a *K. pneumoniae* with several layers in the capsule was more resistant to colistin than isolates with one single layer [30]. Moreover, capsule expression from *Streptococcus pneumoniae*, *K. pneumoniae* or *P. aeruginosa* in unencapsulated strains of *K. pneumoniae*, *E. coli* or *P. aeruginosa* leads to increased resistance to polymyxin B [59]. Finally, some regulators that regulate capsule formation, such as Cpx (conjugative pilus expression) and Rcs (regulator of capsule synthesis), appear to be involved in colistin resistance by activating the efflux pump KpnEF for Cpx or by regulating PhoPQ TCS for Rcs regulon [5].

4. What is new in modification of lipid A?

Recently, a new TCS was identified in *Vibrio cholerae* that mediates glycine fixation in lipid A, impacting polymyxin resistance. This TCS (VprAB) stimulates the transcription of a three-gene operon, *almEFG*, that carries glycine residues to the cell membrane and transfers it to lipid A [60]. Another TCS, CarRS, known to negatively regulate biofilm formation, is also able to directly bind the *almEFG* operon and to upregulate its expression [61].

In *E. coli*, PmrD was thought to be an inactive connector between PhoPQ and PmrAB, but it appears from recent work that it is well activated in conditions of low Mg^{2+}, which leads to L-ara4N and PEtN addition to lipid A. This pathway has been demonstrated to be necessary for polymyxin resistance in *E. coli* and other bacteria. However, it seems that PmrD can act independently of the PhoPQ TCS. Under low Mg^{2+} conditions, the authors suggested the presence of an unknown system or factor able to additionally stimulate PmrD (Fig. 1), leading to lipid A modifications in *E. coli* [62].

Recently, a new PagP-independent pathway involved in the acylation of lipid A was described in *A. baumannii*, involving two putative acyltransferases ($LpxL_{Ab}$ and $LpxM_{Ab}$) [63]. It was observed that *A. baumannii* has a hepta-acylated lipid A but lacked any homologue of *pagP* that is present in *E. coli* or *S. enterica*. The hepta-acylation in *A. baumannii* was traced to $LpxL_{Ab}$ and $LpxM_{Ab}$, which add one and two lauroyl-acyl chains to lipid A, respectively. Moreover, an *A. baumannii* $LpxM_{Ab}$ mutant displayed higher susceptibility to polymyxin, suggesting its key role in polymyxin resistance in *A. baumannii* [63].

In *Burkholderia pseudomallei*, a high level of resistance to colistin appears to be linked to alterations in the *mrgRS* TCS, leading to its constitutive activation [64]. However, it was not clear whether

Please cite this article in press as: Sophie Baron, Linda Hadjadj, Jean-Marc Rolain, Abiola Olumuyiwa Olaitan, Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns, International Journal of Antimicrobial Agents (2016), doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023

the mere presence of *mrgRS* TCS in *B. pseudomallei* or mutations in *mrgS* are responsible for colistin resistance in this bacterium.

4.1. CrrAB two-component system

A new TCS was recently described as mediating colistin resistance in some *K. pneumoniae* strains [65]. This TCS, named *crrAB*, denoting colistin resistance regulation, is composed of a histidine kinase (*crrB*) and its response regulator (*crrA*). It was absent in some *K. pneumoniae* strains, which was attributed as probably being due to IS-mediated deletion or substitution in the locus. It was also absent in *E. coli* and *S. enterica.* In the study by Wright et al, missense mutations in CrrB leading to L94M and Q10L in two different strains led to colistin resistance [65]. It was reported that mutations in *crrB* led to activation of the surrounding genes: *H239_3062* and *H239_3059* (a putative glycosyltransferase), and the upregulation of *pmrCAB* but not *phoPQ* (Fig. 1). The observed elevated *pmrC* and *pmrH* can both modify LPS with PEtN and L-ara4N, respectively.

A subsequent study has further clarified the mechanism of *crrAB* in colistin resistance. In this study, six different missense mutations (Q10L, Y31H, W140R, N141I, P151S and S195N) were observed in the CrrB of colistin-resistant *K. pneumoniae* isolates, leading to high-level resistance [66]. It was demonstrated that mutant CrrAB activates PmrAB via the newly named *crrC* (formerly known as *H239_3062*). The now phosphorylated PmrAB then upregulates the transcription of *arnBCADTEF* and *pmrC* (Fig. 1). The study further showed that *H239_3059*, although activated by *crrAB*, was not involved in colistin resistance. This shows that *crrC* connects *crrAB* and *pmrAB* TCSs together.

4.2. Association of β-lactam and colistin resistance via unusual mgrB truncation

Recently, an unusual integration of an IS carrying a carbapenem resistance gene has been reported in a pandrug-resistant *K. pneumoniae* belonging to ST147 [31]. An IS*Ecp1* element frequently associated with extended-spectrum β-lactamase (ESBL)-encoding genes was found with $bla_{\text{OXA-181}}$, leading to carbapenem resistance. However, this same IS*Ecp1* carrying $bla_{\text{OXA-181}}$ was inserted in *mgrB*, thereby inactivating the gene and leading to both carbapenem and colistin resistance. In a similar manner, another report showed that an IS*Ecp1* associated with $bla_{\text{CTX-M-15}}$ (encoding an ESBL) was inserted in the *mgrB* gene of *K. pneumoniae*, leading to both cephalosporin and colistin resistance [67].

4.3. Plasmid-mediated mcr-1 resistance gene

A new mechanism of colistin resistance has completely changed our view of colistin resistance as a contained scenario, to now a global concern. Until now, colistin resistance has always been linked to a chromosomal-related mechanism with no possibility of horizontal transfer. But recently, the *mcr-1* gene encoding a PEtN transferase was detected mainly in *E. coli* strains from pigs and meat in China [68]. The 1626-bp gene with 49% GC content was carried on an IncI2-type plasmid. Analysis of the amino acids of MCR-1 showed that it was closely related to the EptA found in *Paenibacillus sophorae* and *Enhydrobacter aerosaccus.* It is in *Paenibacillus* spp. that polymyxin was discovered and it is known that bacteria which can synthesise an antibiotic are able to simultaneously resist it. On the other hand, structural analysis of the complete protein showed that it is closely related to LptA of *N. meningitidis* and EptC of *C. jejuni*, which are also known to be intrinsically resistant to polymyxin, supporting its role in PEtN transferase, leading to the addition of PEtN to lipid A.

Further investigations showed that the prevalence of the *mcr-1* gene was as high as 20% in animal strains and 1% in human strains in China. Most intriguingly, just within the space of a few months after it was first reported, *mcr-1* mediating transferable colistin resistance has now been detected in several countries covering Europe, Asia, South America, North America and Africa (Table 1; Fig. 2) [68–119]. It has now been reported from diverse bacterial genera (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* and *Enterobacter*) but mostly from *E. coli*. Although it was first detected and identified in late 2015, another report from the same group has announced its presence in colistin-resistant *E. coli* collections from the 1980s, whilst the oldest records from Europe to date are 2005 (France) and 2009 (The Netherlands) [120]. Other plasmid incompatibility groups that have been associated with *mcr-1* currently include IncI2, IncHI2, IncHI2A, IncX4 and IncP [69,76,96], and a recent study has shown that there exists a significant diversity among the plasmids bearing *mcr-1* [103]. The gene has also been reported in pathogens carrying other resistance genes, such as $bla_{\text{NDM-5}}$, $bla_{\text{CTX-M}}$ and bla_{KPC} [75,78,83].

5. What is still unknown?

Research in polymyxin resistance has led to the elucidation of many mechanisms and pathways contributing to its resistance. As we opined in our last review, new mechanisms have just been elucidated in resistant strains with previously unexplained mechanism(s). Nevertheless, there are still lots of unknowns relating to polymyxin resistance. First, there still exist some resistant bacterial strains with an unexplained mechanism. For example, colistin resistance in *K. pneumoniae* is associated with mutations in PhoPQ, PmrAB and CrrAB and *mgrB* anomalies and in very limited strains by *mcr-1*. However, some strains are resistant with none of these aforementioned mechanisms being involved [2,8,26,27,71,76,77,83,97], including some *E. coli* strains [73]. Second, it has already been shown that PhoPQ, PmrAB and *mgrB* are present in numerous Enterobacteriaceae, but some genera appear to be more predisposed to genetic modifications to any of these aforementioned genes than others. For example, *mgrB*, which is found in *E. coli* and *K. pneumoniae*, two members of the Enterobacteriaceae family, is the most frequent mechanism of colistin resistance reported in *K. pneumoniae* [8], whereas it has never been implicated or reported in colistin-resistant *E. coli.* Conversely, more than 80% of bacteria where *mcr-1* has been detected were *E. coli* [120], but very few from other Enterobacteriaceae. An understanding of why these bacteria are genetically easily predisposed to a particular genetic alteration will greatly improve our knowledge about the acquisition or development of colistin resistance. In addition, as suggested by Rubin et al, the presence of a yet-to-be identified system capable of activating PmrD, independently of PhoPQ (Fig. 1), will further help in understanding the interplay of TCSs [62]. Furthermore, *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Serratia* spp. and *Morganella* spp., all belonging to the Enterobacteriaceae family, share many regulators and TCSs with other Enterobacteriaceae, but in these genera the *arn* operon is constitutionally activated, unlike in others such as *Klebsiella* and *E. coli*, making them intrinsically resistant to polymyxins. An understanding of this background differential constitutive upregulation will further improve our knowledge of the mechanisms of polymyxin resistance.

Finally, colistin resistance has been primarily associated, for a long time, with colistin exposure (as in the case of colistin therapy), but a study of the literature shows that the presence of colistin-resistant bacteria can occur without any prior colistin exposure [121].

Various hypotheses have been postulated; the discovery of a plasmid-mediated *mcr-1* colistin resistance gene is a first response to this puzzle [68] and it is tempting to suggest the possible involvement of other unknown plasmid-mediated gene(s). Judging by the strong interest in polymyxin research recently and the current

Please cite this article in press as: Sophie Baron, Linda Hadjadj, Jean-Marc Rolain, Abiola Olumuyiwa Olaitan, Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns, International Journal of Antimicrobial Agents (2016), doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023

Table 1
Reports of the emergence of plasmid-mediated *mcr-1* colistin resistance gene globally.

Country	Title	Author	Strain	Host (no. of *mcr-1* strains)	Journal	Year	Reference
China	Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study	Liu et al	*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*	Animal (166), human (16), food (78)	Lancet Infectious Diseases	2016	[68]
Denmark	Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark, 2015	Hasman et al	*E. coli*	Food (5), human (1)	Eurosurveillance	2015	[69]
The Netherlands	Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene	Arcilla et al	*E. coli*	Human (6)	Lancet Infectious Diseases	2016	[70]
France	Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene	Webb et al	*Salmonella* spp.	Food (4)	Lancet Infectious Diseases	2016	[71]
Portugal	Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene	Tse and Yuen	*Salmonella* spp.	Food (1)	Lancet Infectious Diseases	2016	[72]
Laos, Thailand and Algeria	Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene	Olaitan et al	*E. coli*	Animal (4), human (8)	Lancet Infectious Diseases	2016	[73]
China	Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene	Hu et al	*E. coli*	Human (27)	Lancet Infectious Diseases	2016	[74]
Germany	Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum β-lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany	Falgenhauer et al	*E. coli*	Animal (3), human (1)	Lancet Infectious Diseases	2016	[75]
Belgium	Colistin resistance gene *mcr-1* harboured on a multidrug resistant plasmid	Malhotra-Kumar et al	*E. coli*	Animal (13)	Lancet Infectious Diseases	2016	[76]
Vietnam	Colistin-resistant *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* isolated from food animals in Hanoi, Vietnam	Malhotra-Kumar et al	*E. coli*	Animal (9)	Lancet Infectious Diseases	2016	[77]
France	Co-occurrence of extended spectrum β lactamase and MCR-1 encoding genes on plasmids	Haenni et al	*E. coli*	Animal (106)	Lancet Infectious Diseases	2016	[78]
Cambodia	Colistin resistance gene *mcr-1* and pHNSHP45 plasmid in human isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*	Stoesser et al	*E. coli*, *K. pneumoniae*	Human (1)	Lancet Infectious Diseases	2016	[79]
Malaysia and Portugal	Possible genetic events producing colistin resistance gene *mcr-1*	Petrillo et al	*E. coli*, *Salmonella* spp.	Database EMBL: animal (4), food (1), environment (1)	Lancet Infectious Diseases	2016	[80]
Japan	Investigation of a plasmid genome database for colistin-resistance gene *mcr-1*	Suzuki et al	*E. coli*, *Salmonella* spp.	Database GenEpid-J: animal (7)	Lancet Infectious Diseases	2016	[81]
Switzerland	Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*	Poirel et al	*E. coli*	Human (1)	Lancet Infectious Diseases	2016	[82]
China	Emergence of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae	Du et al	*E. coli*, *K. pneumoniae*	Human (4)	Lancet Infectious Diseases	2016	[83]
China	Carbapenem-resistant and colistin-resistant *Escherichia coli* co-producing NDM-9 and MCR-1	Yao et al	*E. coli*	Food (1)	Lancet Infectious Diseases	2016	[84]
France	Prevalence of *mcr-1* in commensal *Escherichia coli* from French livestock, 2007 to 2014	Perrin-Guyomard et al	*E. coli*	Animal (23)	Eurosurveillance	2016	[85]
Switzerland, Dominican Republic, India, Thailand and Vietnam	Occurrence of the plasmid-borne *mcr-1* colistin resistance gene in extended-spectrum-β-lactamase-producing Enterobacteriaceae in river water and imported vegetable samples in Switzerland	Zurfuh et al	Enterobacteriaceae	Environment (74), food (vegetables) (60)	Antimicrobial Agents and Chemotherapy	2016	[86]
Vietnam	Inducible colistin resistance via a disrupted plasmid-borne *mcr-1* gene in a 2008 Vietnamese *Shigella sonnei* isolate	Thanh et al	*Shigella sonnei*	Human (1)	Journal of Antimicrobial Chemotherapy	2016	[87]
Spain	Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine in Spain	Quesada et al	*E. coli*, *Salmonella* spp.	Animal (9)	Research in Veterinary Science	2016	[88]
Tunisia	Impact of food animal trade on the spread of *mcr-1*-mediated colistin resistance, Tunisia, July 2015	Grami et al	*E. coli*	Animal (37)	Eurosurveillance	2016	[89]
Canada	One case of *mcr-1* resistance confirmed in British Columbia	—	*E. coli*	Human (1)	BC Centre for Disease Control (BCCDC)	2016	[90]
Italy	Antibiotic resistance—Italy: colistin, MCR-1, *E. coli*, turkeys, 2014	Battisti	*E. coli*	Animal (1)	ProMED mail (International Society for Infectious Diseases)	2016	[91]
China	Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals	Shen et al	*E. coli*	Animal (104)	Lancet Infectious Diseases	2016	[92]
China	Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene	Zhi et al	*E. coli*	Animal	Lancet Infectious Diseases	2016	[93]

(*continued on next page*)

Table 1
(*continued*)

Country	Title	Author	Strain	Host (no. of *mcr-1* strains)	Journal	Year	Reference
China	Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene	Zhang et al	*E. coli*	Human (5)	Lancet Infectious Diseases	2016	[94]
China	Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene	Ruppé et al	Microbiota intestinal metagenomic work	Human (27)	Lancet Infectious Diseases	2016	[95]
Canada	Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene	Mulvey et al	*E. coli*	Food (2), human (1)	Lancet Infectious Diseases	2016	[96]
The Netherlands	Presence of *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae in retail chicken meat but not in humans in The Netherlands since 2009	Kluytmans-van den Bergh et al	*E. coli*	Food (3)	Eurosurveillance	2016	[97]
Egypt	Emergence of plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in a clinical *Escherichia coli* isolate from Egypt	Elnahriry et al	*E. coli*	Human (1)	Antimicrobial Agents and Chemotherapy	2016	[98]
Switzerland	Plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* in bacteremia in Switzerland	Nordmann et al	*E. coli*	Human (2)	Clinical Infectious Diseases	2016	[99]
China	Emergence of plasmid-mediated *mcr-1* gene in colistin-resistant *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*	Zeng et al	*Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*	Human (2)	Antimicrobial Agents and Chemotherapy	2016	[100]
Italy	First detection of the *mcr-1* colistin resistance gene in *Escherichia coli* in Italy	Cannatelli et al	*E. coli*	Human (8)	Antimicrobial Agents and Chemotherapy	2016	[101]
Spain	Detection of *mcr-1* colistin resistance gene in polyclonal *Escherichia coli* isolates in Barcelona, Spain, 2012 to 2015	Prim et al.	*E. coli*	Human (15)	Eurosurveillance	2016	[102]
China	Diversified *mcr-1*-harbouring plasmid reservoirs confer resistance to colistin in human gut microbiota	Ye et al	*E. coli*	Human (3)	mBio	2016	[103]
Taiwan	Colistin resistance gene *mcr-1* in *Escherichia coli* isolates from humans and retail meats, Taiwan	Kuo et al	*E. coli*	Human (14), food (18)	Journal of Antimicrobial Chemotherapy	2016	[104]
Vietnam	The use of colistin and other critical antimicrobials on pig and chicken farms in southern Vietnam and their association with resistance in commensal *Escherichia coli* bacteria	Nguyen et al	*E. coli*	Animal (37)	Applied and Environmental Microbiology	2016	[105]
UK	Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales	Doumith et al	*E. coli*, *Salmonella* spp.	Food (2), human (13)	Journal of Antimicrobial Chemotherapy	2016	[106]
China	Complete sequences of *mcr-1*-harboring plasmids from extended-spectrum-β-lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae	Li et al	*E. coli*, *K. pneumoniae*	Human (4)	Antimicrobial Agents and Chemotherapy	2016	[107]
Argentina	First description of *mcr-1*-mediated colistin resistance in human infections caused by *Escherichia coli* in Latin America	Rapoport et al	*E. coli*	Human (9)	Antimicrobial Agents and Chemotherapy	2016	[108]
Brazil	Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene	Fernandes et al	*E. coli*	Animal (16)	Eurosurveillance	2016	[109]
Egypt	Characterisation of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in *Escherichia coli* isolated from animals in Egypt	Khalifa et al	*E. coli*	Animal (1)	International Journal of Antimicrobial Agents	2016	[110]
USA	*Escherichia coli* harboring *mcr-1* and bla_{CTX-M} on a novel IncF plasmid: first report of *mcr-1* in the United States	McGann et al	*E. coli*	Human (1)	Antimicrobial Agents and Chemotherapy	2016	[111]
China	Possible transmission of *mcr-1*-harboring *Escherichia coli* between companion animals and human	Zhang et al	*E. coli*	Human (3), animal (6)	Emerging Infectious Diseases	2016	[112]
Malaysia	Emergence of *mcr-1*-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* in Malaysia	Yu et al	*E. coli*	Human (1), animal (2)	International Journal of Antimicrobial Agents	2016	[113]
Great Britain	Colistin resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from a pig farm in Great Britain	Anjum et al	*E. coli*, *Salmonella* spp.	Animal (3)	Journal of Antimicrobial Chemotherapy	2016	[114]
South Africa	Colistin resistance gene *mcr-1* in avian-pathogenic *Escherichia coli* in South Africa	Perreten et al	*E. coli*	Animal (19)	Antimicrobial Agents and Chemotherapy	2016	[115]
China	Unexpected complexity of multidrug resistance in the *mcr-1*-harbouring *Escherichia coli*	Gao et al	*E. coli*	Animal (6)	Science China Life Sciences	2016	[116]
China	Detection of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from different hospitals in China	Yu et al	*E. coli*	Human (3)	Antimicrobial Agents and Chemotherapy	2016	[117]
China	Complete nucleotide sequence of IncI2 plasmid coharboring $bla_{CTX-M-55}$ and *mcr-1*	Sun et al	*E. coli*	Animal (1)	Antimicrobial Agents and Chemotherapy	2016	[118]
South Africa	Emergence of plasmid-mediated colistin resistance (MCR-1) among *Escherichia coli* isolated from South African patients	Coetzee et al	*E. coli*	Human (9)	South African Medical Journal	2016	[119]

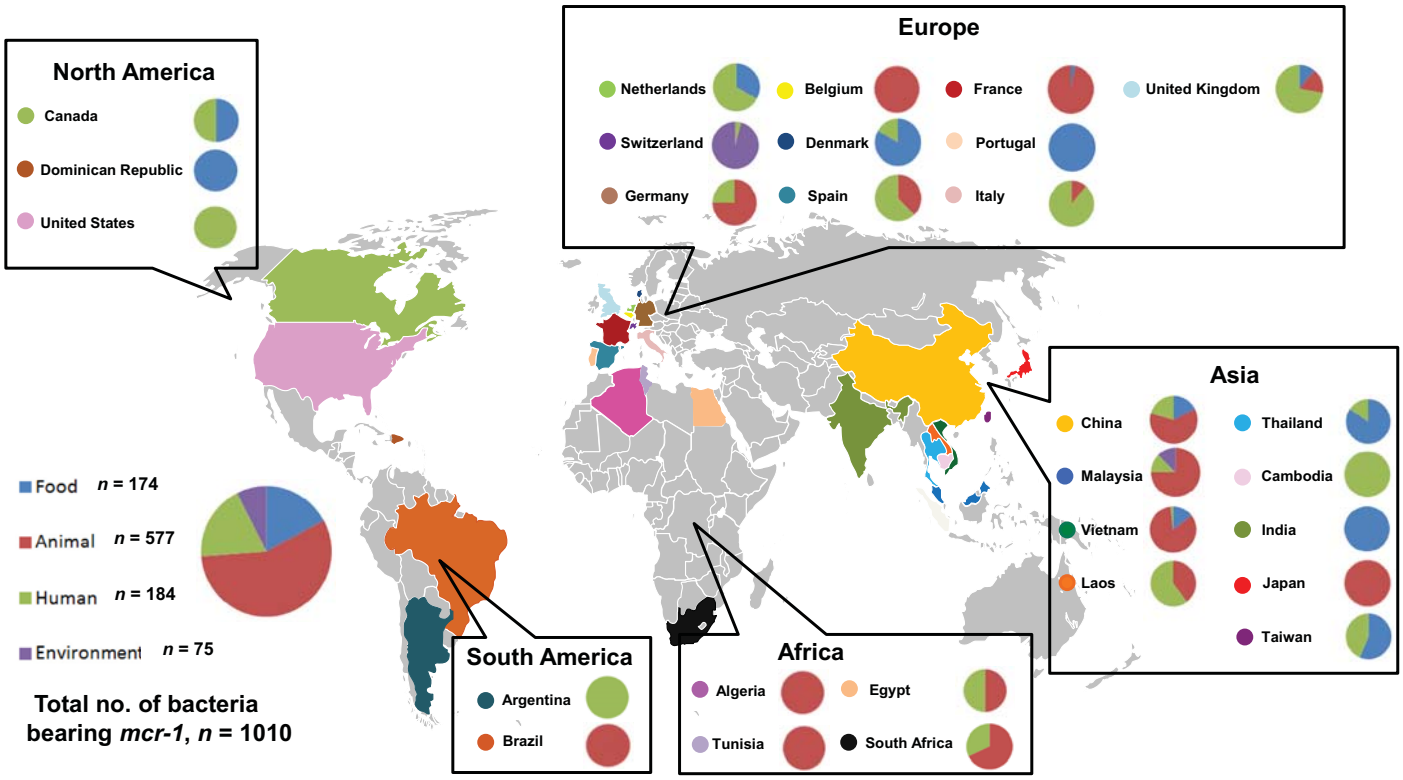


Fig. 2. Global distribution of plasmid-mediated *mcr-1* colistin-resistant strains isolated from environments, foods, animals and humans (November 2015 to April 2016).

pace in the field, there is no doubt that some of these lingering riddles/questions will be resolved in the not too distant future.

Acknowledgements

The authors thank TradOnline for English editing.

Funding: This work was partly supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS 7278) and the Institut hospitalo-universitaire (IHU) Méditerranée Infection (Marseille, France).

Competing interests: None declared.

Ethical approval: Not required.

References

[1] Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. Clin Infect Dis 2005;40:1333–41.

[2] Olaitan AO, Diene SM, Kempf M, Berrazeg M, Bakour S, Gupta SK, et al. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator *mgrB*: an epidemiological and molecular study. Int J Antimicrob Agents 2014;44:500–7.

[3] Mavroidi A, Likousi S, Palla E, Katsiari M, Roussou Z, Maguina A, et al. Molecular identification of tigecycline- and colistin-resistant carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* from a Greek hospital from 2011 to 2013. J Med Microbiol 2015;64:993–7.

[4] Parisi SG, Bartolini A, Santacatterina E, Castellani E, Ghirardo R, Berto A, et al. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* strains producing carbapenemases and increase of resistance to colistin in an Italian teaching hospital from January 2012 to December 2014. BMC Infect Dis 2015;15:244.

[5] Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. Front Microbiol 2014;5:643.

[6] Johansen HK, Moskowitz SM, Ciofu O, Pressler T, Høiby N. Spread of colistin resistant non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* among chronically infected Danish cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros 2008;7:391–7.

[7] Arduino SM, Quiroga MP, Ramírez MS, Merkier AK, Errecalde L, Di Martino A, et al. Transposons and integrons in colistin-resistant clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* with epidemic or sporadic behaviour. J Med Microbiol 2012;61:1417–20.

[8] Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, Di Pilato V, Arena F, Conte V, et al. *mgrB* inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. Antimicrob Agents Chemother 2014;58:5696–703.

[9] Olaitan AO, Dia NM, Gautret P, Benkouiten S, Belhouchat K, Drali T, et al. Acquisition of extended-spectrum cephalosporin- and colistin-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Newport by pilgrims during Hajj. Int J Antimicrob Agents 2015;45:600–4.

[10] Sun S, Negrea A, Rhen M, Andersson DI. Genetic analysis of colistin resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:2298–305.

[11] Lee J-Y, Ko KS. Mutations and expression of PmrAB and PhoPQ related with colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Diagn Microbiol Infect Dis 2014;78:271–6.

[12] Bakour S, Olaitan AO, Ammari H, Touati A, Saoudi S, Saoudi K, et al. Emergence of colistin- and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* ST2 clinical isolate in Algeria: first case report. Microb Drug Resist 2015;21:279–85.

[13] Jayol A, Nordmann P, Brink A, Poirel L. Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. Antimicrob Agents Chemother 2015;59:2780–4.

[14] Jayol A, Poirel L, Brink A, Villegas M-V, Yilmaz M, Nordmann P. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. Antimicrob Agents Chemother 2014;58:4762–6.

[15] Cannatelli A, Di Pilato V, Giani T, Arena F, Ambretti S, Gaibani P, et al. In vivo evolution to colistin resistance by PmrB sensor kinase mutation in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* is associated with low-dosage colistin treatment. Antimicrob Agents Chemother 2014;58:4399–403.

[16] Gutu AD, Sgambati N, Strasbourger P, Brannon MK, Jacobs MA, Haugen E, et al. Polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa phoQ* mutants is dependent on additional two-component regulatory systems. Antimicrob Agents Chemother 2013;57:2204–15.

[17] Gutu AD, Rodgers NS, Park J, Moskowitz SM. *Pseudomonas aeruginosa* high-level resistance to polymyxins and other antimicrobial peptides requires *cprA*, a gene that is disrupted in the PAO1 strain. Antimicrob Agents Chemother 2015;59:5377–87.

[18] Owusu-Anim D, Kwon DH. Differential role of two-component regulatory systems (*phoPQ* and *pmrAB*) in polymyxin B susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. Adv Microbiol 2012;2:31–6.

[19] Schurek KN, Sampaio JLM, Kiffer CRV, Sinto S, Mendes CMF, Hancock REW. Involvement of *pmrAB* and *phoPQ* in polymyxin B adaptation and inducible resistance in non-cystic fibrosis clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2009;53:4345–51.

Please cite this article in press as: Sophie Baron, Linda Hadjadj, Jean-Marc Rolain, Abiola Olumuyiwa Olaitan, Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns, International Journal of Antimicrobial Agents (2016), doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023

[20] Gunn JS, Miller SI. PhoP–PhoQ activates transcription of *pmrAB*, encoding a two-component regulatory system involved in *Salmonella typhimurium* antimicrobial peptide resistance. J Bacteriol 1996;178:6857–64.
[21] Park YK, Lee J-Y, Ko KS. Transcriptomic analysis of colistin-susceptible and colistin-resistant isolates identifies genes associated with colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. Clin Microbiol Infect 2015;21:765, e1–7.
[22] Cannatelli A, D'Andrea MM, Giani T, Di Pilato V, Arena F, Ambretti S, et al. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP *mgrB* regulator. Antimicrob Agents Chemother 2013;57:5521–6.
[23] Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas M-V, Ozdamar M, Türkoglu S, et al. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 2015;70:75–80.
[24] Cheng Y-H, Lin T-L, Pan Y-J, Wang Y-P, Lin Y-T, Wang J-T. Colistin resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* strains from Taiwan. Antimicrob Agents Chemother 2015;59:2909–13.
[25] Gaibani P, Lombardo D, Lewis RE, Mercuri M, Bonora S, Landini MP, et al. In vitro activity and post-antibiotic effects of colistin in combination with other antimicrobials against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates. J Antimicrob Chemother 2014;69:1856–65.
[26] Giani T, Arena F, Vaggelli G, Conte V, Chiarelli A, Henrici De Angelis L, et al. Large nosocomial outbreak of colistin-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* traced to clonal expansion of an *mgrB* deletion mutant. J Clin Microbiol 2015;53:3341–4.
[27] Bonura C, Giuffrè M, Aleo A, Fasciana T, Di Bernardo F, Stampone T, et al. An update of the evolving epidemic of bla_{KPC} carrying *Klebsiella pneumoniae* in Sicily, Italy, 2014: emergence of multiple non-ST258 clones. PLoS ONE 2015;10:e0132936.
[28] Olaitan AO, Rolain J-M. Interruption of *mgrB* in the mediation of colistin resistance in *Klebsiella oxytoca*. Int J Antimicrob Agents 2015;46:354–5.
[29] Jayol A, Poirel L, Villegas M-V, Nordmann P. Modulation of *mgrB* gene expression as a source of colistin resistance in *Klebsiella oxytoca*. Int J Antimicrob Agents 2015;46:108–10.
[30] Formosa C, Herold M, Vidaillac C, Duval RE, Dague E. Unravelling of a mechanism of resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* using atomic force microscopy. J Antimicrob Chemother 2015;70:2261–70.
[31] Zowawi HM, Forde BM, Alfaresi M, Alzarouni A, Farahat Y, Chong T-M, et al. Stepwise evolution of pandrug-resistance in *Klebsiella pneumoniae*. Sci Rep 2015;5:15082.
[32] López-Camacho E, Gómez-Gil R, Tobes R, Manrique M, Lorenzo M, Galván B, et al. Genomic analysis of the emergence and evolution of multidrug resistance during a *Klebsiella pneumoniae* outbreak including carbapenem and colistin resistance. J Antimicrob Chemother 2014;69:632–6.
[33] Cannatelli A, Santos-Lopez A, Giani T, Gonzalez-Zorn B, Rossolini GM. Polymyxin resistance caused by *mgrB* inactivation is not associated with significant biological cost in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2015;59:2898–900.
[34] Qureshi ZA, Hittle LE, O'Hara JA, Rivera JI, Syed A, Shields RK, et al. Colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: beyond carbapenem resistance. Clin Infect Dis 2015;60:1295–303.
[35] Kim Y, Bae IK, Jeong SH, Yong D, Lee K. In vivo selection of pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* during antibiotic treatment. Yonsei Med J 2015;56:928–34.
[36] Leskinen K, Varjosalo M, Li Z, Li C-M, Skurnik M. Expression of the *Yersinia enterocolitica* O:3 LPS O-antigen and outer core gene clusters is RfaH-dependent. Microbiology 2015;161:1282–94.
[37] Llewellyn AC, Zhao J, Song F, Parvathareddy J, Xu Q, Napier BA, et al. NaxD is a deacetylase required for lipid A modification and *Francisella* pathogenesis. Mol Microbiol 2012;86:611–27.
[38] Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompart CM, Albertí S, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. Infect Immun 2004;72:7107–14.
[39] De Majumdar S, Yu J, Fookes M, McAteer SP, Llobet E, Finn S, et al. Elucidation of the RamA regulon in *Klebsiella pneumoniae* reveals a role in LPS regulation. PLoS Pathog 2015;11:e1004627.
[40] Selasi GN, Nicholas A, Jeon H, Lee YC, Yoo JR, Heo ST, et al. Genetic basis of antimicrobial resistance and clonal dynamics of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* sequence type 191 in a Korean hospital. Infect Genet Evol 2015;36:1–7.
[41] Moffatt JH, Harper M, Harrison P, Hale JDF, Vinogradov E, Seemann T, et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:4971–7.
[42] Bojkovic J, Richie DL, Six DA, Rath CM, Sawyer WS, Hu Q, et al. Characterization of an *Acinetobacter baumannii lptD* deletion strain: permeability defects and response to inhibition of lipopolysaccharide and fatty acid biosynthesis. J Bacteriol 2015;198:731–41.
[43] Mahamad Maifiah MH, Cheah S-E, Johnson MD, Han M-L, Boyce JD, Thamlikitkul V, et al. Global metabolic analyses identify key differences in metabolite levels between polymyxin-susceptible and polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii*. Sci Rep 2016;6:22287.
[44] Wand ME, Bock LJ, Bonney LC, Sutton JM. Retention of virulence following adaptation to colistin in *Acinetobacter baumannii* reflects the mechanism of resistance. J Antimicrob Chemother 2015;70:2209–16.
[45] García-Quintanilla M, Carretero-Ledesma M, Moreno-Martínez P, Martín-Peña R, Pachón J, McConnell MJ. Lipopolysaccharide loss produces partial colistin dependence and collateral sensitivity to azithromycin, rifampicin and vancomycin in *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents 2015;46:696–702.
[46] Vila-Farrés X, Ferrer-Navarro M, Callarisa AE, Martí S, Espinal P, Gupta S, et al. Loss of LPS is involved in the virulence and resistance to colistin of colistin-resistant *Acinetobacter nosocomialis* mutants selected in vitro. J Antimicrob Chemother 2015;70:2981–6.
[47] Chambers JR, Sauer K. The MerR-like regulator BrlR impairs *Pseudomonas aeruginosa* biofilm tolerance to colistin by repressing PhoPQ. J Bacteriol 2013;195:4678–88.
[48] Srinivasan VB, Rajamohan G. KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother 2013;57:4449–62.
[49] Warner DM, Levy SB. Different effects of transcriptional regulators MarA, SoxS and Rob on susceptibility of *Escherichia coli* to cationic antimicrobial peptides (CAMPs): Rob-dependent CAMP induction of the *marRAB* operon. Microbiology 2010;156:570–8.
[50] Parra-Lopez C, Baer MT, Groisman EA. Molecular genetic analysis of a locus required for resistance to antimicrobial peptides in *Salmonella typhimurium*. EMBO J 1993;12:4053–62.
[51] McCoy AJ, Liu H, Falla TJ, Gunn JS. Identification of *Proteus mirabilis* mutants with increased sensitivity to antimicrobial peptides. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2030–7.
[52] Hood MI, Jacobs AC, Sayood K, Dunman PM, Skaar EP. *Acinetobacter baumannii* increases tolerance to antibiotics in response to monovalent cations. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:1029–41.
[53] Muller C, Plésiat P, Jeannot K. A two-component regulatory system interconnects resistance to polymyxins, aminoglycosides, fluoroquinolones, and β-lactams in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2011;55:1211–21.
[54] Young ML, Bains M, Bell A, Hancock RE. Role of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprH in polymyxin and gentamicin resistance: isolation of an OprH-deficient mutant by gene replacement techniques. Antimicrob Agents Chemother 1992;36:2566–8.
[55] Li X-Z, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Rev 2015;28:337–418.
[56] Ni W, Li Y, Guan J, Zhao J, Cui J, Wang R, et al. Effects of efflux pump inhibitors on colistin resistance in multidrug-resistant Gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother 2016;60:3215–18.
[57] Spinosa MR, Progida C, Talà A, Cogli L, Alifano P, Bucci C. The *Neisseria meningitidis* capsule is important for intracellular survival in human cells. Infect Immun 2007;75:3594–603.
[58] Keo T, Collins J, Kunwar P, Blaser MJ, Iovine NM. *Campylobacter* capsule and lipooligosaccharide confer resistance to serum and cationic antimicrobials. Virulence 2011;2:30–40.
[59] Llobet E, Tomás JM, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. Microbiology 2008;154:3877–86.
[60] Herrera CM, Crofts AA, Henderson JC, Pingali SC, Davies BW, Trent MS. The *Vibrio cholerae* VprA–VprB two-component system controls virulence through endotoxin modification. MBio 2014;5:e02283–14. Erratum in: mBio 2015;6:e00155.
[61] Bilecen K, Fong JCN, Cheng A, Jones CJ, Zamorano-Sánchez D, Yildiz FH. Polymyxin B resistance and biofilm formation in *Vibrio cholerae* are controlled by the response regulator CarR. Infect Immun 2015;83:1199–209.
[62] Rubin EJ, Herrera CM, Crofts AA, Trent MS. PmrD is required for modifications to *Escherichia coli* endotoxin that promote antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother 2015;59:2051–61.
[63] Boll JM, Tucker AT, Klein DR, Beltran AM, Brodbelt JS, Davies BW, et al. Reinforcing lipid A acylation on the cell surface of *Acinetobacter baumannii* promotes cationic antimicrobial peptide resistance and desiccation survival. MBio 2015;6:e478–15.
[64] Kumar M, Gupta A, Sahoo RK, Jena J, Debata NK, Subudhi E. Functional genome screening to elucidate the colistin resistance mechanism. Sci Rep 2016;6:23156.
[65] Wright MS, Suzuki Y, Jones MB, Marshall SH, Rudin SD, van Duin D, et al. Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. Antimicrob Agents Chemother 2015;59:536–43.
[66] Cheng Y-H, Lin T-L, Lin Y-T, Wang J-T. Amino acid substitutions of CrrB responsible for resistance to colistin through CrrC in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2016;60:3709–16.
[67] Jayol A, Nordmann P, Desroches M, Decousser J-W, Poirel L. Acquisition of broad-spectrum cephalosporin resistance leading to colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2016;60:3199–201.
[68] Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis 2016;16:161–8.
[69] Hasman H, Hammerum AM, Hansen F, Hendriksen RS, Olesen B, Agersø Y, et al. Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark. Euro Surveill 2015;2015:20. doi:10.2807/1560-7917.ES.2015.20.49.30085.

Please cite this article in press as: Sophie Baron, Linda Hadjadj, Jean-Marc Rolain, Abiola Olumuyiwa Olaitan, Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns, International Journal of Antimicrobial Agents (2016), doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023

[70] Arcilla MS, van Hattem JM, Matamoros S, Melles DC, Penders J, de Jong MD, et al. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. Lancet Infect Dis 2016;16:147–9.
[71] Webb HE, Granier SA, Marault M, Millemann Y, den Bakker HC, Nightingale KK, et al. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. Lancet Infect Dis 2016;16:144–5.
[72] Tse H, Yuen K-Y. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. Lancet Infect Dis 2016;16:145–6.
[73] Olaitan AO, Chabou S, Okdah L, Morand S, Rolain J-M. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. Lancet Infect Dis 2016;16:147.
[74] Hu Y, Liu F, Lin IYC, Gao GF, Zhu B. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. Lancet Infect Dis 2016;16:146–7.
[75] Falgenhauer L, Waezsada S-E, Yao Y, Imirzalioglu C, Käsbohrer A, Roesler U, et al. Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum β-lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. Lancet Infect Dis 2016;16:282–3.
[76] Malhotra-Kumar S, Xavier BB, Das AJ, Lammens C, Butaye P, Goossens H. Colistin resistance gene *mcr-1* harboured on a multidrug resistant plasmid. Lancet Infect Dis 2016;16:283–4.
[77] Malhotra-Kumar S, Xavier BB, Das AJ, Lammens C, Hoang HTT, Pham NT, et al. Colistin-resistant *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* isolated from food animals in Hanoi, Vietnam. Lancet Infect Dis 2016;16:286–7.
[78] Haenni M, Poirel L, Kieffer N, Châtre P, Saras E, Métayer V, et al. Co-occurrence of extended spectrum β lactamase and MCR-1 encoding genes on plasmids. Lancet Infect Dis 2016;16:281–2.
[79] Stoesser N, Mathers AJ, Moore CE, Day NP, Crook DW. Colistin resistance gene *mcr-1* and pHNSHP45 plasmid in human isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Lancet Infect Dis 2016;16:285–6.
[80] Petrillo M, Angers-Loustau A, Kreysa J. Possible genetic events producing colistin resistance gene *mcr-1*. Lancet Infect Dis 2016;16:280.
[81] Suzuki S, Ohnishi M, Kawanishi M, Akiba M, Kuroda M. Investigation of a plasmid genome database for colistin-resistance gene *mcr-1*. Lancet Infect Dis 2016;16:284–5.
[82] Poirel L, Kieffer N, Liassine N, Thanh D, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*. Lancet Infect Dis 2016;16:281.
[83] Du H, Chen L, Tang Y-W, Kreiswirth BN. Emergence of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. Lancet Infect Dis 2016;16:287–8.
[84] Yao X, Doi Y, Zeng L, Lv L, Liu J-H. Carbapenem-resistant and colistin-resistant *Escherichia coli* co-producing NDM-9 and MCR-1. Lancet Infect Dis 2016;16:288–9.
[85] Perrin-Guyomard A, Bruneau M, Houée P, Deleurme K, Legrandois P, Poirier C, et al. Prevalence of *mcr-1* in commensal *Escherichia coli* from French livestock, 2007 to 2014. Euro Surveill 2016;21:doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.6.30135.
[86] Zurfuh K, Poirel L, Nordmann P, Nüesch-Inderbinen M, Hächler H, Stephan R. Occurrence of the plasmid-borne *mcr-1* colistin resistance gene in extended-spectrum-β-lactamase-producing Enterobacteriaceae in river water and imported vegetable samples in Switzerland. Antimicrob Agents Chemother 2016;60:2594–5.
[87] Thanh DP, Tuyen HT, Nguyen TGT, The HC, Wick RR, Thwaites GE, et al. Inducible colistin resistance via a disrupted plasmid-borne *mcr-1* gene in a 2008 Vietnamese *Shigella sonnei* isolate. J Antimicrob Chemother 2016;71:2314–17.
[88] Quesada A, Ugarte-Ruiz M, Iglesias MR, Porrero MC, Martínez R, Florez-Cuadrado D, et al. Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine in Spain. Res Vet Sci 2016;105:134–5.
[89] Grami R, Mansour W, Mehri W, Bouallègue O, Boujaâfar N, Madec J-Y, et al. Impact of food animal trade on the spread of *mcr-1*-mediated colistin resistance, Tunisia, July 2015. Euro Surveill 2016;21:doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.8.30144.
[90] *One case of mcr-1 resistance confirmed in British Columbia*. BC Centre for Disease Control; 2016 Jan 25.
[91] Battisti A. Antibiotic resistance—Italy: colistin, MCR-1, *E. coli*, turkeys, 2014. ProMED mail 20160113.3933461. 2016 Jan 13.
[92] Shen Z, Wang Y, Shen Y, Shen J, Wu C. Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. Lancet Infect Dis 2016;16:293.
[93] Zhi C, Lv L, Yu L-F, Doi Y, Liu J-H. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. Lancet Infect Dis 2016;16:292–3.
[94] Zhang R, Huang Y, Chan EW-C, Zhou H, Chen S. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. Lancet Infect Dis 2016;16:291–2.
[95] Ruppé E, Chatelier EL, Pons N, Andremont A, Ehrlich SD. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. Lancet Infect Dis 2016;16:290–1.
[96] Mulvey MR, Mataseje LF, Robertson J, Nash JHE, Boerlin P, Toye B, et al. Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. Lancet Infect Dis 2016;16:289–90.
[97] Kluytmans-van den Bergh MF, Huizinga P, Bonten MJ, Bos M, De Bruyne K, Friedrich AW, et al. Presence of *mcr-1*-positive Enterobacteriaceae in retail chicken meat but not in humans in The Netherlands since 2009. Euro Surveill 2016;21. doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30149.
[98] Elnahriry SS, Khalifa HO, Soliman AM, Ahmed AM, Moustafa AH, Shimamoto T, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in a clinical *Escherichia coli* isolate from Egypt. Antimicrob Agents Chemother 2016;60:3249–50.
[99] Nordmann P, Lienhard R, Kieffer N, Clerc O, Poirel L. Plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* in bacteremia in Switzerland. Clin Infect Dis 2016;62:1322–3.
[100] Zeng K-J, Doi Y, Patil S, Huang X, Tian G-B. Emergence of plasmid-mediated *mcr-1* gene in colistin-resistant *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 2016;60:3862–3.
[101] Cannatelli A, Giani T, Antonelli A, Principe L, Luzzaro F, Rossolini GM. First detection of the *mcr-1* colistin resistance gene in *Escherichia coli* in Italy. Antimicrob Agents Chemother 2016;60:3257–8.
[102] Prim N, Rivera A, Rodríguez-Navarro J, Español M, Turbau M, Coll P, et al. Detection of *mcr-1* colistin resistance gene in polyclonal *Escherichia coli* isolates in Barcelona, Spain, 2012 to 2015. Euro Surveill 2016;21:doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.13.30183.
[103] Ye H, Li Y, Li Z, Gao R, Zhang H, Wen R, et al. Diversified *mcr-1*-harbouring plasmid reservoirs confer resistance to colistin in human gut microbiota. MBio 2016;7:e00177–16.
[104] Kuo S-C, Huang W-C, Wang H-Y, Shiau Y-R, Cheng M-F, Lauderdale T-L. Colistin resistance gene *mcr-1* in *Escherichia coli* isolates from humans and retail meats, Taiwan. J Antimicrob Chemother 2016;71:2327–9. doi: 10.1093/jac/dkw122.
[105] Nguyen NT, Nguyen HM, Nguyen CV, Nguyen TV, Nguyen MT, Thai HQ, et al. The use of colistin and other critical antimicrobials on pig and chicken farms in southern Vietnam and their association with resistance in commensal *Escherichia coli* bacteria. Appl Environ Microbiol 2016;82:3727–35.
[106] Doumith M, Godbole G, Ashton P, Larkin L, Dallman T, Day M, et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. J Antimicrob Chemother 2016;71:2300–5. doi: 10.1093/jac/dkw093.
[107] Li A, Yang Y, Miao M, Chavda KD, Mediavilla JR, Xie X, et al. Complete sequences of *mcr-1*-harboring plasmids from extended-spectrum-β-lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother 2016;60:4351–4.
[108] Rapoport M, Faccone D, Pasteran F, Ceriana P, Albornoz E, Petroni A, et al. First description of *mcr-1*-mediated colistin resistance in human infections caused by *Escherichia coli* in Latin America. Antimicrob Agents Chemother 2016;60:4412–13.
[109] Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, Silva KC, Cunha MP, Esposito F, et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. Euro Surveill 2016;21:doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30214.
[110] Khalifa HO, Ahmed AM, Oreiby AF, Eid AM, Shimamoto T, Shimamoto T. Characterisation of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in *Escherichia coli* isolated from animals in Egypt. Int J Antimicrob Agents 2016;47:413–14.
[111] McGann P, Snesrud E, Maybank R, Corey B, Ong AC, Clifford R, et al. *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and bla_{CTX-M} on a novel IncF plasmid: first report of *mcr-1* in the United States. Antimicrob Agents Chemother 2016;60:4420–1.
[112] Zhang XF, Doi Y, Huang X, Li HY, Zhong LL, Zeng KJ, et al. Possible transmission of *mcr-1*-harboring *Escherichia coli* between companion animals and human. Emerg Infect Dis 2016;22:doi:10.3201/eid2209.160464.
[113] Yu CY, Ang GY, Chin PS, Ngeow YF, Yin WF, Chan KG. Emergence of *mcr-1*-mediated colistin resistance in *Escherichia coli* in Malaysia. Int J Antimicrob Agents 2016;47:504–5.
[114] Anjum MF, Duggett NA, AbuOun M, Randall L, Nunez-Garcia J, Ellis RJ, et al. Colistin resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from a pig farm in Great Britain. J Antimicrob Chemother 2016;71:2306–13. doi: 10.1093/jac/dkw149.
[115] Perreten V, Strauss C, Collaud A, Gerber D. Colistin resistance gene *mcr-1* in avian-pathogenic *Escherichia coli* in South Africa. Antimicrob Agents Chemother 2016;60:4414–15.
[116] Gao R, Li Y, Lin J, Tan C, Feng Y. Unexpected complexity of multidrug resistance in the *mcr-1*-harbouring *Escherichia coli*. Sci China Life Sci 2016;59:732–4.
[117] Yu H, Qu F, Shan B, Huang B, Jia W, Chen C, et al. Detection of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from different hospitals in China. Antimicrob Agents Chemother 2016;60:5033–5.
[118] Sun J, Li XP, Yang RS, Fang LX, Huo W, Li SM, et al. Complete nucleotide sequence of IncI2 plasmid coharboring $bla_{CTX-M-55}$ and *mcr-1*. Antimicrob Agents Chemother 2016;60:5014–17.
[119] Coetzee J, Corcoran C, Prentice E, Moodley M, Mendelson M, Poirel L, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance (MCR-1) among *Escherichia coli* isolated from South African patients. S Afr Med J 2016;106:449–50.
[120] Skov RL, Monnet DL. Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): three months later, the story unfolds. Euro Surveill 2016;21:doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30155.
[121] Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Emergence of colistin-resistant bacteria in humans without colistin usage: a new worry and cause for vigilance. Int J Antimicrob Agents 2016;47:1–3.

Please cite this article in press as: Sophie Baron, Linda Hadjadj, Jean-Marc Rolain, Abiola Olumuyiwa Olaitan, Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns, International Journal of Antimicrobial Agents (2016), doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023

VII. TRAVAUX DE RECHERCHE

1. Etude du mécanisme moléculaire de la résistance à la colistine chez *Proteus vulgaris*.

Loss of aminoarabinose on lipopolysaccharide as the cause of susceptibility to colistin in an atypical clinical isolate of *Proteus vulgaris*. Sophie Baron, Zineb Leulmi, Claude Villard, Abiola Olumuyiwa Olaitan, Amar A. Telke, Noémie Labas, Ti Thien Nguyen and Jean-Marc Rolain. *Submitted in International journal of antimicrobial Agents, (IF: 4,307).*

La colistine agit sur la plupart des entérobactéries à l'exception des genres *Proteus, Serratia, Providencia* ou encore *Morganella* (17). Les gènes impliqués dans la résistance à la colistine tels que l'opéron *arnBCADTEF* ou *etpB* ont été identifiés chez ces bactéries mais il semble que ces gènes soient constitutivement activés par un mécanisme encore inconnu. L'objectif de ce travail était d'identifier le/les gènes impliqué(s) dans la résistance à la colistine chez *Proteus vulgaris* grâce à la comparaison phénotypique et génomique de deux souches cliniques de *P. vulgaris*, une souche anormalement sensible à la colistine et une souche résistante. A l'aide de méthodes phénotypiques, notamment grâce à la microscopie électronique et la spectrométrie de masse, nous avons mis en évidence une diminution significative de la paroi de la souche sensible à la colistine, ainsi qu'une disparition de l'aminoarabinose sur le lipide A. La comparaison des génomes bactériens a permis de mettre en évidence des gènes absents dans la souche sensible mais également de nombreuses variations de séquences entre les deux souches, ces isolats n'étant pas synténiques. Les résultats obtenus par comparaison des phénotypes et la revue de la littérature des gènes impliqués dans la résistance à la colistine nous a permis de nous intéresser en particulier à l'opéron *arnBCADTEF* responsable de la synthèse et de la fixation de l'aminoarabinose sur le lipide A. L'analyse *in silico* des mutations protéiques observées chez la souche sensible par le logiciel PROVEAN nous a permis d'identifier une mutation potentiellement délétère dans le gène *arnD*. L'insertion de ce gène dans la souche sensible à l'aide d'un plasmide a entrainé une augmentation de la Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de la colistine, confirmant l'implication de ce gène dans la perte de la résistance. L'objectif de ce travail était également de mettre en place de nouvelles techniques innovantes au laboratoire, afin de les utiliser dans d'autres projets sur les mécanismes de la résistance.

Elsevier Editorial System(tm) for
International Journal of Antimicrobial Agents
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Inactivation of arn operon and loss of aminoarabinose on lipopolysaccharide as the cause of susceptibility to colistin in an atypical clinical isolate of Proteus vulgaris.

Article Type: Original Article

Keywords: Proteus,
colistin,
resistance mechanism,
aminoarabinose,
arn operon,
lipid A

Corresponding Author: Professor Jean-Marc Rolain,

Corresponding Author's Institution: Université Aix-Marseille

First Author: Sophie Baron

Order of Authors: Sophie Baron; Zineb Leulmi; Claude Villard; Abiola Olumuyiwa Olaitan; Amar A. Telke; Noémie Labas; Ti Thien Nguyen; Jean-Marc Rolain

Abstract: Colistin has become a last-line antibiotic for the treatment of multidrug resistant bacterial infections, but resistance to colistin has emerged in recent years. Some bacteria, such as Proteus sp. or Serratia sp., are intrinsically resistant to colistin but the exact mechanism of this resistance is not known. Here, we have identified the molecular support for the intrinsic colistin resistance in Proteus by comparative genomic transcriptomic and proteomic analysis of colistin susceptible (CSUR P1868_S) strain and a colistin resistant (CSUR P1867_R) strain of an atypical Proteus vulgaris. We found a significant difference in outer membrane glycoside structures in both strains, that was corroborated by MALDI-TOF analysis, which showed absence of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) in outer membrane lipid A moiety of the susceptible strain. Comparative genomic analysis with other resistant strains of P. vulgaris available in local database found mutation in arnBCADTEF operon of the susceptible strain. Transcriptomic analysis of genes belonging to arnBCADTEF operon showed significant decrease in mRNA expression level of those genes in the susceptible strain, supporting that addition L-Ara4N in the outer membrane of lipid A moiety can explain the increase in colistin susceptibility. Insertion of the gene arnD that was suggested to be altered in the susceptible strain by in silico analysis led to a 16-fold increase of colistin MIC in the susceptible strain, confirming its role in colistin resistance in this species. Here, we show that constitutive activation of arn operon and addition of L-ara4N was the main molecular mechanism of resistance to colistin in P. vulgaris.

Highlights

- Colistin resistance mechanism of the frequent pathogen *Proteus vulgaris* is unknown.
- The role of aminoarabinose in colistin resistance in *P. vulgaris* is demonstrated.
- WGS and *in vitro* analysis of this atypical strain improve knowledge of this specie.
- Highlights the potential role of some genes in colistin resistance.

*Manuscript
Click here to view linked References

!

Full-length title: Inactivation of *arn* operon and loss of aminoarabinose on lipopolysaccharide as the cause of susceptibility to colistin in an atypical clinical isolate of *Proteus vulgaris.*

!

Short title (for the running head): Support for colistin resistance in *Proteus vulgaris*!

Author list: Sophie Baron[1], Zineb Leulmi[1], Claude Villard[2], Abiola Olumuyiwa Olaitan[1], Amar A. Telke[1], Noémie Labas[3], Ti Thien Nguyen[3] and Jean-Marc Rolain[1*]!

!

Affiliations: [1] Aix-Marseille Univ., URMITE UM 63 CNRS 7278 IRD 198 INSERM U1905, IHU Méditerranée Infection, Facultés de Médecine et de Pharmacie, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille CEDEX 05, France ; [2] Aix-Marseille Université, Plateforme Protéomique et Innovation Technologique, Faculté de Pharmacie 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille CEDEX 05, France. 3 Pôle des Maladies Infectieuses et Tropicales Clinique et Biologique, Fédération de Bactériologie-Hygiène-Virologie, Centre Hospitalo-Universitaire Timone, IHU Méditerranée Infection, 264 rue Saint-Pierre 13385, Marseille CEDEX 05, France

!

*** Corresponding author:** Jean-Marc ROLAIN, URMITE UM 63 CNRS 7278 IRD 198 INSERM U1095, IHU Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille Université, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille CEDEX 05, France. Phone: (33) 4 91 32 43 75. Email:jean-marc.rolain@univ-amu.fr

!

!

!

Key words: *Proteus*, colistin, resistance mechanism, aminoarabinose, *arn* operon, lipid A

Title<150 words: 141 words

Abstract: 250 words (<250 words).

Total: 4210 words (<4000)

Total figures and tables: 9 (<10)

Total ref: 44 (<40)

!

!

ABSTRACT

Colistin has become a last-line antibiotic for the treatment of multidrug resistant bacterial infections, but resistance to colistin has emerged in recent years. Some bacteria, such as *Proteus sp.* or *Serratia sp.,* are intrinsically resistant to colistin but the exact mechanism of this resistance is not known. Here, we have identified the molecular support for the intrinsic colistin resistance in *Proteus* by comparative genomic transcriptomic and proteomic analysis of colistin susceptible (CSUR P1868_S) strain and a colistin resistant (CSUR P1867_R) strain of an atypical *Proteus vulgaris*. We found a significant difference in outer membrane glycoside structures in both strains, that was corroborated by MALDI-TOF analysis, which showed absence of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) in outer membrane lipid A moiety of the susceptible strain. Comparative genomic analysis with other resistant strains of *P. vulgaris* available in local database found mutation in *arnBCADTEF* operon of the susceptible strain. Transcriptomic analysis of genes belonging to *arnBCADTEF* operon showed significant decrease in mRNA expression level of those genes in the susceptible strain, supporting that addition L-Ara4N in the outer membrane of lipid A moiety can explain the increase in colistin susceptibility. Insertion of the gene *arnD* that was suggested to be altered in the susceptible strain by *in silico analysis* led to a 16-fold increase of colistin MIC in the susceptible strain, confirming its role in colistin resistance in this species. Here, we show that constitutive activation of arn operon and addition of L-ara4N was the main molecular mechanism of resistance to colistin in *P. vulgaris.*

!

!

INTRODUCTION

Antibiotic resistance has been a major public health concern worldwide for a number of years. Increased resistance, especially in Gram-negative bacteria (GNB), has forced clinicians to use more powerful antibiotics in the therapeutic arsenal; broad spectrum antibiotics, especially carbapenems (1). Unfortunately, resistance to carbapenems appeared and spread worldwide (1). Facing this therapeutic impasse, clinicians have revived old antibiotics for the treatment of multi-drug resistant bacterial infections (2), whose use had been abandoned for decades due to their toxicity, such as colistin (3). Colistin is a polycationic antimicrobial peptide of the polymyxin family, belonging to the polymyxin E group, which is effective against numerous GNB. It acts as a detergent on cell membranes of the GNB, moving divalent cations that maintain the electrolytic balance of the cell membrane, causing disruption and lysis of bacteria. Charges in the membrane consist of phosphates that are present in the phospholipids and lipopolysaccharides (LPS) which mainly compose the cell membrane of GNB (3,4). Inexorably, the use of colistin over the past ten years has led to the emergence of resistance to colistin, detected in *Pseudomonas* spp (5), *Klebsiella pneumoniae* (6,7) and *Acinetobacter* spp.(7). Colistin resistance mechanisms are complex, because bacteria have developed numerous defense systems against antimicrobial peptides over a long time (8). They have been mainly studied in the case of acquired resistance, which has explained part of the resistance to colistin in *Enterobacteriaceae* (9,10). The primary mechanism is the synthesis of sugars such as phosphoethanolamine (PEtN) or 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N), which neutralize the negative charges of the cell membrane by binding phosphates to the LPS, preventing the action of colistin (10). This synthesis is regulated by many regulators; some are two component systems (TCS) such as PmrA/PmrB, PhoP/PhoQ, which are themselves regulated by other regulator genes (9). Recently a PEtN transferase encoded by a gene called *mcr-1* has been found on conjugative plasmids in *Escherichia coli* (11), showing for the first

!

time that colistin resistance was not only due to chromosomal mutations, but could be transmissible between bacteria (11).

Some GNB are intrinsically resistant to colistin, including *Proteus, Providencia* or *Morganella* (9,10). In parallel with the emergence of acquired resistance in *Enterobacteriaceae*, an increase in infections due to *Proteus, Providencia* and *Morganella* has been reported in several countries, including Argentina (12), the USA (13), Greece (14) and more recently in France (15). However, the molecular support for the intrinsic resistance to colistin in these bacteria remains largely unknown. *Proteus* bacteria are widely present in the environment and have virulence factors, such as flagella, fimbriae, enzymes (urease, proteases), hemolysins and endotoxins that allow them to colonize catheters (16). They are mainly responsible for urinary tract infections and wound infections in humans (17). *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* are the two original members of the genus *Proteus* and they are also the most commonly found in human infections (16,17). Some studies on *P. mirabilis* have shown that its LPS contains L-Ara4N in lipid A (18,19) well as in the core region (20) that also contains PEtN (20–22). It has also been demonstrated that genes involved in L-Ara4N biosynthesis or regulation can modulate polymyxin resistance in this bacterium (10). Here, we have studied an atypical clinical strain of *P. vulgaris* isolated from a urine sample that was abnormally susceptible to colistin. Our study was to identify the molecular support for the intrinsic resistance to colistin in *P. vulgaris* by comparative genomic, transcriptomic and proteomic approaches of the two strains of *P. vulgaris*, one susceptible and one resistant to colistin, and by in vitro tests that allowed us to highlight morphological and phenotypic differences of this atypical isolate.

MATERIALS AND METHODS

1. Bacterial strains, culture and antimicrobial susceptibility.

!

P. vulgaris strains CSUR P1867_R (colistin-resistant), and CSUR P1868_S (colistin-susceptible) were isolated in the University Hospital of Constantine, Algeria from urine samples of two patients and sent to Marseille for further analysis. Identification of the strains was done by MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight) (23) and confirmed by both 16S ribosomal RNA (rRNA) gene and *rpoB* gene sequence analysis. Antimicrobial susceptibility was performed according to the recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) using the disk diffusion method on Mueller-Hinton (MH) agar medium with commercial antibiotic disks (BioMérieux, France). The minimal inhibitory concentration (MIC) for colistin was evaluated both by E-test (BioMérieux, France) on MH medium and by microdilution method according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) guidelines.

2. Electron scanning microscopy

Fixing and staining with red ruthenium was done according to the Luft method (24). Thin sections were observed in the Tecnai G^2 microscope at 200 Kev with magnification x 100,000-150,000. Measurements of the outer leaflet of the outer membrane were made with ImageJ. For the statistical analysis, we used a Welch two sample t-test.

3. Lipid A analysis

Strains were grown overnight in 10 ml of Luria Broth, under shaking conditions. After centrifugation for 15 min at 4,000 rpm, the pellets were lysed with 1 ml of lysis buffer available in the LPS extraction kit (iNtRON Biotechnology, Korea). Then 200 µL of chloroform was added and samples were placed for 5 minutes at room temperature before being centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4°C. Approximately 400 µL of supernatant were recovered. For the lipid A separation, treatments were done as previously described (25). Briefly, samples were dried and hydrolyzed with a hydrolysis buffer, boiled, dried again and

!

the pellets were suspended in acidified ethanol. After three washes, purified lipid A was suspended in a mix of 100 µL of chloroform-methanol (3:1). A MALDI-TOF/TOF Ultraflex (Bruker) mass spectrometry analysis was performed in negative ion and linear mode. Calibration was done with a mix of peptides and the mass spectrum ranged between 500 and 3500 Da. The matrix used was 2.5-dihydroxybenzoic acid (DHB) at 50% (v1:1). Each final spectrum is the combination of between 5 to 10 spectra.

4. Genome sequencing

Two different methods were done for sequencing strains P1868_S and P1867_R. A shotgun Ion Torrent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) strategy was chosen for strain P1868_S, while strain P1867_R was sequenced by Miseq technology (Illumina Inc, San Diego, CA, USA) with a mate pair strategy. Protocols used are detailed in Supplementary Method S1.

5. Assembly, Mapping and Annotation

P1868_S and P1867_R genome assemblies and annotations were done as previously described (26). The two assembled genomes were mapped on a reference genome of *P. vulgaris* (ATCC49132) available on GenBank (accession No. JPIX00000000) (27) with Mauve software (28). Resistance genes were sought using ARG-ANNOT (29), and plasmids with the help of Blast software.

6. Comparative genomic analysis

!

The genome of strain CSUR P1868_S was compared to two genomes of *P. vulgaris* resistant to colistin, strain CSUR P1867_R and *P. vulgaris* ATCC49132 (JPIX00000000.1), using RAST annotation (30). We selected a group of genes of interest that were absent in the colistin-susceptible strain, but shared by the two other strains.

We also compared protein sequences of more than one hundred genes involved either in the synthesis, modification or transport of lipid A or in the synthesis of other components of LPS and its assembly in order to identify truncated or mutated proteins. Among these genes, we first selected a group of genes already known to be involved in polymyxin resistance with KEGG Mapper software (31), Uniprot annotation (32) and a polymyxin resistance bibliography. We compared genes from our three genomes by protein alignment and we noted non-significant mutations (nsSNPs) present in the susceptible strain.

7. Sequences alignment, phylogenetic analysis and PROVEAN score analysis.

Phylogenetic trees were constructed with MEGA v5 (33). All complete sequences of *arn* proteins available on PubMed were recovered for *Proteus sp.,* as well as one sequence of each for *Providencia sp, Morganella sp.* and *E. coli.* Sequences were aligned using ClustalW and the frequency of non-significant mutations (nsSNPs) previously noted was checked. Phylogenetic trees were constructed using maximum likewood with a bootstrap method with 1000 replications, a Jones-Taylor-Thornton model in uniform rate in complete deletion and a Nearest-Neighbor-Interchange heuristic method. In order to support effect of mutation in protein, PROVEAN score (34) was calculated to detect if mutation was deleterious or neutral.

8. DNA sequencing and transcriptomic analysis

All genes potentially absent were amplified by standard PCR (Supplementary Method S2 and S3) to confirm their absence. Primers are available in Supplementary Table S1.

!

!

RNA extraction was performed following the same procedure previously described (35). The RNA was quantified with a NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). The RNA of P1867_R and P1868_S were respectively 174.2 and 150.03 ng/µL. The reference chosen for quantification was the housekeeping *rplS* gene. Real-time RT-PCR was carried out with the SuperScript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen). Briefly, the mix was prepared with 12.5 µL of a 2X reaction mix, 0.5 µL of *Taq* polymerase mix, 0.5 µL of each primer (concentration 10 µM), 0.25 µL of fluorogenic probe (concentration 10 µM) and 2 µL of RNA from each template (concentration 5 ng/µL). Water was added to obtain a final volume of 25 µL. PCR amplification was performed in duplicate as follows: 50°C for 15 min, 95°C for 2 min, and then 40 cycles of 15 s at 95°C and 30 s at 60°C. The ΔΔCt method was used to calculate the relative RNA expression level and a t student was realized to compare the susceptible and the resistant strains.

9. ArnD cloning in *P. vulgaris* CSUR P1868_S

We constructed a plasmid containing the *arnD* sequence gene of the colistin resistance *P. vulgaris* P1867_R using Genscript (Genscript USA Inc, Piscataway, United States). The gene was inserted in a pET-24a(+) expression vector, initially adapted to *E. coli* species. This vector contains a Kanamycin resistance gene to select transformed strains after transformation. Cloning site was determined between NdeI and NotI. Colonies of *P. vulgaris* P1868_S were transformed as electrocompetent cell as follow: A fresh culture of cells was inoculated in 500 ml of Luria Bertani (LB) broth at 37°C shaking at 300 rpm until an OD600 of approximatively 0.5-0.7. Cells were let 20 min in ice at 0°C and then centrifugate at 40000 G for 15 min at 4°C in order to recover the pellet. The pellet is then successively resuspended in three decreasing volumes of ice-cold 10% glycerol, after recovering the pellet by centrifugation at 4000G for 15 min at 4 ° C. The final pellet is then resuspended in 1 ml of ice-cold 10% glycerol and distributed by 50 µL of suspended cells in tubes. Transformation of

!

!

electrocompetent cells of *P. vulgaris* P1868_S were done by thermic shock. Briefly, 50 µL of suspended cells is thawed and 5 µL of plasmidic AND is added. The mix is incubated 30 min in ice at 0°C. It is after incubated 30 seconds at 42°C and then back in ice for 2 minutes. 450 µL of SOC medium is added in the sample and let one hour at 37°C under shaking. Finally, 100 µL were inoculated in Luria Bertani (LB) with 4 µg/mL colistin agar plate. The remaining 400 µL were concentrated in 100 µL of SOC after centrifugation and incubated in LB with 8 µg/mL colistin and 100 µg/mL kanamycin agar plate.

10. Sequence data accession number.

Genomes of *P. vulgaris* CSUR P1867_R and CSUR P1868_S have been deposited in the EMBL database under accession numbers CVRY01000001.1 and CVRZ01000001.1, respectively.

RESULTS

1. Antimicrobial susceptibility

The strain CSUR P1867_R (Collection de Souche de l'URMITE) was susceptible to cefoxitin, cefotaxime, ceftriaxone, aztreonam, imipenem, ofloxacin, ciprofloxacin, gentamicin, amikacin, tobramycin and trimethoprim-sulfamethoxazole and resistant to colistin colistin (MIC >256 mg/L on E-test and by microdilution method, Fig. 1). The strain CSUR P1868_S was susceptible to amikacin and colistin (MIC = 0.019 mg/L on E-test, 0.5 mg/L by microdilution method, Fig. 1.). Diameters of inhibition are reported in Table 1.

2. Electron microscopy

Twenty-five measurements of the outer leaflet of the outer membrane of *P. vulgaris* CSUR P1868_S and 30 measurements of the strain CSUR P1867_R were done. The mean diameter of the cell wall was respectively 13.8 nm for strain CSUR P1867_R (m=13.8 ± 1.9 nm; 95%

!

CI = [13.1; 14.5]) and 2.10 nm for strain P1868_S (m=2.10±0.41, 95% CI = [1.93; 2.27]). Statistical analysis gave a significant difference between the two means with a p-value of 2.2e-16 with an α risk of 0.05 (Fig. 2).

3. LPS analysis

MALDI-TOF Ultraflex analysis was used to analyse the LPS from the two strains (CSUR P1867_R and CSUR P1868_S) of *P. vulgaris* (Fig. 3). First, we identified specific peaks for each strain. Nine peaks seemed to be unique for strain P1868_S in a mass spectrum comprised between 753 to 2006 Da. (annotated in red on the spectrum), and 11 peaks were found only in strain P1867_R, between 745 and 2750 Da (in red also). Second, we tried to find a peak corresponding to the lipid A of *P. vulgaris.* According to several publications (18,20,36), lipid A of bacteria of the genus *Proteus* consists of a β (1-6) linked D-glucosamine disaccharide, substituted by 7 fatty acid chains. Two phosphate groups link the disaccharide in 1 and 4'carbon positions. On carbon 4', the phosphate group is substituted by an L-ara4N that confers bacterial resistance to colistin (19). The theoretical mass of lipid A is 1962 Da for the hepta-acylated form substituted with L-ara-4N. In the case of the colistin-resistant strain, a peak at 1958 Da that corresponds to lipid A substituted by one L-Ara4N was present, as well as a peak at 1827 Da related to hepta-acylated form of lipid A without L-Ara4N. Interestingly, in the susceptible strain P1868_S, the global spectrum was similar to the resistant strain, except between the 1800 and 2100 Da range, related to lipid A masses. The peak at 1958 Da was absent, suggesting that lipid A was not substituted by L-ara4N. Furthermore, the peak at 1827 Da, corresponding to hepta-acylation of lipid A, was absent, and replaced by an 1835 Da that was related to the hepta-acylated form of unsubstituted lipid A. Mass difference between the two lipid A (1827 and 1835 Da) can be explained by the low probability that isotopes present in these high molecular weight molecules are always the same. A mass difference

!

about ±14Da compared to the expected molecular weight. Lipid A seems to be substituted into its form hepta- but not hexa-acylated, which corresponds to its leading form (37).

4. Genome composition of *P. vulgaris* strains

The genome of *P. vulgaris* CSUR P1867_R was assembled into 13 contigs with a length of contigs ranging from 919 to 733,430 bp. The GC content was 38.08% for a chromosome size of 3,872,427 bp. The genome contained 10 rRNA and 73 tRNA. No plasmid was detected in this strain. The assembly of the shotgun sequences from CSUR P1868_S gave 60 contigs, in lengths ranging from 820 to 651,297 bp, with a total size of 4,284,734 bp, with a GC content of 37.78%. The genome contained 9 rRNA and 74 tRNA. A total of 16 contigs for a length of 131,855 bp was associated with a conjugative plasmid from *Providencia rettgeri* with a length of 50 kB that shared 90% coverage and 99% identity (38).

5. Antibiotic Resistome

Comparative analysis of the resistome of strain P1868_S and P1867_R identified genes that were responsible for the ESBL-phenotype in the P1868_S strain: bla*PER-1* and bla*OXA-10*. Other genes that constitute the resistome of P1868_S are reported in Supplementary Table S2. In the strain P1867_R, we found only bla*HugA*, an inducible class A β-lactamase (100% coverage, 98% identity, e-value 0.00 with *HugA* of *P. penneri*) which confers resistance to cefuroxime and cefotaxime, and few putative β-lactamase.

6. Comparative genomic analysis

As our two strains of *P. vulgaris* were not syntenic, gene polymorphism was numerous and difficult to compare and to separate polymorphism from mutation altering the protein function. We decided to focus on genes already known or supposed to play a role in colistin resistance (Supplementary Table S3). We first compared protein sequences of each gene of the *arnBCADTEF* operon to highlight missense mutations. It appeared that nsSNPs were quite

!

!

variable in all proteins, with a range of 1 to 18, depending on the proteins (Table 2). This high level of mutation seems significant, since these proteins are critical for colistin resistance in this species, suggesting that it should be highly conserved among different strains. However, some nsSNPs are present only in the susceptible strains and could have an impact on colistin resistance (9). These nsSNPs are noted in bold in Table 2. Protein alignment and mutation frequency of Arn proteins of *P. mirabilis, P. vulgaris, Providencia sp.* and *Morganella sp.* was done, in order to select mutations that were conserved in other strains but not in the susceptible strain (Table 3). Phylogenetic trees confirmed that proteins of the susceptible strain were different from other *Proteus sp.* proteins, especially for ArnA (Fig. 4), ArnB ArnF and ArnT (Supplementary Fig. S1). In order to establish if these mutations could have an impact on protein function, the PROVEAN score (34) was calculated for each nsSNPs in *Proteus vulgaris* P1868_S. Results showed that only one mutation was deleterious in *arnD.* In addition, mass spectrometry analysis showed that lipid A seems not to be substituted by L-Ara4N. Transcriptomic analysis of the *arnBCADTEF* operon was done to detect altered gene expressions (Fig. 5). We found that *arnB* and *arnT* were significantly downregulated ($p<0.0002$ and $p<0.0001$ respectively) in the susceptible strain respectively, explaining that L-ara4N fixation on lipid A was altered. Finally, we cloned the *arnD* gene in the colistin-susceptible *P. vulgaris* P1868_S strain. We obtained a transconjugant strain that was isolated on LB agar plate with 8 µg/mL colistin and 100 µg/mL kanamycin. This led to a 16-fold increase of colistin MIC from 0.5 µg/mL to 16 µg/mL in the mutant, confirming the role of *arnD* gene in the *Proteus* genus (Fig. 6).

The genome comparison of strain P1868_S with the two resistant strains ATCC49132 and P1867_R identified 19 genes that were absent in the susceptible strain but present in the two resistant genomes. Absence of these genes in the susceptible strain was verified first by *in silico* blastN (NCBI), and confirmed by standard PCR (listed in Supplementary Table S4.).

!

!

Absent genes contained a TCS YedW/YedY involved in copper regulation but with a specific function still undefined, and a cluster of 8 genes involved in sialic acid metabolism, two genes coding for a sulfoxide reductase enzyme, two genes coding for a dihydroxyacetone kinase subunit that belong to a phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system, and two genes involved in LPS biosynthesis, one epimerase that changes galactose to glucose and one sugar isomerase involved in O-antigen biosynthesis.

DISCUSSION

Proteus bacteria are *Enterobacteriaceae* which are naturally resistant to colistin. To our knowledge, only few publications dating from 1962 and 1971 have reported the existence of *Proteus* strains susceptible to polymyxins (39–41). In 1962, Huang et al. (39) reported that 1.4% of *P. mirabilis* and 5% of *P. vulgaris* were susceptible to polymyxin B. Similarly, Goodwin et al. (41) in 1971 reported 48 *P. vulgaris* and 4 *P. mirabilis* susceptible to colistin sulfomethate, isolated from clinical samples between 1967 and 1970. Nevertheless, it should be noted that these publications are ancient, and the methods used for species identification and antibiotic susceptibility testing were different from today, and thus identification of the species is questionable. Other cases of *Proteus* strains susceptible to colistin reported since 1971 are only in vitro mutants (20,42). Here, we found that susceptibility to colistin in our isolate was due to inactivation of the *arnBCADTEF* operon and the absence of the amino-arabinose addition in lipid A. The first remarkable phenotype of our strain was its very low MIC to colistin (0.5 µg/mL). *Proteus* strains are usually resistant to colistin, with MICs between 16 and >128 mg/L (43). This drastic decrease of colistin MIC suggested that an essential mechanism for colistin resistance was affected. Electron microscopy showed a dramatic decrease of outer leaflet thickness of the external membrane in the susceptible strain as compared to the resistant strain P1867_R. This significant decrease seemed to be the consequence of the loss of red ruthenium-stained outer membranes structures. These

!

glycoside structures may be absent in the susceptible strain P1868_S. In *Proteus*, sugars modifying LPS are critical for polymyxin resistance. Based on these results, it was assumed that the gene involved in sugar biosynthesis or fixation was responsible for the loss of colistin resistance. Although the MALDI-TOF spectrum of *P. vulgaris* lipid A has not been reported, we speculate that it is similar to the lipid A from *P. mirabilis*. Lipid A analysis of *P. mirabilis* and antimicrobial peptide mutants (20) showed a lipid A peak at 1960 Da, which disappeared in mutants that became colistin-susceptible due to the loss of L-Ara-4N, as observed in our *Proteus*. This phenotypic finding suggests that L-ara-4N biosynthesis and fixation to the lipid A pathway was altered in our susceptible strain. One particular mutation in the *arnD* gene was predicted to be deleterious for gene function. Moreover, the *arnBCADTEF* operon showed a significant decreased expression in the susceptible strain as compared to the resistant strain, demonstrating that altered fixation of L-ara4N shown in lipid A was the reason for colistin susceptibility. Finally, the insertion of the *arnD* gene in the susceptible strain led to a 16-fold increase of colistin MIC, showing the role of this gene in *P. vulgaris* colistin resistance. This increase of MIC was important but failed to recover the intial MIC of >256 µg/mL. One explanation can be that the plasmid was not fully adapted to *P. vulgaris* as the GC% is lower in this species as compared to *Escherichia coli* and our strain lost rapidly the plasmid.

Interestingly, our strain also lacks an operon of 8 genes involved in sialic acid metabolism compared to the resistant strains. Sialic acid is the only nine-carbon sugar found in prokaryotes that can participate in cellular membrane synthesis by decorating membrane structures or by being a source for the synthesis of other aminosugars. To date, sialic acid has not been involved in colistin resistance. However, it has already been reported in *Campylobacter jejuni* (44) that the loss of *cstII*, a sialyltransferase, was responsible for an increase of polymyxin susceptibility. In *Proteus* bacteria, the role of sialic acid is unknown,

!

and we were unable to demonstrate if the loss of this operon could be linked to the loss of colistin resistance in this particular strain.

One main limitation of our study was that our strains were not syntenic and difficult to compare because of the high level of gene polymorphism. *P. vulgaris* is intrinsically resistant to colistin and is rarely found susceptible in the "natural environment". As this species is intrinsically resistant to colistin, it is unlikely to encounter the same clone in the two forms, susceptible and resistant. However, the existence of an *in vivo* colistin susceptible strain is really interesting since it has never been described before to our knowledge. The only way to study this "nonresistance" was to compare it to others members of *P. vulgaris* species.

Finally, questions about the evolutionary advantage of this particular isolate, as compared to other *Proteus,* remain interesting. This strain was isolated as a mixed population with another *P. mirabilis* that was colistin-resistant. Such a population could be viewed or interpreted as "heteroresistant"; i.e., a part of the bacterial population is susceptible and the other part is resistant. Why? Is it a sympatric way of life within a population for survival in harsh environments? Conversely, this strain has acquired many resistant genes, thanks to a plasmid that could be an advantage in this symbiosis for the duo. The genomic evolution of this atypical strain remains unknown, but its study allows us to better understand a colistin-resistant pathway in naturally resistant Gram-negative bacteria. Further studies are ongoing to elucidate its genomic evolution as compared to other colistin-resistant strain.

!

!

Aknowledgment: We thank Olivier Croce for genome arrangement and Linda Hadjadj for technical assistance.

Funding information: This work was partly supported by the Centre national de la recherche scientifique (CNRS) and Institut hospitalo-universitaire (IHU) Méditerranée Infection.

Conflicts of interest: None.

!

REFERENCES

1. Kelly AM, Mathema B, Larson EL. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in the community: a scoping review. Int J Antimicrob Agents. 2017 Jun 21;

2. Basetti M, Peghin M, Pecori D. The management of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. Curr Opin Infect Dis. 2016 Dec;

3. Biswas S, Brunel J-M, Dubus J-C, Reynaud-Gaubert M, Rolain J-M. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. Expert Rev Anti Infect Ther. 2012 Aug;10(8):917–34.

4. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2005 May 1;40(9):1333–41.

5. Johansen HK, Moskowitz SM, Ciofu O, Pressler T, Høiby N. Spread of colistin resistant non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* among chronically infected Danish cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros. 2008 Sep;7(5):391–7.

6. Mammina C, Bonura C, Di Bernardo F, Aleo A, Fasciana T, Sodano C, et al. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 2012;17(33).

7. Arduino SM, Quiroga MP, Ramírez MS, Merkier AK, Errecalde L, Di Martino A, et al. Transposons and integrons in colistin-resistant clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* with epidemic or sporadic behaviour. J Med Microbiol. 2012 Oct;61(Pt 10):1417–20.

8. Gruenheid S, Moual HL. Resistance to antimicrobial peptides in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Lett. 2012 May 1;330(2):81–9.

9. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. Front Microbiol. 2014;5:643.

10. Baron S, Hadjadj L, Rolain J-M, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. Int J Antimicrob Agents. 2016 Dec;48(6):583–91.

11. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016 Feb;16(2):161–8.

12. Merkier AK, Rodríguez MC, Togneri A, Brengi S, Osuna C, Pichel M, et al. Outbreak of a Cluster with Epidemic Behavior Due to *Serratia marcescens* after Colistin Administration in a Hospital Setting. J Clin Microbiol. 2013 Jul;51(7):2295–302.

13. Hayakawa K, Marchaim D, Divine GW, Pogue JM, Kumar S, Lephart P, et al. Growing prevalence of *Providencia stuartii* associated with the increased usage of colistin at a tertiary health care center. Int J Infect Dis. 2012 Sep;16(9):e646–8.

14. Samonis G, Korbila IP, Maraki S, Michailidou I, Vardakas KZ, Kofteridis D, et al. Trends of isolation of intrinsically resistant to colistin *Enterobacteriaceae* and association with colistin use in a tertiary hospital. Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol. 2014 Sep;33(9):1505–10.

15. Abat C, Desboves G, Olaitan AO, Chaudet H, Roattino N, Fournier P-E, et al. Increasing burden of urinary tract infections due to intrinsic colistin-resistant bacteria in hospitals in Marseille, France. Int J Antimicrob Agents. 2015 février;45(2):144–50.

16. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. Nat Rev Microbiol. 2015 May;13(5):269–84.

17. Drzewiecka D. Significance and Roles of *Proteus spp.* Bacteria in Natural Environments. Microb Ecol. 2016 Nov;

18. Sidorczyk Z, Zähringer U, Rietschel ET. Chemical structure of the lipid A component of the lipopolysaccharide from a *Proteus mirabilis* Re-mutant. Eur J Biochem FEBS. 1983 Dec 1;137(1-2):15–22.

19. Knirel YA, Perepelov AV, Kondakova AN, Senchenkova SN, Sidorczyk Z, Rozalski A, et al. Structure and serology of O-antigens as the basis for classification of *Proteus* strains. Innate Immun. 2011 Feb 1;17(1):70–96.

20. McCoy AJ, Liu H, Falla TJ, Gunn JS. Identification of *Proteus mirabilis* mutants with increased sensitivity to antimicrobial peptides. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Jul;45(7):2030–7.

21. Vinogradov E, Cedzynski M, Rozalski A, Ziolkowski A, Swierzko A. The structure of the carbohydrate backbone of the core-lipid A region of the lipopolysaccharide from Proteus vulgaris serotype O25. Carbohydr Res. 2000 Oct 6;328(4):533–8.

22. Radziejewska-Lebrecht J, Mayer H. The core region of *Proteus mirabilis* R110/1959 lipopolysaccharide. Eur J Biochem FEBS. 1989 Aug 15;183(3):573–81.

23. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P-E, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2009 Aug 15;49(4):543–51.

24. Luft JH. Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use for electron microscopy and mechanism of action. Anat Rec. 1971 Nov;171(3):347–68.

25. Lee H, Hsu F-F, Turk J, Groisman EA. The PmrA-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. J Bacteriol. 2004 Jul;186(13):4124–33.

26. Asmar S, Phelippeau M, Robert C, Croce O, Drancourt M. Draft Genome Sequence of Mycobacterium bohemicum Strain DSM 44277T. Genome Announc. 2015 Aug 27;3(4):e00878–15.

27. Minoque T, Daligault HE, Davenport KW, Bishop-Lilly KA. Draft Genome Assemblies of *Proteus mirabilis* ATCC 7002 and *Proteus vulgaris* ATCC 49132. Genome Announcements [Internet]. 2014 Oct 23 [cited 2015 Apr 7]; Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25342681

28. Rissman AI, Mau B, Biehl BS, Darling AE, Glasner JD, Perna NT. Reordering contigs of draft genomes using the Mauve aligner. Bioinforma Oxf Engl. 2009 Aug 15;25(16):2071–3.

29. Gupta SK, Padmanabhan BR, Diene SM, Lopez-Rojas R, Kempf M, Landraud L, et al. ARG-ANNOT, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(1):212–20.

30. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, et al. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). Nucleic Acids Res. 2014 Jan;42(Database issue):D206–14.

31. Kanehisa M. Molecular network analysis of diseases and drugs in KEGG. Methods Mol Biol Clifton NJ. 2013;939:263–75.

32. UniProt Consortium. Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource. Nucleic Acids Res. 2011 Jan;39(Database issue):D214–9.

33. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol. 2011 Oct;28(10):2731–9.

34. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. PLoS ONE. 2012 Oct 8;7(10):e46688.

35. Telke AA, Rolain J-M. Functional genomics to discover antibiotic resistance genes: The paradigm of resistance to colistin mediated by ethanolamine phosphotransferase in Shewanella algae MARS 14. Int J Antimicrob Agents. 2015 Dec;46(6):648–52.

36. Caroff M, Karibian D, Cavaillon JM, Haeffner-Cavaillon N. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. Microbes Infect Inst Pasteur. 2002 Jul;4(9):915–26.

37. Murphy RC, Raetz CRH, Reynolds CM, Barkley RM. Mass spectrometry advances in lipidomica: collision-induced decomposition of Kdo2-lipid A. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2005 Sep;77(1-4):131–40.

38. Mataseje LF, Boyd DA, Lefebvre B, Bryce E, Embree J, Gravel D, et al. Complete sequences of a novel blaNDM-1-harbouring plasmid from *Providencia rettgeri* and an FII-type plasmid from *Klebsiella pneumoniae* identified in Canada. J Antimicrob Chemother. 2014 Mar;69(3):637–42.

39. Huang CT, Chou G. Drug sensitivity of *Proteus* species. J Clin Pathol. 1968 Jan;21(1):103–6.

40. Fekety FR, Norman PS, Cluff LE. The treatment of gram-negative bacillary infections with colistin. The toxicity and efficacy of large doses in forty-eight patients. Ann Intern Med. 1962 Aug;57:214–29.

41. Goodwin CS, Kliger BN, Drewett SE. Colistin-sensitive *Proteus* organisms: including indole-negative *Proteus vulgaris,* non-swarming on first isolation. Br J Exp Pathol. 1971 Apr;52(2):138–41.

42. Kaca W, Radziejewska-Lebrecht J, Bhat UR. Effect of polymyxins on the lipopolysaccharide-defective mutants of *Proteus mirabilis*. Microbios. 1990;61(246):23–32.

43. Jean S-S, Lee W-S, Yu K-W, Liao C-H, Hsu C-W, Chang F-Y, et al. Rates of susceptibility of carbapenems, ceftobiprole, and colistin against clinically important bacteria collected from intensive care units in 2007: Results from the Surveillance of Multicenter Antimicrobial Resistance in Taiwan (SMART). J Microbiol Immunol Infect [Internet]. [cited 2016 Apr 8]; Available from: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1684118215000213

44. Naito M, Frirdich E, Fields JA, Pryjma M, Li J, Cameron A, et al. Effects of Sequential *Campylobacter jejuni* 81-176 Lipooligosaccharide Core Truncations on Biofilm Formation, Stress Survival, and Pathogenesis. J Bacteriol. 2010 Apr;192(8):2182–92.

!

Tables and Figures

Table number: 3

Table 1. Antimicrobial susceptibility testing for the two strains studied: P1867_R and P1868_S

Table 2. nsSNPs of Arn proteins of *P. vulgaris* P1868_S compared with P1867_R, ATCC49132 and between P1867_R and ATCC49132. The nsSNPs in bold represent amino acids that are the same in the two resistant strains but different in the susceptible one.

Table 3. List of nsSNPs of P1868_S, frequence in proteins of *Proteus* found in Pubmed and PROVEAN score for Arn operon.

Figure number: 6

Fig. 1. Colistin E-test for strains P1867_R (left.), P1868_S (right).

Fig. 2. Electronic microscopy pictures of strain P1868_S (a. and c.) colistin susceptible and strain P1867_R (b. and d.), resistant to colistin. e. Box plot of the outer leaflet thickness of external membrane showing a significant difference.

Fig. 3. Mass spectra of LPS of *P. vulgaris* CSUR P1867_R (a.) and CSUR P1868_S (b.) Lipid A correspond to the following peaks: 1827 and 1815 Da respectively for P1867_R and P1868_S.

Fig. 4. Phylogenetic tree of ArnA protein of *Proteus spp.* *P. vulgaris* P1867_R colistin resistant is marked in red and *P. vulgaris P1868_S* colistin susceptible is marked in green. This tree shows that although these proteins are closely related in the genus *Proteus sp.,* the

!

susceptible ArnA protein seems to have some particular characteristics that differentiates it from others proteins.

Fig. 5. mRNA expression relative fold of *arnB* and *arnT1* using ΔΔCt method

Fig. 6. Increase MIC of colistin in *P. vulgaris* P1868_CS and in P1868_CS. Growth curve were performed by spectrophotometry. PC: Positive control

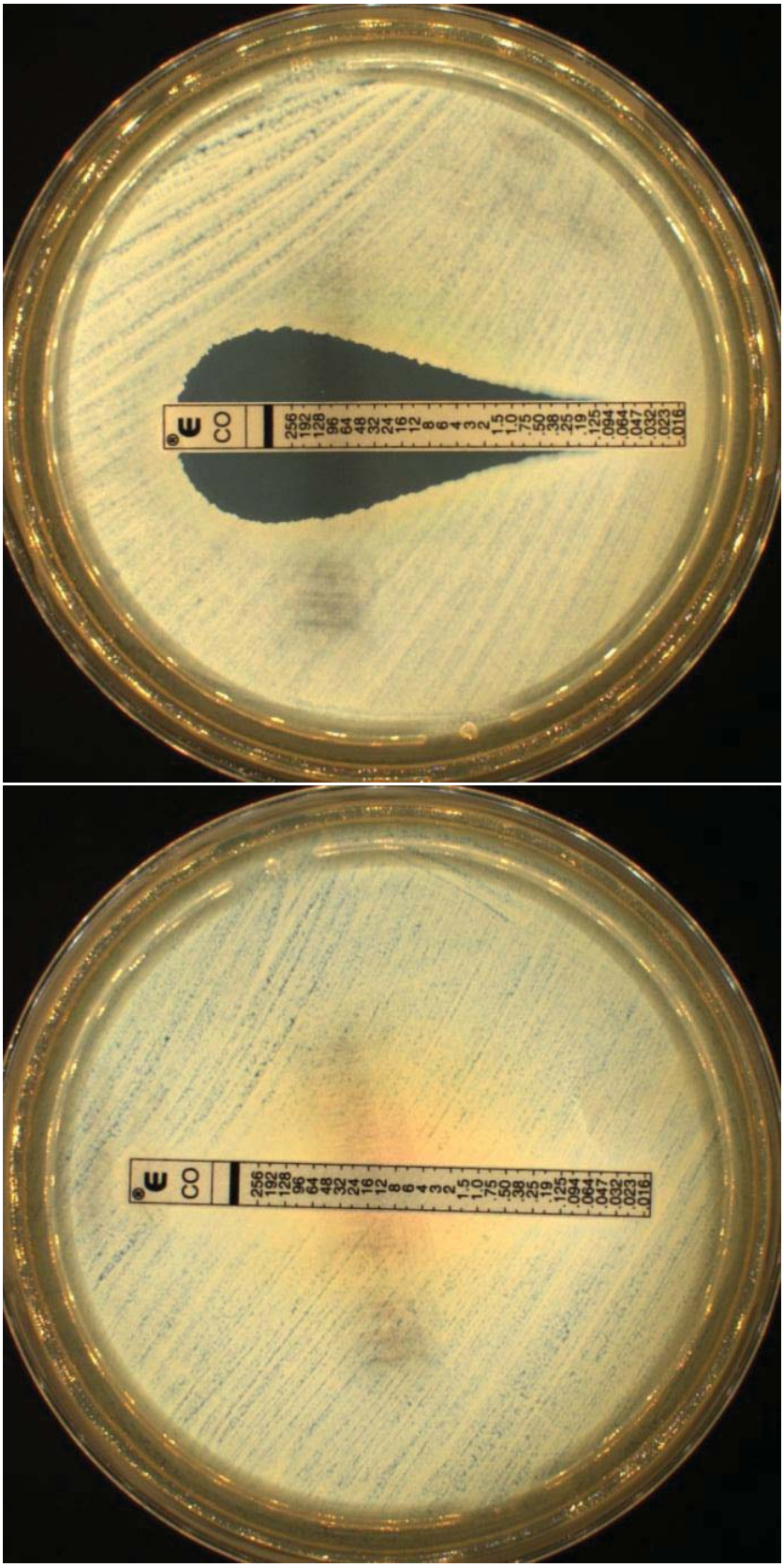

E
CO
256
192
128
96
64
48
32
24
16
12
8
6
4
3
2
1.5
1.0
.75
.50
.38
.25
.19
.125
.094
.064
.047
.032
.023
.016
E
CO
256
192
128
96
64
48
32
24
16
12
8
6
4
3
2
1.5
1.0
.75
.50
.38
.25
.19
.125
.094
.064
.047
.032
.023
.016

Figure 1

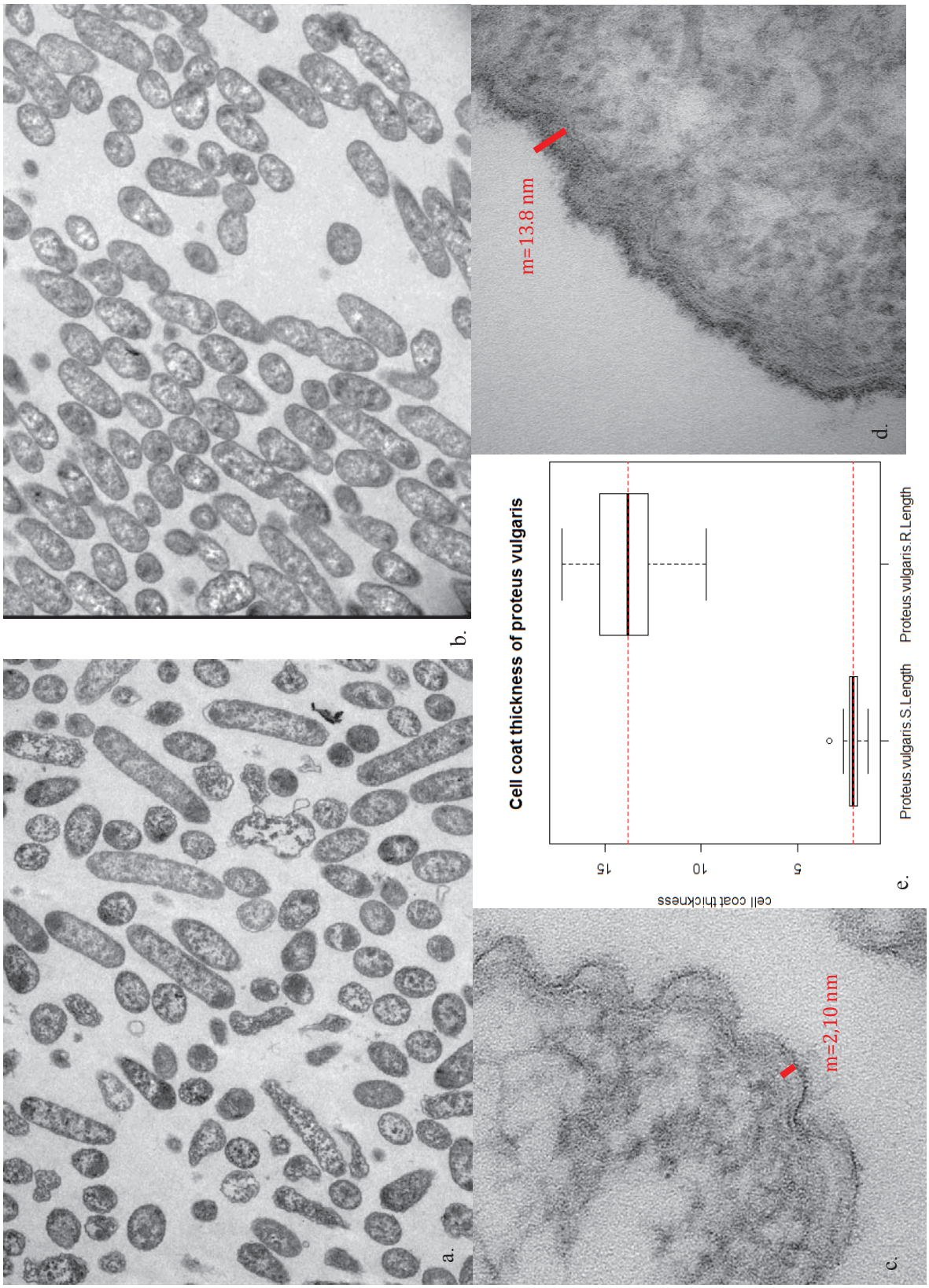

a.
b.
m=13.8 nm
d.
Cell coat thickness of proteus vulgaris
cell coat thickness
15
10
5
Proteus vulgaris S. Length
Proteus vulgaris R. Length
e.
m=2,10 nm
c.

Figure 2

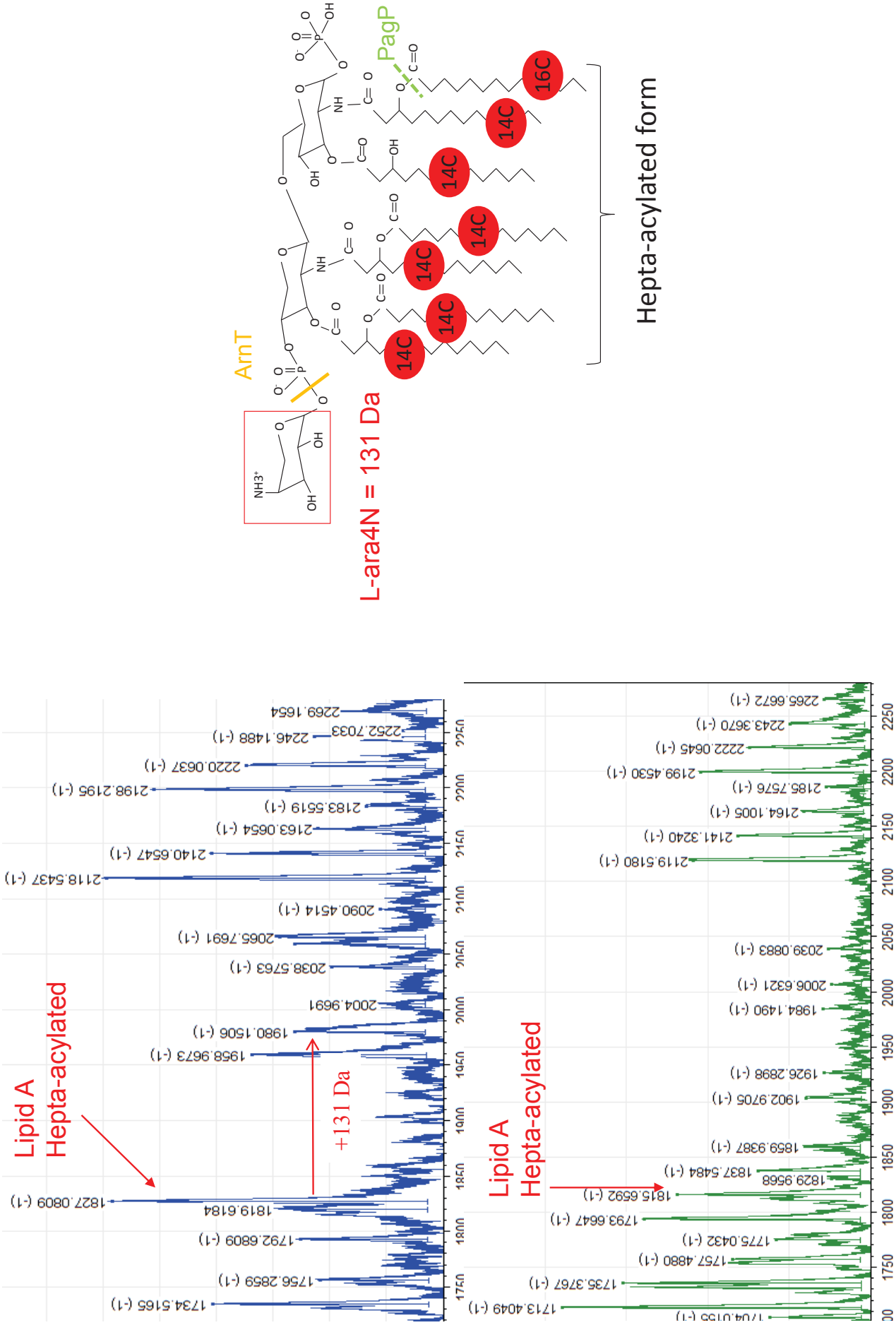

ArnT
L-ara4N = 131 Da
PagP
14C
16C
Hepta-acylated form
Lipid A
Hepta-acylated
+131 Da
1734.5165 (-1)
1756.2859 (-1)
1792.6809 (-1)
1819.6184
1827.0809 (-1)
1958.9673 (-1)
1980.1506 (-1)
2004.9691
2038.5763 (-1)
2065.7691 (-1)
2090.4514 (-1)
2118.5437 (-1)
2140.6547 (-1)
2163.0654 (-1)
2183.5519 (-1)
2198.2195 (-1)
2220.0637 (-1)
2246.1488 (-1)
2252.7033
2269.1654
1713.4049 (-1)
1735.3767 (-1)
1757.4880 (-1)
1775.0432 (-1)
1793.6647 (-1)
1815.6592 (-1)
1829.9568
1837.5484 (-1)
1859.9387 (-1)
1902.9705 (-1)
1926.2898 (-1)
1984.1490 (-1)
2006.6321 (-1)
2039.0883 (-1)
2119.5180 (-1)
2141.3240 (-1)
2164.1005 (-1)
2185.7576 (-1)
2199.4530 (-1)
2222.0645 (-1)
2243.3670 (-1)
2265.6672 (-1)

Figure 3

gi|927574918|gb|ALE25197.1|Proteus vulgaris
gi|927571775|gb|ALE22055.1|Proteus mirabilis
gi|702063654|gb|KGQ15431.1|Proteus mirabilis
gi|806987842|gb|KKC60780.1|Proteus mirabilis
gi|955367767|gb|KSA05235.1|Proteus mirabilis
gi|960437713|gb|KSW19243.1|Proteus mirabilis
gi|960439713|gb|KSW21161.1|Proteus mirabilis
gi|404600621|gb|EKB01051.1|Proteus mirabilis WGLW6
gi|194682410|emb|CAR42271.1|Proteus mirabilis HI4320
gi|685233047|gb|KGA89669.1|Proteus mirabilis
gi|721502922|gb|KGY46414.1|Proteus mirabilis
gi|404596490|gb|EKA97010.1|Proteus mirabilis WGLW4
gi|721498596|gb|KGY42117.1|Proteus mirabilis
gi|721494596|gb|KGY38118.1|Proteus mirabilis
gi|721558892|gb|KGZ02216.1|Proteus mirabilis
gi|490371840|ref|WP 004251444.1|Proteus mirabilis
gi|529187816|gb|AGS59576.1|Proteus mirabilis BB2000
gi|529248395|ref|WP 020945551.1|Proteus mirabilis
gi|721595901|gb|KGZ39169.1|Proteus mirabilis
gi|258598045|gb|ACV83328.1|Proteus mirabilis
gi|960702821|gb|KSX93648.1|Proteus mirabilis
gi|983382113|ref|WP 060559382.1|Proteus mirabilis
gi|685172262|gb|KGA59919.1|Proteus vulgaris ATCC 49132
gi|739065970|ref|WP 036937379.1|Proteus vulgaris
gi|857587433|emb|CRL58941.1|Proteus vulgaris P1867 R
gi|831646564|gb|KLU19383.1|Proteus mirabilis
gi|558648563|gb|EST59027.1|Proteus hauseri ZMd44
gi|559232004|ref|WP 023582377.1|Proteus hauseri
gi|857775776|emb|CRL64736.1|Proteus vulgaris P1868 S
gi|455421151|gb|AGG31481.1|Morganella morganii subsp. morganii KT
gi|577074765|gb|EUD10947.1|Providencia alcalifaciens 205/92
gi|16130190|ref|NP 416758.1|Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655
99
63
71
86
99
99
65
73
99
64
82
0.05

Figure 4

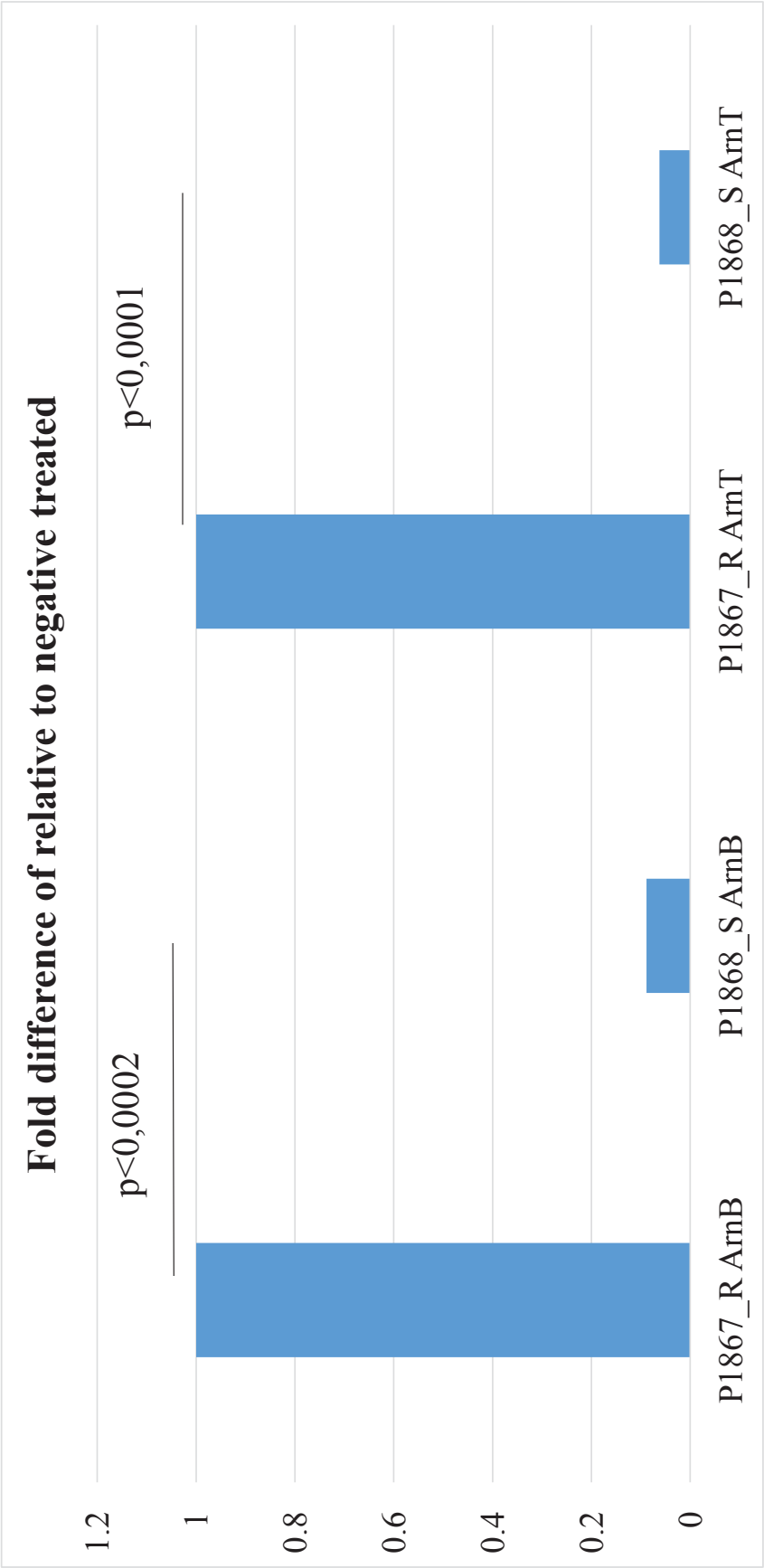

Fold difference of relative to negative treated
p<0,0002
p<0,0001
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
P1867_R ArnB
P1868_S ArnB
P1867_R ArnT
P1868_S ArnT

Figure 5

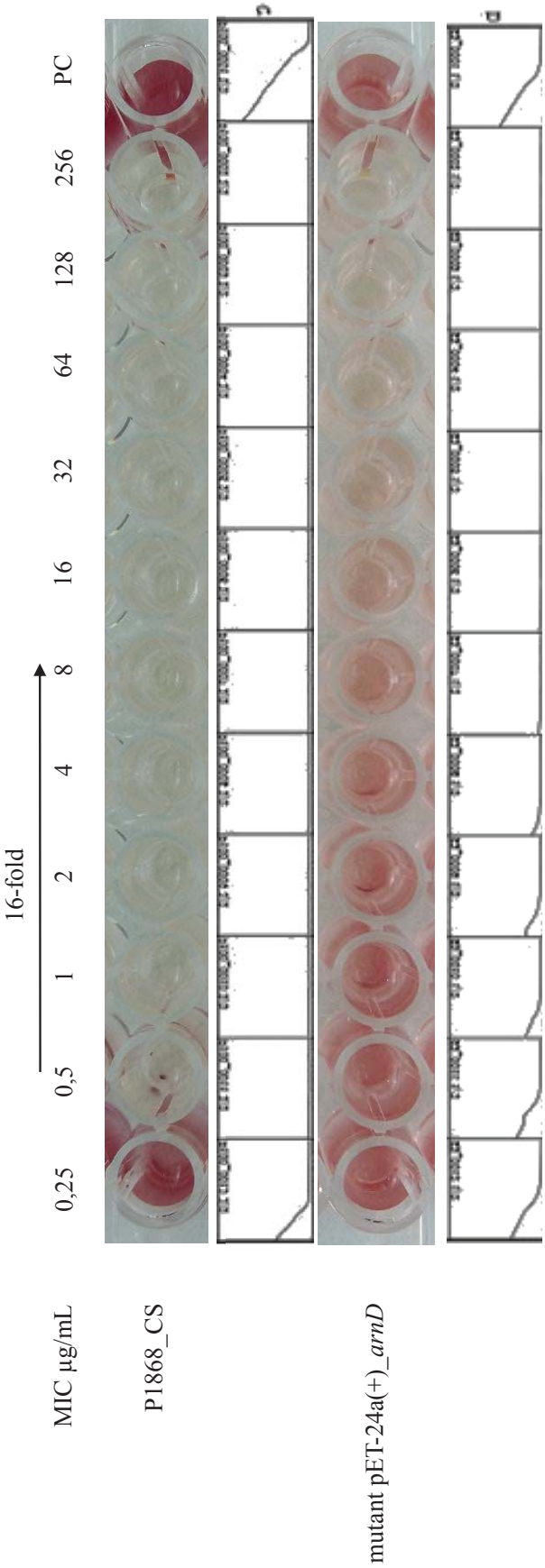

MIC µg/mL
0,25
0,5
1
2
4
8
16
32
64
128
256
PC
16-fold
P1868_CS
mutant pET-24a(+)_*arnD*

Figure 6

Table 1. Antimicrobial susceptibility testing for the two strains studied: P1867_R and P1868_S.

Diameter (mm)	CT MM (µg/ml)	AMX	AMC	TCC	TZP	FOX	CTX	CRO	ATM	IPM	OFX	CIP	CN(15 µg/ml)	AN	TM	SXT
CSUR P1867_R	R (>256)	R (6)	R (18)	S (28)	S (37)	S (21)	S (32)	S (32)	S (34)	S (26)	S (30)	S (36)	S (22)	S (23)	S (19)	S (23)
CSUR P1868_S	S (0.5)	R (6)	R (10)	I* (28)	S (29)	S (20)	R (14)	R (13)	R (6)	S (23)	R (9)	R (15)	R (6)	S (22)	R (6)	R (6)

AMX=amoxicillin; TCC= Ticarcillin + clavulanic acid; AMC=Amoxicillin + clavulanic acid; TZP= Piperacillin + tazobactam; FOX= cefoxitine; CTX=cefotaxime; CRO= ceftriaxone; ATM= aztreonam; IPM=imipenem; OFX= ofloxacin; CIP= ciprofloxacin; CN=gentamicin; AN= amikacin; TM= tombramycin; SXT= trimethoprim + sulfamethoxazole. * Extended spectrum beta-lactamase with synergistic activity between clavulanic acid and 3rd generation cephalosporine!

Table 2. nsSNPs of Arn proteins of *P. vulgaris* P1868_S compared with P1867_R, ATCC49132 and between P1867_R and ATCC49132. The nsSNPs in bold represent amino acids that are the same in the two resistant strains but different in the susceptible one.

Protein	nsSNPs with P1867_R	nsSNPs with ATCC49132	nsSNPs between P1867_R and ATCC49132
ArnB	**M87I**; A174S; **R251G**; D254E; K277E; **V281I**; N300S; T301I; A308T; **D317E**; S339A; N362S; E364Q	Y36H; **M87I;** K96E; N110S; **R251G**; T265A; **D317E**; D364Q	H36Y; E96K; S110N; A174S; D254E; A265T; K277E; V281I; N300S; T301I; A308T; S339A; N362S; E364D
ArnC	E6K; **E38K**. **I73V**. **V96I**; A116T; D172E; I256V	**E38K**; T63A; **I73V**; **V96I**	E6K; A63T; A115T; D172E; I256V
ArnA	E153T; S176A; V181A; A247V; I248V; **A270E**; **T659D**	I122V; S146A; E154D; E170N; S202C; V212A; V241I; T247V; **A270E**; Q271K; T294A; L311Q; G339D; S556N; **N659D**	V122I; A146S; E153T; D154E; N170E; S176A; V181A; C202S; A212V; I241V; A247T; I248V; K271Q; A294T; Q311L; D339G; N556S; T659N
ArnD	**R29K**; Y33H; D99N; S113G; **G119A**; V140A; N165T; K167Q; Y178H	F13Y; **R29K**; **G119A**; K143N	Y13F; Y33H; D99N; S113G; V140A; N143K; N145T; K147Q; Y178H
ArnT	I67V; **I146V**; H201Y; **V230I**; **V244I**; V267I; V268I; **I284M**; **F300L**; **I305V**; I364V; **V368I; V372A**; N448D;	**I146V**; V170I; V198I; L217F; **V230I**; **V244I**; A259S; V267I; **I284M**; **F300L**; **I305V**; V368I; V372A; D441E; T452A; E490R; D491E; A495S; L507Q	I67V; I170V; I198V; H201Y; F297L; S259A; V268I; I364V; E441D; N448D; A452T; R490E; E491D; S495A; Q507L
ArnE	I44V; T47A; F51L; M78V; V104I	T110A	I44V; T47A; F51L; M78V; A100T; V104I
ArnF	**I8M**; **V16A**; **Q36R**; L38F; **A45D**; A47I; M48T; L49P; A51S; T55A; **F69L**; **A113I**; P131S	**I8M**; **V16A**; G27E; **Q36R**; **A45D**; S55A; **F69L**; I73T; **A113I**; V117I; T126P; G128E; A129S; Q130T	E27G; L38F; A47I; M48T; L49P; A51S; T55S; T73I; I117V; P126T; E128G; S129A; T130Q; P131S

nsSNPs in bold represent amino acid that are the same in the two resistant strains but different in the susceptible one.

Table 3. List of nsSNPs of P1868_S, frequence in proteins of *Proteus* found in Pubmed and PROVEAN score for Arn operon.

	SNP in P1867_R	nsSNP in P1868_S	nsSNP In *Proteus* sp.	PROVEAN Score in P1868_S
ArnA	A270	E270	1/29	Neutral (-1.176)
	T659	D659	1/29	Neutral (1.429)
ArnB	M87	I87	12/14	Neutral (1.043)
	R251	G251	2/14	Neutral (-1.546)
	D317E	E317	11/14	Neutral (-1.074)
	E364	Q364	1/14	Neutral (-0.725)
ArnC	E38	K38	1/22	Neutral (-0.558)
	I73	V73	1/22	Neutral (-0.497)
	V96	I96	1/22	Neutral (-0.175)
ArnD	R29	K29	22/27	Neutral (0.846)
	G119	A119	1/27	**Deleterious (-4.489)**
ArnE	-			
ArnF	I8	M8	1/31	Neutral (-0.249)
	V16	A16	3/31	Neutral (-0.400)
	Q36	R36	1/31	Neutral (-0.846)
	A45	D45	1/31	Neutral (-0.777)
	F69	L69	24/31	Neutral (-0.619)
	A113	I113	24/31	Neutral (-0.762)
ArnT	I146	V146	30/33	Neutral (-0.409)
	V230	I230	3/33	Neutral (0.679)
	V244	I244	1/33	Neutral (-0.767)
	I284	M284	3/33	Neutral (0.899)
	F300	L300	31/33	Neutral (2.875)
	I305	V305	30/33	Neutral (0.086)

2. Etude du rôle de l'efflux dans la résistance à la colistine chez les entérobactéries.

L'efflux est un mécanisme ubiquitaire utilisé par les bactéries dans la résistance aux antibiotiques (48). Bien que la résistance à la colistine soit principalement médiée par l'ajout de L-amino-4-arabinose ou de phosphoéthanolamine au niveau des phosphates du lipide A (18), le mécanisme d'efflux participe aussi à cette résistance chez certaines bactéries à Gram négatif. Des pompes à efflux de type RND (Resistance-Nodulation-Division) tel que le complexe AcrAB-TolC ou des pompes de type SMR (Small Multidrug Resistance) tels que KpnEF sont capables de transporter la colistine à l'extérieur de la bactérie (17). Ce mécanisme n'est généralement pas spécifique d'un seul antibiotique et agit souvent en synergie avec d'autres mécanismes de résistance. Récemment, nous avons montré dans notre laboratoire le rôle de la pompe AcrAB-TolC dans l'hétérorésistance à la colistine chez deux souches d'*Enterobacter cloacae* et *Enterobacter asburiae* (47). Nous avons cherché à savoir si ce mécanisme pouvait être commun à toutes les Entérobactéries et en particulier à *Serratia marcescens*, une Entérobactérie intrinsèquement résistante à la colistine ayant pour particularité de posséder une hétérorésistance à la colistine similaire à celle de nos souches d'*Enterobacter*. Pour connaître l'influence et le rôle du mécanisme d'efflux chez les entérobactéries, nous avons étudié la sensibilité d'un panel de 93 bacilles à Gram négatifs (BGN) (90 Entérobactéries et 3 *Pseudomonas aeruginosa*) résistantes à la colistine en présence de carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP), un inhibiteur de pompe à efflux. Il s'agit d'un ionophore à proton qui agit en bloquant l'énergie nécessaire au fonctionnement des pompes à efflux principalement de type RND, tel que AcrAB-TolC (48). Cet inhibiteur est non spécifique mais l'objectif était de connaitre l'impact de l'efflux sur la résistance à la colistine chez ces bactéries en fonction des mécanismes identifiés. La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) de la colistine a été réalisée par la méthode en microdilution en l'absence et en présence de 10 µg/mL de CCCP. En parallèle, le diamètre d'inhibition de la colistine sur milieu Mueller-Hinton gélosé sans et avec 10 µg/mL de CCCP a été également déterminé. Les résultats ont montré une diminution significative de la CMI en milieu liquide ($p<0.001$) après addition dans le milieu de CCCP. Toutes les souches sont redevenues sensibles à la colistine, avec une diminution de la CMI d'au moins 8 fold pour 96,8% (90/93) des souches. L'étude de l'impact de l'inhibition de l'efflux par germe et par mécanisme a montré une plus grande restauration de la sensibilité chez les souches hétérorésistantes et intrinsèquement résistantes à la colistine, suggérant un rôle plus important

de l'efflux chez ces bactéries. Cependant, l'inhibition de l'efflux a également permis de reverser la sensibilité des souches portant le gène *mcr-1* ou présentant des mutations chromosomiques impliquant l'addition de sucres au niveau du lipide A. Ces résultats nous permettent de comprendre un peu plus les mécanismes de résistance à la colistine chez les bactéries qui y résistent naturellement et nous donnent des pistes dans le traitement des bactéries multi-résistantes. En effet, l'association d'inhibiteurs de pompes à efflux et de la colistine dans le traitement d'infections à bactéries résistantes à la colistine permettrait une nouvelle option thérapeutique dans ces infections difficiles à traiter.

Title: CCCP reversible effect on colistin minimum inhibitory concentration in *mcr-1* plasmid-mediated colistin resistant strains and Gram negative bacteria.

Short title: CCCP reverse colistin resistance in Gram negative bacteria.

Authors list: Sophie Baron[1] and Jean-Marc Rolain[1#].

Affiliations: [1] Aix-Marseille Univ., URMITE UM 63 CNRS 7278 IRD 198 INSERM U1905, Méditerranée Infection, Facultés de Médecine et de Pharmacie, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille CEDEX 05, France; [2] Pôle des Maladies Infectieuses et Tropicales Clinique et Biologique, Fédération de Bactériologie-Hygiène-Virologie, Centre Hospitalo-Universitaire Timone, Méditerranée Infection, 264 rue Saint-Pierre 13385, Marseille CEDEX 05, France. [3] Pôle Oncologie, Spécialités médicales et chirurgicales, Oncologie Médicale et Soins Palliatifs, Centre Hospitalo-Universitaire Timone, Méditerranée Infection, 264 rue Saint-Pierre 13385, Marseille CEDEX 05, France.

[#] **Corresponding author:** Jean-Marc Rolain, URMITE UM 63 CNRS 7278 IRD 198 INSERM U1095, IHU Méditerranée Infection, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix-Marseille Université, 27 boulevard Jean Moulin, 13385 Marseille CEDEX 05, France. Phone: (33) 4 91 32 43 75. Email:jean-marc.rolain@univ-amu.fr

Keywords: colistin resistance; efflux pump inhibitor effect; *mcr-1*; Gram negative bacteria.

DRAFT MANUSCRIT

Abstract

Efflux in bacteria is an ubiquitous mechanism to fight against antibiotic therapy. Some efflux pumps such as AcrAB-TolC have been reported to play a role in colistin resistance in Gram negative bacteria. Efflux pump inhibitors have been developed to inhibit efflux mechanism and could be a good alternative to reverse colistin resistance, but only Cyanide m-Chlorophenylhydrazine (CCCP) showed a good activity. The objective of this work was to identify CCCP activity on a collection of Gram negative bacteria with known and unknown colistin resistance mechanism. Colistin Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was performed with and without CCCP and MIC fold decrease of colistin MIC was calculated for each strain. Statistical analyses showed that the effect of CCCP were significantly more important on intrinsically resistant bacteria than on other *Enterobacteriaceae* ($p<0.0001$) alike on bacteria with a heteroresistance mechanism than in bacteria with another colistin resistance mechanisms ($p <0.0001$). These results suggest an efflux mechanism especially on intrinsic resistant bacteria and *Enterobacter spp* that need further analysis to identify the molecular support of this mechanism. The role of *SoxRS*, an *AcrAB-TolC* regulator has been recently described in an *Enterobacter cloacae* and in an *Enterobacter asburiae* strains, consolidating this hypothesis.

DRAFT MANUSCRIPT

Introduction

Efflux in bacteria is an ubiquitous mechanism to fight against antibiotic therapy **(1)**. Multi-drug pumps are often nonspecific, leading to cross resistance with several antimicrobial compounds and can interact synergistically with other resistance mechanisms in order to increase the resistance level. Colistin resistance mechanisms are complex and involved a lot of genes that are not fully identified **(2)**. The well-known mechanism identified consists to reduce the negative charges of the outer membrane by adding positive charges like sugars (phosphoethanolamine, aminoarabinose) on the lipid A of the lipopolysaccharide yielding to a decrease of electrostatic attraction of polymyxins **(3)**. Several mutations in genes such as the two component systems *pmrA*/*pmrB* and *phoP*/*phoQ*, its negative regulator *mgrB*, or in the aminoarabinose biosynthesis operon *arnBCADTEF* have been involved in colistin resistance **(3)**. Recently, a transferrable colistin-resistant gene *mcr-1* which codes for a phosphoethanolamine transferase has been highlighted and appears to have already spread worldwide **(2)**. Colistin resistance in Gram negative bacteria has emerged over the last few years with its increasing use in human medicine but also its wide use in agriculture especially in animal breeding **(4)**. In some bacteria, efflux pump mechanisms have been reported to play a role in colistin resistance. Many efflux pumps have been identified to reduce colistin susceptibility, such as KpneEF, or AcrAB-TolC complex **(2,3)**. These mechanisms often led to the resistance to others antimicrobial compounds such as aminoglycosides or fluoroquinolones. Various efflux pump inhibitors (EPIs) have been tested on Gram negative bacteria such as Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazine (CCCP), 2,4-dinitrophenol (DNP), Phenylalanine-arginine β-naphthylamide (PABN, NMP), reserpine, omeprazole, verapamil **(1)**. Only CCCP and DNP, which inhibit energy of efflux pumps showed a significant decrease in colistin resistance **(5)**. The effect of EPIs such as CCCP in the reversion of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* **(5)** supported the hypothesis that this mechanism play a role on colistin resistance. More recently, it has also been demonstrated the reversion for colistin resistance by CCCP in the naturally colistin resistant species *Serratia marcescens* **(6)**. In our laboratory, we isolated a collection of well-defined colistin-resistant strains including naturally-resistant Gram negative bacteria and acquired-resistant bacteria (*mcr-1, mgrB, pmrAB*...). Mechanism of resistance of some of these strains are however still unknown. The objective of the study was to evaluate the effect of CCCP on this collection in order to evaluate if the mechanism of resistance can influence the response to efflux pump inhibition and, to evaluate its effect on *mcr-1* plasmid–mediated colistin resistant strain.

Materiel and method

75 **Bacterial strains and mechanism of colistin resistance**

76 Strains used in this study are listed Table 1. Ninety-three strains that were isolated from
77 various human samples except for 3 strains that were isolated from pigs were included in this
78 study. Samples came from France, Laos, Thailand and Nigeria. Some of these strains have
79 already been published **(7–9)**. Mechanisms of resistance to colistin have been studied
80 previously with analysis of PhoP, PhoQ, PmrA, PmrB, MgrB and *mcr-1* performed by real-
81 time PCR (RT-PCR), standard PCR and/or sequencing **(7,8,10)**.

82 **Effect of CCCP on colistin MIC with broth microdilution method.**

83 Exploration of the effect of the oxidative phosphorylation uncoupler CCCP on colistin MIC
84 was performed as follow: MIC determination of colistin was performed according to
85 recommendations of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
86 (EUCAST) using the broth microdilution method. Colistin sulfate salt (MP-Biomedicals,
87 LLC, Illkirch Graffenstaden, France) concentrations ranged from 0.25 to 256 mg/L. Two tests
88 were performed in parallel: one without addition of CCCP and one with the addition of CCCP
89 to each of MH broth medium wells. The final concentration of CCCP in the MH broth
90 medium was 10 mg/L **(5)**. A growth control well containing 10 mg/L CCCP in Mueller-
91 Hinton broth medium was also added for each strain, in order to check the absence of effect of
92 CCCP alone on these strains.

93 The MIC resulting after addition of CCCP was compared to the EUCAST cut-off (established
94 at 2 µg/mL) and the effect was considered as reverse if the strain became again susceptible to
95 colistin.

96 The MIC fold changes resulting after the addition of CCCP was calculated as the ratio of the
97 MICs of the antibiotic without CCCP to that with CCCP. As previously described **(6)**, the
98 positive criterion for the presence of efflux pump in isolates was decrease ≥ 8 fold of colistin
99 MIC after the CCCP addition. The mean fold change was calculated per species and per
100 colistin resistance mechanisms identified as previously described **(6)** :

101 [1/total sample size (n)] × ∑ (MIC fold change× frequency of fold change)

102 Where the "frequency of fold change" is the number of times a particular MIC fold change
103 was recorded for that species. The symbol of superiority for MIC fold changes was
104 considered as an equal for the mean fold change analysis. Statistical analyses were performed
105 using non-parametric one-way analysis of variance (ANOVA) (Graphpad Software Inc, La
106 Jolla, CA, USA). A p-value <0.05 was taken into account for the MIC fold change.

107 **Effect of CCCP on colistin MIC (Minimum Inhibitory concentration) on Mueller-**
108 **Hinton (MH) agar plate.**

109 Colistin susceptibility testing was performed according to recommendations of EUCAST
110 using E-test (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) or disk diffusion method on Mueller-
111 Hinton (MH) agar with commercial antibiotic disks (BioMérieux, France). Initially, E-test
112 were performed on *S. marcescens* in order to better visualize the "cocarde" effect. The
113 withdrawal from the market of E-test constrained us to use disk for the others species
114 (http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/7e5c29808ae0bc4d37761e98c
115 c8eeb06.pdf). Colistin MIC was performed on two types of media: one on MH agar with
116 Dimethyl sulfoxide (DMSO) and one on MH agar with 10 mg/L of CCCP (Sigma-Aldrich,
117 Saint-Quentin-Fallavier, France) dissolved in DMSO. When a strain was totally inhibited by
118 colistin + CCCP, a plate containing CCCP 10 mg/L only was performed to confirm the
119 absence of effect of the EPI alone.

120 The significance of the diameter modification of colistin inhibition by disk diffusion method
121 with and without CCCP was evaluated by a Student't test in matched series. Results were
122 considered as statistically significant with a p-value <0.05. *S. marcescens* results were
123 considered separately as a MIC in agar plate was realized for this species and a fold change
124 was calculated as described above.

125 **RESULTs**

126 We tested the effect of CCCP on 93 *Enterobacteriaceae* including 32 *K. pneumoniae,* 24 *E.*
127 *coli,* 7 *Enterobacter* sp., 2 *Salmonella enterica*. 1 *Klebsiella oxytoca,* 14 *S. marcescens,* 3
128 *Morganella morganii,* 3 *Proteus* sp., 4 *Providencia sp*. Finally, three strains of *Pseudomonas*
129 *aeruginosa* were also included. All these strains were found resistant to colistin, with a MIC
130 comprised between 2 mg/L and more than 256 mg/L (Table 1.). Mechanisms of resistance to
131 colistin had already been identified in some of the strains studied (Table 1).

132 All isolates used in this work grew up in the presence of CCCP at the concentration of 10
133 mg/L in DMSO without any colistin, in broth medium and in agar plate, confirming that this
134 molecule has no effect alone at this concentration on these Gram-negative bacteria **(5)**.

135 On the 93 strains tested, 91 strains had a MIC fold change ≥ 8, confirming the presence of
136 efflux pump. Only two strains of *K. pneumoniae* showed a MIC fold change less than 8 but
137 their colistin MIC was low (2 and 4 µg/mL respectively) and a reversal effect was still
138 observed after addition of colistin (0.5 and 1 µg/mL respectively). Likewise, the addition of
139 CCCP led to reverse colistin resistance (MIC <2 µg/mL) in all the strains studied. The mean
140 fold change determined by species varied from 24 for *S. enterica* to 853.3 for *Proteus sp*
141 (Table 2). We noticed that the effect of CCCP on intrinsically resistant bacteria were much
142 more important than on other *Enterobacteriaceae* (p<0.0001).

143 By comparing by resistance mechanism (Table 3.), we observed that the efflux mechanism
144 was significantly more important in bacteria naturally resistant to colistin and in bacteria with
145 a heteroresistance mechanism than in bacteria with other resistance mechanisms ($p < 0.0001$)
146 (Figure 2a. and 2b.). On the other hand, there were no significant differences between
147 "natural" and "heteroresistance" groups or between "*mcr-1*", "other mutations" or "unknown
148 mutations" groups (Figure 2b.).

149 Effect of CCCP on agar plate showed a significant activity of CCCP on colistin resistance.
150 The colistin diameter (mm) increase from 14.1 (min 6, max 30) without CCCP to 23.5 mm
151 (min 17, max 38) with CCCP ($p<0.0001$) (Figure 2c.). All strains responded to CCCP except
152 for strains of *P. aeruginosa* that already had a high diameter of colistin inhibition without
153 CCCP. For *S. marcescens* strains, the fold change in agar plate with E-test MIC determination
154 varies from 1347 to 4000 fold ($p<0.0001$). Strains were all resistant to colistin with MIC >256
155 mg/L before addition of CCCP whereas colistin MIC values after addition of CCCP varied
156 from 0.064 and 0.19 mg/L (mean 0.128 mg/L).

157 **DISCUSSION**

158 Resistance to colistin in Gram negative bacteria is an increasing global concern. Many
159 mechanisms have been identified so far, whose the most recent, *mcr-1* gene, is carrying by a
160 transferrable plasmid, mostly in *E. coli* and *K. pneumoniae* **(2)**. Efflux has been reported to
161 play a role in colistin resistance, such as AcrAB-TolC in *E. coli* **(11)** or MexXY-OprM in *P.*
162 *aeruginosa* **(12)**. EPIs have been used to evaluate the effect of efflux pump upregulation in
163 the resistance to colistin. Effects of EPIs on colistin resistance varies according the type of
164 EPIs. For example, PaβN or NMP which are efflux pump inhibitors that are believed to act in
165 competition with drugs in the pocket of the action site of AcrB **(13)** failed to recover colistin
166 susceptibility in colistin resistant Gram negative bacteria **(5,14)**. This inefficiency was also
167 reported for others well known EPIs such as verapamil, omeprazole or reserpine **(5)**. On the
168 other hand, CCCP and DNP, which are nonspecific EPIs showed a good activity to restore
169 colistin susceptibility **(5,6,14)**. Thereby, it is difficult to identify the efflux pump responsible
170 for the resistance because they act on the energy source of efflux pumps, the proton motive
171 force and can modulate other proteins activity in the membrane **(1)**. In our study, we showed a
172 reversal effect on colistin resistance by the action of CCCP on all the strains studied. This
173 effect was more significant in intrinsically resistant and heteroresistant Enterobacteria than in
174 other *Enterobacteriaceae*, suggesting efflux takes part of colistin resistance in these species.
175 Although the main mechanism described for these species is modification of lipid A by
176 aminosugars, susceptibility to EPIs was significantly more important in this group than in the
177 other groups "other mutations" and "*mcr-1*" for which colistin resistance is also mediated by
178 lipid A modification. Moreover, the genes *soxRS* modulating efflux pump AcrAB-TolC has

179 recently been reported to be responsible for colistin heteroresistance in some isolates of
180 *Enterobacter sp*. **(15)**. TolC is an outer membrane protein that can interact with a lot of inner
181 membrane protein, especially membrane fusion protein in order to create a channel for
182 various protein extrusion **(16)**. Usually, bacteria use at least one system of membrane fusion
183 protein such as AcrAB in *E. coli* that in association with TolC allowed to extrude antibiotics.
184 Some studies showed that some drug were dependent of TolC without being dependent of
185 AcrAB, suggesting that TolC can be associated with other inner membrane proteins to
186 evacuate drugs **(16)**. But until now, none of the efflux pump studied were able to prove this
187 hypothesis. In the case of our strain, PaβN showed an effect on colistin resistance in *E.*
188 *cloacae* and in *E. aerogenes* suggesting that AcrAB-TolC is upregulated in these strains. This
189 was not the case for intrinsic resistant *S. marcescens* (data not shown). Despite its resistance
190 being similar to the heteroresistance of *Enterobacter spp.,* some other genes seem to be
191 involved in colistin resistance. In a similar study on *S. marcescens*, authors showed that
192 CCCP increase susceptibility of ciprofloxacin in a SdeAB-HasF mutant, an homologous of
193 AcrAB-TolC **(17)**. This showed that SdeAB-HasF is used to eliminate the drug, is dependent
194 of the proton motive force and may be a good candidate as a colistin-resistant target gene.

195 Further studies are needed on efflux pump inhibition in colistin resistance to better understand
196 pathways of this complex mechanism, particularly by the characterization of efflux pump
197 genes, and their expression in susceptible/resistant/heteroresistant mutant strains. Our study
198 further suggests that several EPIs could be developed in the future to face the problem of the
199 emergence of colistin resistance in Gram negative bacteria as demonstrated in the past with
200 beta-lactamases inhibitors.

201

DRAFT

202 **REFERENCES**

203

204 1. Li X-Z, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in
205 Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Rev. 2015 Apr;28(2):337–418.

206 2. Baron S, Hadjadj L, Rolain J-M, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin
207 resistance: knowns and unknowns. Int J Antimicrob Agents. 2016 Aug 4;

208 3. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and
209 intrinsic resistance in bacteria. Front Microbiol. 2014;5:643.

210 4. Kempf I, Jouy E, Chauvin C. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals.
211 Int J Antimicrob Agents. 2016 Dec 1;48(6):598–606.

212 5. Ni W, Li Y, Guan J, Zhao J, Cui J, Wang R, et al. Effects of efflux pump inhibitors on
213 colistin resistance in multidrug resistant Gram-negative bacteria. Antimicrob Agents
214 Chemother. 2016 Mar 7;AAC.00248-16.

215 6. Osei Sekyere J, Amoako DG. Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazine (CCCP)
216 Reverses Resistance to Colistin, but Not to Carbapenems and Tigecycline in Multidrug-
217 Resistant *Enterobacteriaceae*. Front Microbiol. 2017;8:228.

218 7. Olaitan AO, Diene SM, Kempf M, Berrazeg M, Bakour S, Gupta SK, et al. Worldwide
219 emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and
220 patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the
221 PhoP/PhoQ regulator *mgrB*: an epidemiological and molecular study. Int J Antimicrob
222 Agents. 2014 Dec;44(6):500–7.

223 8. Olaitan AO, Chabou S, Okdah L, Morand S, Rolain J-M. Dissemination of the *mcr-1*
224 colistin resistance gene. Lancet Infect Dis. 2016 Feb;16(2):147.

225 9. Diene SM, Merhej V, Henry M, El Filali A, Roux V, Robert C, et al. The rhizome of the
226 multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* genome reveals how new "killer bugs" are
227 created because of a sympatric lifestyle. Mol Biol Evol. 2013 Feb;30(2):369–83.

228 10. Chabou S, Leangapichart T, Okdah L, Le Page S, Hadjadj L, Rolain J-M. Real-time
229 quantitative PCR assay with Taqman(®) probe for rapid detection of MCR-1 plasmid-
230 mediated colistin resistance. New Microbes New Infect. 2016 Sep;13:71–4.

231 11. Warner DM, Levy SB. Different effects of transcriptional regulators MarA, SoxS and Rob
232 on susceptibility of *Escherichia coli* to cationic antimicrobial peptides (CAMPs): Rob-
233 dependent CAMP induction of the marRAB operon. Microbiol Read Engl. 2010
234 Feb;156(Pt 2):570–8.

235 12. Pérez A, Poza M, Fernández A, Fernández M del C, Mallo S, Merino M, et al.
236 Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of
237 *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Apr;56(4):2084–90.

238 13. Opperman TJ, Nguyen ST. Recent advances toward a molecular mechanism of efflux
239 pump inhibition. Front Microbiol. 2015;6:421.

240 14. Park YK, Ko KS. Effect of carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) on killing
241 *Acinetobacter baumannii* by colistin. J Microbiol Seoul Korea. 2015 Jan;53(1):53–9.

242 15. Telke A, Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. SoxRS induces colistin hetero-resistance in
243 *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter cloacae* by regulating acrAB-tolC efflux pump. J
244 Antimicrob Chemother. 2017 in press;

DRAFT MANUSCRIPT

16. Zgurskaya HI, Krishnamoorthy G, Ntreh A, Lu S. Mechanism and Function of the Outer Membrane Channel TolC in Multidrug Resistance and Physiology of Enterobacteria. Front Microbiol. 2011;2:189.

17. Begic S, Worobec EA. The role of the *Serratia marcescens* SdeAB multidrug efflux pump and TolC homologue in fluoroquinolone resistance studied via gene-knockout mutagenesis. Microbiol Read Engl. 2008 Feb;154(Pt 2):454–61.

18. Baron S, Bardet L, Dubourg G, Fichaux M, Rolain J-M. *mcr-1* plasmid-mediated colistin resistance gene detection in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate in France. J Glob Antimicrob Resist. 2017 May 30;10:35–6.

19. Olaitan AO, Thongmalayvong B, Akkhavong K, Somphavong S, Paboriboune P, Khounsy S, et al. Clonal transmission of a colistin-resistant *Escherichia coli* from a domesticated pig to a human in Laos. J Antimicrob Chemother. 2015 Dec;70(12):3402–4.

DRAFT MANUSCRIPT

258 **LEGENDS**

259

260 **Table**

261 **Table 1.** Summary of strains used in this study.

262 **Table 2.** Summary of Mean fold change after addition of CCCP on colistin MIC per species
263 and per mechanism of resistance to colistin.

264 **Table 3.** Summary of Mean fold change after addition of CCCP on colistin MIC per colistin
265 resistance mechanisms.

266 **Figure**

267 **Figure 1.** a and b. colistin inhibition diameter on MH medium (a.) (photo not to scale) and on
268 MH medium + 10 mg/L CCCP (b.) (photo not to scale). c and d. Colistin MIC performed with
269 E-test on MH medium (c.) and on MH medium + 10 mg/L CCCP. e. Colistin MIC with and
270 without 10 mg/L CCCP perfomed by microdilution method. NC. Negative control

271 **Figure 2.** a. Mean fold change of colistin MIC by species and mechanisms of resistance. b.
272 Mean fold change of colistin MIC by mechanisms of resistance. c. Colistin diameter on
273 Mueller-Hinton (MH) agar plate without and with 10 mg/L of CCCP.

274

DRAFT MANUSCRIT

275 **Table 1.** Summary of strains used in this study.

Strain	Name	Mechanism of resistance to colistin	MIC Colistin	MIC Colistin + CCCP	MIC fold change	Conclusion effect	MH	MH + CCCP	Difference
***E. aerogenes*(9)**	EA15090	PmrA G53S	>256	0,5	**>512**	Reverse	6	23	**17**
E. asburiae*	TH66	Unknown	32	0,5	**64**	Reverse	6	22	**16**
E. asburiae*	LH74	Unknown	>256	<0,25	**>1024**	Reverse	6	27	**21**
E. cloacae*	LH52	unknown	>256	<0,25	**>1024**	Reverse	18	22	**4**
E. cloacae*	NH132	Unknown	>256	0,25	**>1024**	Reverse	17	22	**5**
E. cloacae*	NH131	Unknown	>256	0,25	**>1024**	Reverse	17	25	**8**
***E. cloacae* (18)**	SB1	*mcr-1*	8	0,5	**16**	Reverse	17	21	**4**
***E. coli* (8,19)**	P17	*mcr-1*	4	0,25	**16**	Reverse	12	21	**9**
***E. coli* (8,19)**	LH30	*mcr-1*	4	0,25	**16**	Reverse	15	25	**10**
E. coli*	6R	*mcr-1*	8	<0,25	**>32**	Reverse	16	21	**5**
***E. coli* (8,19)**	P6	*mcr-1*	8	0,5	**16**	Reverse	15	22	**7**
E. coli*	44A	*mcr-1*	8	0,5	**>16**	Reverse	12	20	**8**
E. coli*	SE65	*mcr-1*	8	<0,25	**>32**	Reverse	12	21	**9**
***E. coli* (8,19)**	LH57	*mcr-1* + PhoP E375K	8	0,5	**16**	Reverse	15	20	**5**
***E. coli* (8)**	TH176	unknown	8	0,5	**16**	Reverse	17	26	**9**
***E. coli* (8,19)**	LH257	*mcr-1*	16	0,5	**32**	Reverse	17	21	**4**
E. coli*	134R	*mcr-1*	16	0,5	**32**	Reverse	15	19	**4**
E. coli*	96R	*mcr-1*	16	0,5	**32**	Reverse	15	19	**4**
E. coli*	143R	*mcr-1*	16	<0,25	**>64**	Reverse	16	21	**5**
E. coli*	235	*mcr-1*	16	<0,25	**>64**	Reverse	15	21	**6**
***E. coli* (8,19)**	P10	*mcr-1*	16	<0,25	**>64**	Reverse	15	21	**6**
E. coli*	117R	*mcr-1*	16	<0,25	**>64**	Reverse	12	19	**7**
***E. coli* (8,19)**	LH1	*mcr-1*	16	<0,25	**>64**	Reverse	15	22	**7**
E. coli*	95R	*mcr-1*	32	0,5	**64**	Reverse	15	20	**5**
E. coli*	85R	*mcr-1*	32	0,5	**64**	Reverse	14	20	**6**
***E. coli* (8)**	TH99	*mcr-1*	64	<0,25	**>256**	Reverse	16	21	**5**
E. coli*	EC1CR	Unknown	64	0,5	**128**	Reverse	16	32	**16**
***E. coli* (8,19)**	LH121	*mcr-1*	>256	0,5	**>512**	Reverse	17	23	**6**
E. coli*	1R 2014	*mcr-1*	4	<0,25	**>16**	Reverse	15	23	**8**
E. coli*	EC2CR	Unknown	4	0,5	**8**	Reverse	17	22	**5**
E. coli*	TH66	Unknown	4	<0,25	**>16**	Reverse	16	25	**9**

DRAFT MANUSCRIPT

***K. oxytoca* (7)**	FHA124	Unknown	128	1	**128**	Reverse	18	27	**9**
***K. pneumoniae* (7)**	LH12	*mgrb* Stop + pmrA E35A	16	<0,25	**>64**	Reverse	8	20	**12**
K. pneumoniae*	119R	*mcr-1*	32	0,5	**64**	Reverse	17	21	**4**
***K. pneumoniae* (7)**	FHA60	*mcr-1*	32	0,5	**64**	Reverse	16	23	**7**
***K. pneumoniae* (7)**	LH92	*mcr-1*	32	0,5	**>64**	Reverse	11	18	**7**
***K. pneumoniae* (7)**	LH17	*mcr-1* + PmrB T157P	32	0,5	**64**	Reverse	15	22	**7**
***K. pneumoniae* (7)**	TH34	PmrB S205P	32	0,5	**64**	Reverse	10	20	**10**
***K. pneumoniae* (7)**	LH375	Unknown	32	0,5	**64**	Reverse	15	22	**7**
***K. pneumoniae* (7)**	TH114	Unknown	32	0,5	**64**	Reverse	8	22	**14**
K. pneumoniae*	LH 131	*mcr-1* + *mgr*B stop	64	0,5	**128**	Reverse	14	20	**6**
***K. pneumoniae* (7)**	TH176	Unknown	64	0,25	**128**	Reverse	15	21	**6**
***K. pneumoniae* (7)**	TH166	Unknown	64	1	**64**	Reverse	16	22	**6**
***K. pneumoniae* (7)**	TH164	Unknown	64	1	**64**	Reverse	16	20	**4**
***K. pneumoniae* (7)**	FHM77	Unknown	64	0,5	**128**	Reverse	17	22	**5**
***K. pneumoniae* (7)**	FHM169	*mgrB* stop	64	0,5	**128**	Reverse	16	23	**7**
***K. pneumoniae* (7)**	LH102	Unknown	128	1	**128**	Reverse	16	21	**5**
***K. pneumoniae* (7)**	LH61	*mcr-1* + *mgr*B subs	>256	<0,25	**>1024**	Reverse	16	20	**4**
K. pneumoniae*	KP7CR	Unknown	4	1	**4**	Reverse	18	22	**4**
K. pneumoniae*	KP1CR	Unknown	16	1	**16**	Reverse	18	20	**2**
K. pneumoniae*	KP3CR	Unknown	16	1	**16**	Reverse	17	19	**2**
***K. pneumoniae* (7)**	TH205	PhoQ G385S	32	1	**32**	Reverse	17	20	**3**
K. pneumoniae*	KP4CR	Unknown	8	1	**8**	Reverse	17	21	**4**
K. pneumoniae*	KP8CR	*mgrB* del	32	1	**32**	Reverse	18	22	**4**
K. pneumoniae*	KP9CR	PhoQ F478C	>256	1	**>256**	Reverse	16	20	**4**
***K. pneumoniae* (7)**	TH68	Unknown	16	1	**16**	Reverse	17	22	**5**
***K. pneumoniae* (7)**	TH21	Unknown	64	1	**64**	Reverse	17	23	**6**
***K. pneumoniae* (7)**	LH94	Unknown	16	0,5	**32**	Reverse	15	22	**7**
K. pneumoniae*	KP5CR	PhoP L12Q	32	1	**32**	Reverse	18	25	**7**
***K. pneumoniae* (7)**	LH140	Unknown	4	0,5	**8**	Reverse	12	22	**10**
K. pneumoniae*	KP2CR	PmrA G53V	4	0,5	**8**	Reverse	14	25	**11**
***K. pneumoniae* (7)**	FHA105	*mgrB* ND	2	0,5	**4**	Reverse	15	27	**12**
***K. pneumoniae* (7)**	FHM120b	*mgrB* ND	64	1	**64**	Reverse	16	24	**8**
K. pneumoniae*	KP6CR	PhoQ L87P	8	1	**8**	Reverse	12	31	**19**

DRAFT MANUSCRIPT

M. morganii*	KON	Natural	>256	0,5	**>512**	Reverse	6	NG	**>30**
M. morganii*	FM102	Natural	>256	1	**>256**	Reverse	6	34	**28**
M. morganii*	FHA60	Natural	>256	1	**>256**	Reverse	6	32	**26**
P. aeruginosa*	110	Unknown	>256	0,5	**>512**	Reverse	25	30	**5**
P. aeruginosa*	AMO	Unknown	>256	0,5	**512**	Reverse	23	23	**0**
P. aeruginosa*	GON	Unknown	>256	<0,25	**>1024**	Reverse	23	32	**9**
P. alcalifaciens*	TH44	Natural	>256	1	**>256**	Reverse	6	28	**22**
P. alcalifaciens*	TH66	Natural	>256	<0,25	**>1024**	Reverse	6	28	**22**
P. mirabilis*	FH112	Natural	>256	0,5	**>512**	Reverse	6	17	**11**
P. mirabilis*	TH41	Natural	>256	<0,25	**>1024**	Reverse	6	22	**16**
P. vulgaris*	97R	Natural	>256	<0,25	**>1024**	Reverse	6	38	**32**
P. rettgeri*	HI734	Natural	>256	1	**>256**	Reverse	6	21	**15**
P. rettgeri*	TH66	Natural	>256	<0,25	**>1024**	Reverse	6	30	**24**
S. enterica*	100RC3	Unknown	16	0,5	**32**	Reverse	17	37	**20**
S. enterica	65RC	Unknown	16	1	**16**	Reverse	17	34	**17**
S. marcescens	1237	Natural	>256	<0,25	**>1024**	Reverse	256	0,064	**4000**
S. marcescens	Oxa-48	Natural	>256	<0,25	**>1024**	Reverse	256	0,094	**2723**
S. marcescens	2186	Natural	>256	0,5	**>512**	Reverse	256	0,094	**2723**
S. marcescens	1332	Natural	>256	0,5	**>512**	Reverse	256	0,094	**2723**
S. marcescens	1262	Natural	>256	<0,25	**>1024**	Reverse	256	0,125	**2048**
S. marcescens	50	Natural	>256	<0,25	**>1024**	Reverse	256	0,125	**2048**
S. marcescens	101	Natural	>256	<0,25	**>1024**	Reverse	256	0,125	**2048**
S. marcescens	122	Natural	>256	1	**>256**	Reverse	256	0,125	**2048**
S. marcescens	200	Natural	>256	1	**>256**	Reverse	256	0,125	**2048**
S. marcescens	1211	Natural	>256	0,5	**>512**	Reverse	256	0,125	**2048**
S. marcescens	1072	Natural	>256	0,5	**512**	Reverse	256	0,125	**2048**
S. marcescens	237	Natural	>256	0,5	**>512**	Reverse	256	0,19	**1347**
S. marcescens	567	Natural	>256	1	**>256**	Reverse	256	0,19	**1347**
S. marcescens	2701	Natural	>256	1	**>256**	Reverse	256	0,19	**1347**

MIC: Minimum Inhibitory Concentration; CCCP: Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazine; MH: Mueller Hinton agar medium; ND: not detected;

* Unpublished data.

DRAFT MANUSCRIPT

278 **Table 2.** Summary of Mean fold change after addition of CCCP on colistin MIC per species
279 and per mechanism of resistance to colistin.

Species	Colistin resistance mechanism	Mean fold change
M. morganii	Natural	341,3
Proteus spp.	Natural	853,3
Providencia spp.	Natural	640,0
S. marcescens	Natural	621,7
EIRC	**Natural**	**618,7**
E. coli	Mcr-1	76,6
	unknown	42,0
	other mutation	16,0
	other mutation	512,0
Enterobacter sp.	Heteroresistance	832,0
	Mcr-1	16,0
	Mcr-1	64,0
Klebsiella sp.	other mutation	146,2
	unknown	55,3
S. enterica	unknown	24,0
Other Enterobacteriaceae	**-**	**142,5**
Total Enterobacteriaceae	**-**	**269,5**
P. aeruginosa	unknown	682,7
Total BGN	**-**	**282,8**

280 EIRC : *Enterobacteriaceae* intrinsically resistant to colistin.

DRAFT MANUSCRIT

281

282 **Table 3.** Summary of Mean fold change after addition of CCCP on colistin MIC per colistin
283 resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*.

Resistance mechanism	Number of isolates	Mean fold change
Mcr-1	23	72,3
other mutation	23	161,9
Heteroresistance	15	832,0
Natural	5	618,7
unknown	24	50,3

284

DRAFT MANUSCRIT

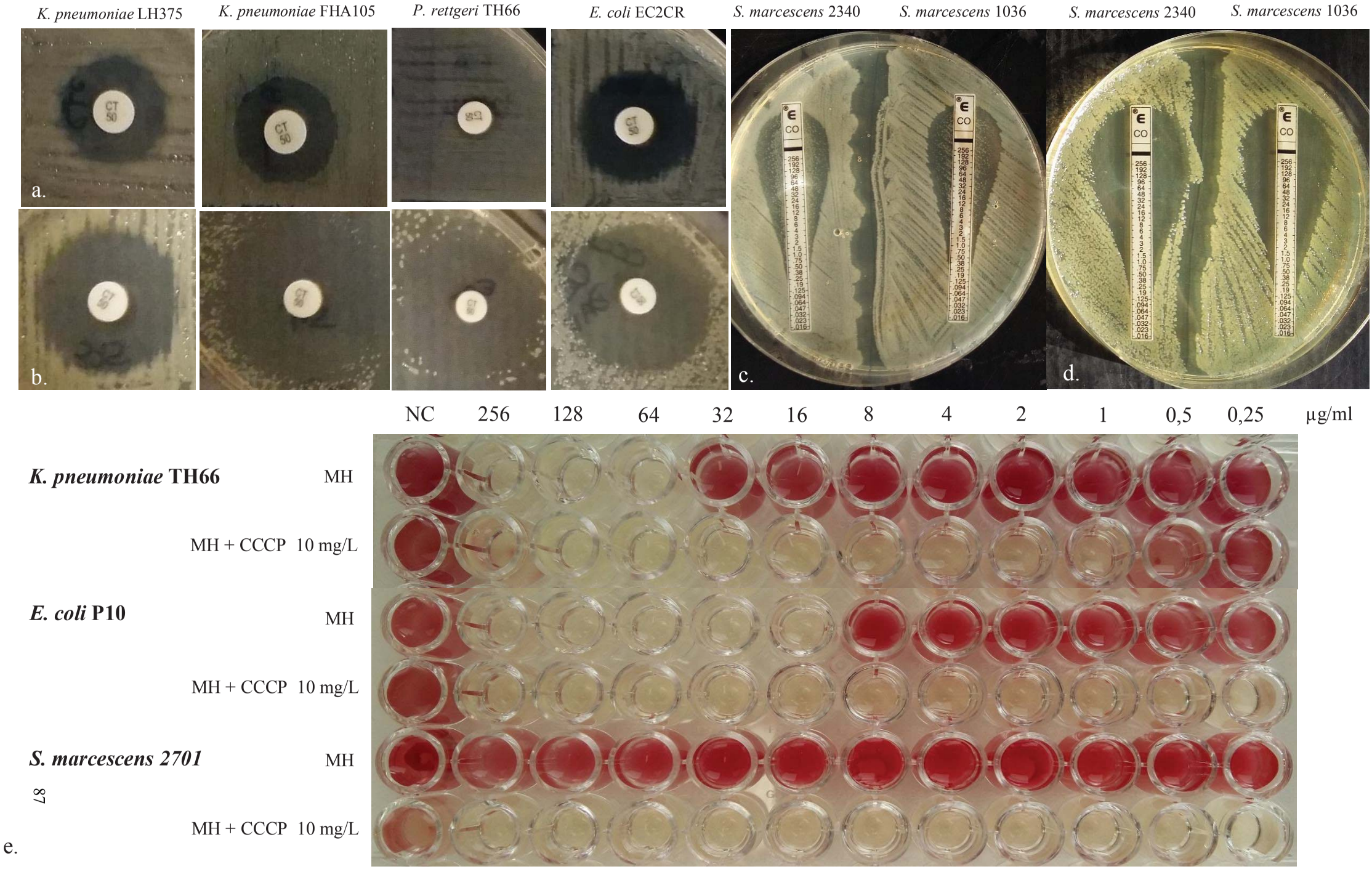
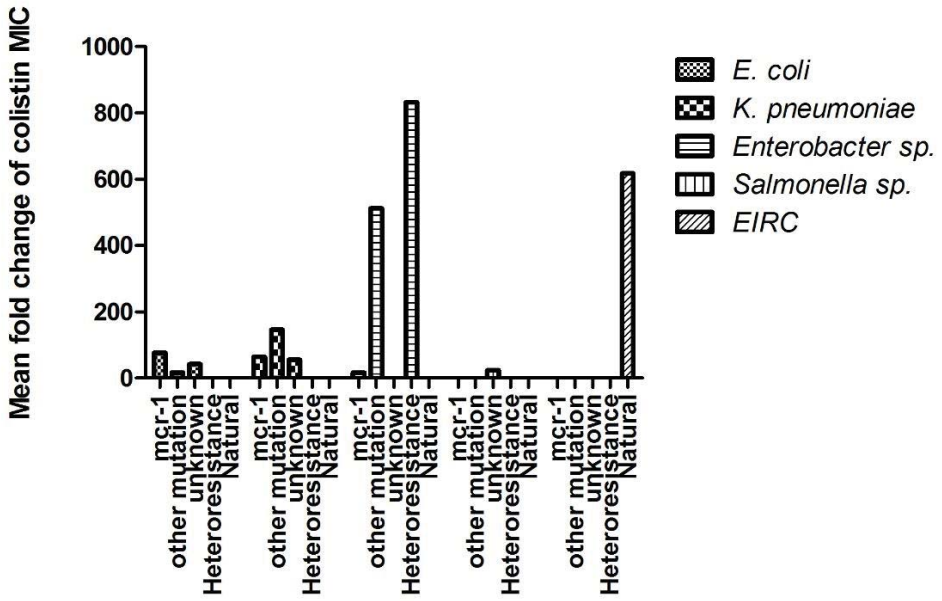
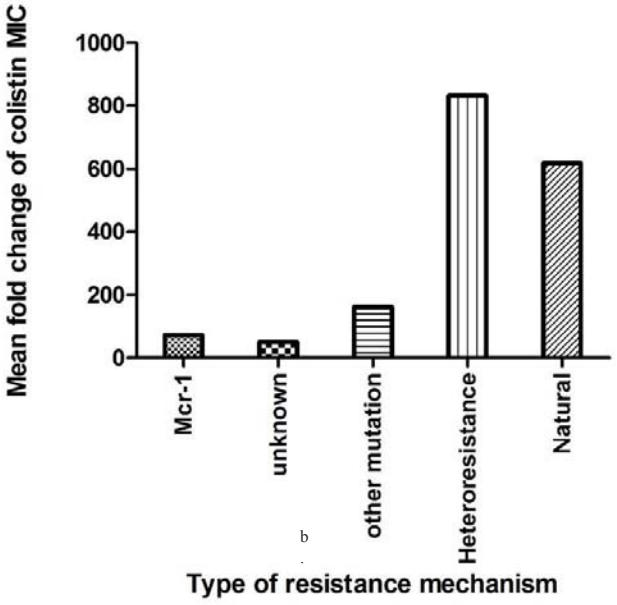

K. pneumoniae LH375
K. pneumoniae FHA105
P. rettgeri TH66
E. coli EC2CR
S. marcescens 2340
S. marcescens 1036
S. marcescens 2340
S. marcescens 1036
a.
b.
c.
d.
NC 256 128 64 32 16 8 4 2 1 0,5 0,25 µg/ml
K. pneumoniae TH66
MH
MH + CCCP 10 mg/L
E. coli P10
MH
MH + CCCP 10 mg/L
S. marcescens 2701
MH
MH + CCCP 10 mg/L
e.

Figure 1

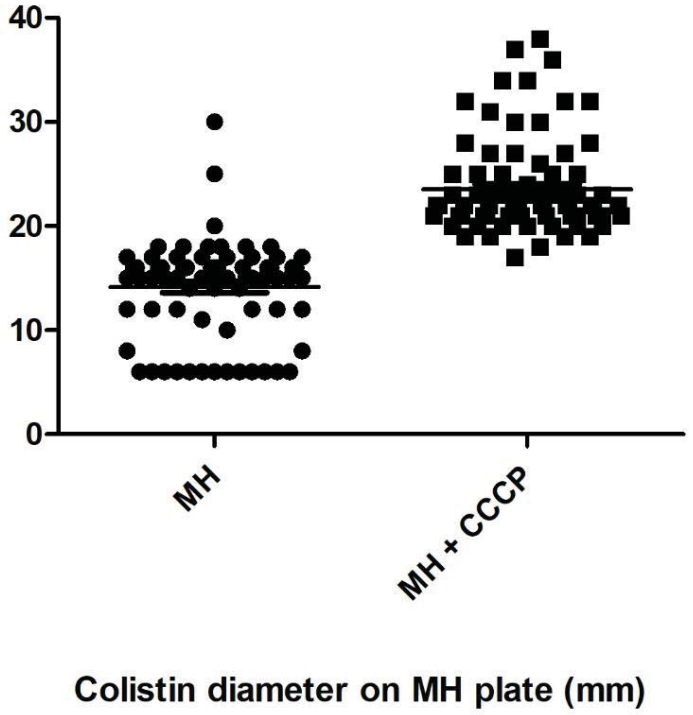


a.



a. b c

b.



c.

Figure 2

VIII. FACTEURS DE RISQUES ET MECANISMES DE RESISTANCE A LA COLISTINE A L'HOPITAL DE LA TIMONE, MARSEILLE.

1. Introduction

Klebsiella pneumoniae est une bactérie appartenant au groupe ESKAPE, qui représente les bactéries les plus fréquemment associées à la résistance aux antibiotiques. Depuis quelques années, la résistance aux carbapénèmes chez *K. pneumoniae* a augmenté et s'est propagée à l'échelle mondiale (92). La colistine est devenue une alternative possible dans le traitement des infections associées aux soins à *K. pneumoniae* résistantes aux carbapénèmes (93). Cependant, l'augmentation de son utilisation en milieu hospitalier a également entrainé l'émergence de la résistance à la colistine. Les facteurs de risque d'acquisition de souches de *K. pneumoniae* résistantes à la colistine (KPCR) identifiés selon diverses études sont essentiellement un traitement préalable par colistine (94–96), une colonisation antérieure à *K. pneumoniae* résistante aux carbapénèmes (94,97) ou encore un score de Charlson ≥3 (94). Ces études ont cependant été réalisées principalement en Italie et en Grèce, où les taux de résistance à la colistine chez les entérobactéries sont beaucoup plus élevés qu'en France où le taux reste faible (71). En France, il n'existe pas de données publiées concernant les facteurs de risque d'acquisition de cette résistance. De plus, la prévalence de la résistance à la colistine est difficile à évaluer chez les bactéries à Gram négatif du fait du coût et/ou du caractère fastidieux des méthodes utilisées pour déterminer sa concentration minimale inhibitrice (CMI) (98). Le programme SENTRY, comprenant plus de 100 centres répartis sur quatre continents, a déterminé le taux global de la résistance à la colistine chez les Entérobactéries entre 2004 et 2009 (98). La résistance à la colistine chez *K. pneumoniae* était estimé à 1,4% pendant cette période (98), sans augmentation significative de la résistance. Cependant, ces statistiques varient selon les études (71,72,99). En Europe, les dernières données de l'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) en 2013 évaluent le taux de résistance à la colistine chez *K. pneumoniae* entre 2,6% pour les souches sensibles aux carbapénèmes et 31,9% pour les souches qui y sont résistantes (71). En France, peu de données sont publiées sur l'épidémiologie de la résistance à la colistine, étant donné que l'utilisation de la colistine est récente. Une étude sur les souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes a estimé un taux de résistance à la colistine à 4,4% (43/972) incluant 35 *K. pneumoniae* et 7 *Enterobacter cloacae* (72). Dans notre laboratoire, considérant le coût et la pénibilité de la

détermination de la sensibilité à la colistine par rapport à son utilisation en pratique clinique, ce test n'est réalisé que lorsqu'un isolat est sensible à moins de 3 familles d'antibiotiques de notre panel de première ligne, ou sur demande spécifique du clinicien. A partir des données de notre laboratoire, nous avons retrouvé tous les patients hospitalisés à l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (AP-HM) entre Février 2014 et Août 2017 pour lesquels au moins une souche de KPCR a été isolée. L'objectif de notre travail est d'évaluer les facteurs de risque d'acquisition de KPCR et d'identifier le support de la résistance à la colistine, incluant la présence des gènes *mcr-1* et *mcr-2*.

2. Matériels et méthodes

a. Design de l'étude et patients.

Cette étude rétrospective a été conduite entre Février 2014 et Août 2017 dans les 4 hôpitaux (Conception, Timone, Nord et Sud) de l'AP-HM à Marseille, France. A partir de notre logiciel local, nous avons extrait toutes les souches de *K. pneumoniae* isolées au laboratoire pour lesquelles une détermination de la CMI a été réalisée et pour lesquelles la CMI était supérieure à 2 µg/mL (breakpoint recommandé selon l'EUCAST). Les données clinico-biologiques des patients ont été obtenues grâce au dossier patient informatisé. Chaque patient n'a été inclus qu'une fois, au moment de l'isolement de la première souche de *K. pneumoniae* résistante à la colistine (KPCR). Afin de déterminer les facteurs de risque d'acquisition de souches de KPCR, chaque cas a été apparié à deux patients contrôles pour lequel une souche de *K. pneumoniae* sensible à la colistine (KPCS) a été isolée. Ces contrôles ont été isolés pendant la même période de l'étude et ont été appariés selon le type de prélèvement et le type de service (chirurgie, soins intensifs ou médecine). La condition supplémentaire était d'avoir une souche disponible au laboratoire afin d'effectuer un test de sensibilité à la colistine par la méthode en microdilution recommandée par l'EUCAST, la commercialisation des E-tests colistine utilisés pendant la période 2014-fin 2016 (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) ayant été suspendue pour sous-estimation de la CMI (http://ansm.sante.fr/var/ansm_site/storage/original/application/7e5c29808ae0bc4d37761e98cc8eeb06.pdf). En plus de l'âge, du sexe, de l'unité d'hospitalisation et de la nature du (ou des) prélèvement(s), les antécédents cliniques et comorbidités suivants ont été récupérés : chirurgie récente (dans l'année précédant l'évènement), greffe d'organe, insuffisance rénale chronique, cancer solide (exclu en cas de rémission >5 ans), hémopathie (exclu en cas de rémission >5 ans), antécédent d'accident vasculaire cérébral, insuffisance cardiaque, cirrhose hépatique, diabète sucré,

splénectomie, insuffisance pulmonaire chronique. L'index de comorbidité de Charlson modifié (100) a été calculé et pris en compte en cas de score ≥3. Le recours à la ventilation mécanique, à l'hémodialyse, la pose d'un cathéter central et/ou d'une sonde urinaire a également été notée. La prise d'antibiotiques à large spectre ou actifs contre les BGN dans les 3 mois précédant l'épisode et le recours à une chimiothérapie intraveineuse à domicile ont également été pris en compte. Au niveau bactériologique, l'isolement antérieur d'une bactérie productrice de Béta-lactamase à spectre étendu (BLSE) ou de carbapénémase ainsi qu'un épisode récent d'infection bactérienne (<1 mois) ont été recherchés. Enfin le diagnostic final d'infection et/ou de colonisation retenu par le clinicien a été récupéré et la détermination d'infection associée aux soins ou acquise à l'hôpital a été évaluée selon les définitions standards (101). Les groupes des patients colonisés et des patients infectés à KPCR ont également été comparés entre eux. En cas de décès du patient, l'imputabilité de l'infection à *K. pneumoniae* a été évaluée.

b. Procédures microbiologiques

L'identification des isolats a été réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of flight) (MALDI Biotyper, Bruker Daltonics, Leipzig, Germany) comme décrit précédemment (102). Les tests de sensibilités aux antibiotiques ont été réalisés selon les recommandations de l'EUCAST par la méthode des disques sur gélose Mueller-Hinton (MH) à l'aide de disques d'antibiotiques disponibles dans le commerce (BioMérieux, France). Entre 2014 et fin 2016, la CMI de la colistine a été déterminée par la méthode des E-tests (BioMérieux, France). Depuis 2017, la CMI de la colistine est réalisée par la méthode en microdilution selon les recommandations de l'EUCAST. Toutes les souches contrôles ont été contrôlées sensibles à la colistine par la méthode en microdilution étant donné que les E-tests pouvaient sous-estimer la CMI de la colistine. Les souches résistantes à la colistine pour lesquelles un isolat a été retrouvé ont également été confirmées par la méthode en microdilution.

Enfin, la caractérisation du support moléculaire de la résistance à la colistine des souches disponibles dans notre laboratoire a été réalisée. La recherche des gènes *mcr-1* et *mcr-2* par PCR en temps réel a été faite comme précédemment décrit (103). Les gènes *pmrA, pmrB, phoP, phoQ, mgrB* ont été séquencés à l'aide des amorces disponibles (Tableau 2). Les gènes de la souche sensible à la colistine *K. pneumoniae* MGH78578 (numéro d'accession CP000647) ont été utilisés comme référence. En cas de mutation non décrite dans la

littérature, une analyse de l'impact de la mutation sur la fonction de la protéine a été réalisée à l'aide du logiciel PROVEAN (104).

Tableau 2. Liste des amorces utilisées dans cette étude pour la PCR standard et le séquençage des gènes de résistance à la colistine.

Type de PCR	Nom de l'amorce	Séquence	Taille du produit (pb)
PCR standard	pmrA_F	ATCTGTTCTCCACCCTGCTC	952
	pmrA_R	CATGCTCCACATGTTTCTGG	
PCR standard	pmrB_F1	CGACATTTACAGCTGGGACA	1386
	pmrB_R2	TTGCGGCCTTCTTAATGTTT	
Séquençage	pmrB-KP-F1	CGACATTTACAGCTGGGACA	-
	pmrB-KP-R1	TTTACCACGTCATCCAGCAA	
	pmrB-KP-F2	GAGCTGCTGGCGAAAGTG	
	pmrB_R2	TTGCGGCCTTCTTAATGTTT	
PCR standard	phoP_F	GAAGCGAACCCGTAATGACA	768
	phoP_R	AACAGCCGTTTATATTTTGCGTA	
PCR standard	phoQ_F	GCAGGTGTCTGACAGGGATT	1585
	phoQ_R	AGGCTGAATACCCACAGGAC	
Séquençage	phoQ_F	GCAGGTGTCTGACAGGGATT	-
	phoQ_R	AGGCTGAATACCCACAGGAC	
	phoQ_F1	ATTGACCCCTTTGCGCTGATA	
	phoQ_R1	ATCCGCGAACAGGGCGACGACT	
PCR standard	mgrB_F1	ATTCTGCCGCTTTTGCTG	499
	mgrB_R1	CGTTTTGAAACAAGTCGATGA	

c. Etude statistique

L'objectif de cette étude était de définir des facteurs de risque d'acquisition de KPCR. Les différentes variables sélectionnées ont été comparées à l'aide du test du Chi-deux, du test de Fisher ou du test t de Student. Seule l'analyse univariée a été réalisée avec un risque statistique défini à 0,05. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel SPSS (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA).

3. Résultats

a. Facteurs de risque, caractéristiques cliniques et mortalité

Entre février 2014 et Août 2017, 22 patients étaient porteurs de souches de KPCR. L'âge moyen des patients était de 61,1 ans (min 1 mois, max 85 ans) de sexe majoritairement masculin (Sex ratio=4.5). La CMI de la colistine obtenue par E-test variait de 4 à 256 µg/ml. L'analyse univariée de ces groupes (Tableau 3) a permis d'identifier plusieurs facteurs de risque parmi lesquels : le sexe masculin, la durée d'hospitalisation, une histoire récente d'infection bactérienne, un antécédent d'isolement de *K. pneumoniae* résistante aux carbapénèmes et le contact avec un autre patient porteur d'une KPCR. L'acquisition d'une KPCR était significativement retrouvée associée aux soins. Enfin, l'administration préalable d'antibiotiques, notamment de fluoroquinolones, d'aminosides et de carbapénèmes était associée à un risque plus important d'acquisition de KPCR. Dans notre étude, seuls cinq patients tous groupes confondus avaient reçus de la colistine. Douze patients du groupe KPCR (54,5%) présentaient des symptômes d'infection à KPCR contre 21 patients (47,7%) dans le groupe contrôle (p=0,862). Les autres patients étant considérés comme colonisés à ces bactéries. La mortalité s'est élevée à 18,2% (4/22) dans le groupe KPCR contre 25% (11/44) dans le groupe KPCS (p=0.770), mais le décès était imputable à l'infection par *K. pneumoniae* dans un cas de chaque groupe seulement (p=0,952).

La comparaison des caractéristiques cliniques des patients colonisés à KPCR vs les patients infectés à KPCR (Tableau 4) a montré que les patients infectés avaient tendance à développer une infection plus précocement que ceux uniquement porteurs de souche de KPCR. Cependant, dans le groupe des colonisés, seuls 5 patients sur 10 avaient bénéficié d'un premier dépistage négatif avant l'isolement de la bactérie résistante à la colistine. Il n'existait pas de différence significative concernant les autres caractéristiques cliniques. La mortalité dans le groupe des patients infectés était de 8,33% (1/12) contre 30% (3/10) dans le groupe des patients colonisés mais seul le décès du patient dans le groupe infecté à KPCR pouvait être attribué à *K. pneumoniae*.

Tableau 3. Résultat de l'analyse univariée des facteurs de risque d'acquisition de *K. pneumoniae* résistantes à la colistine comparée aux patients contrôles ayant acquis une souche de *K. pneumoniae* sensible à la colistine.

Caractéristiques	KPCR (%) n=22	KPCS (%) n=44	p
Age (années)	61,1 (1M;89)	60 (1S; 89)	0,965
Sexe			**0,004**
Masculin	18	19	-
Féminin	4	25	-
Durée d'hospitalisation (moyenne jours)	60,1 (0;170)	46,4 (0;183)	**<0,001**
Délai avant premier prélèvement positif (jours)	21,7 (0;76)	13,5 (0 ;64)	0,151
Voyage récent	2 (9,1)	3 (6,82)	-
Service hospitalisation			
Soins intensifs/Réanimation	15 (68,2)	30 (68,2)	-
Unité de chirurgie	3 (13,6)	6 (0,14)	-
Unité médicale	3 (13,6)	6 (0,14)	-
Soins intensifs de néonatologie	1 (4,6)	2 (4,6)	-
Nature des prélèvements			
Prélèvements respiratoires	6 (24)	13 (21,3)	0,848
Urine	6 (24)	18 (29,5)	0,279
Hémoculture	1 (4)	4 (6,6)	0,911
Os	1 (4)	2 (3,3)	-
Liquide de ponction	2 (8)	4 (6,6)	-
Ecouvillon cutané	2 (8)	6 (9,8)	0,923
Ecouvillon rectal	7 (28)	14 (23)	-
Comorbidités			
Cancer solide	8 (36,4)	7 (15,9)	0,062
Hémopathies	1 (4,55)	3 (6,82)	-
Accident vasculaire cérébral	0 (0)	6 (13,6)	0,167
Cirrhose hépatique	1 (4,55)	2 (4,55)	-
Insuffisance rénale chronique	2 (9,1)	7 (15,9)	0,706
Bronchopneumopathie chronique obstructive	2 (9,1)	5 (11,4)	-
Diabète sucré	5 (22,7)	13 (29,5)	0,770
Insuffisance cardiaque	7 (31,8)	12 (27,3)	0,701
Transplantation d'organe	0 (0)	3 (6,8)	0,545
Index de Charlson ≥3	16 (72,7)	32 (72,7)	-
Antécédent récente de chirurgie	10 (45,5)	15 (34,1)	0,370
Ventilation mécanique	14 (63,6)	20 (45,5)	0,164
Cathéter veineux central	16 (72,7)	32 (72,7)	-
Thérapie intraveineuse à domicile	3 (13,6)	4 (9,1)	0,678
Sonde urinaire	16 (72,7)	25 (56,8)	0,209
Hémodialyse	4 (18,2)	3 (6,8)	0,210

Histoire récente d'infection bactérienne	12 (54,5)	13 (29,5)	**0,048**
Antécédent d'isolement de bactérie productrice de BLSE	3 (13,6)	7 (15,9)	-
Antécédent de production de carbapénémase	11 (50)	6 (13,6)	**0,006**
Contact avec un patient porteur de KPCR	5 (22,7)	0 (0)	**0,005**
Acquisition associée aux soins	22 (100)	35 (79,5)	**0,024**
Traitements antérieurs			
Amoxicilline + acide clavulanique	4 (18,2)	9 (20,5)	-
Piperacilline + acide clavulanique	9 (40,9)	17 (38,6)	0,859
Céphalosporine de 3ème génération	13 (59,1)	15 (34,1)	0,053
Carbapénèmes (imipénème, ertapénème ou méropénème)	9 (40,9)	7 (15,9)	**0,025**
Fluoroquinolones	11 (50)	21 (22,7)	**0,025**
Aminoglycosides	15 (68,2)	15 (34,1)	**0,009**
Colistine	3 (13,6)	2 (4,54)	0,323

Tableau 4. Comparaison des caractéristiques cliniques des patients infectés ou colonisés à *K. pneumoniae* résistantes à la colistine (KPCR).

Caractéristiques	Infection KPCR (%) n=12	Colonisation KPCS (%) n=10	p
Age (années)	58,6 (0 ;83)	64,2 (41 ;89)	0,0712
Sexe			-
Masculin	10 (83,3)	8 (80)	-
Féminin	2 (16,7)	2 (20)	-
Durée d'hospitalisation (moyenne jours)	37 (0 ;92)	88 (16 ;216)	**0,025**
Délai avant premier prélèvement positif (jours)	14,2 (0 ;48)	30,8 (6 ;77)	**0,0385**
Voyage récent	1 (8,33)	1 (10)	-
Comorbidités			
Cancer solide	3 (25)	5 (50)	0,443
Hémopathies	1 (8,33)	0 (0)	-
Cirrhose hépatique	0 (0)	1 (10)	0,909
Insuffisance rénale chronique	1 (8,33)	1 (10)	-
Bronchopneumopathie chronique obstructive	0 (0)	2 (20)	
Diabète sucré	3 (25)	2 (20)	-
Insuffisance cardiaque	4 (33,3)	3 (30)	-
Index de Charlson ≥3	9 (75)	7 (70)	-
Antécédent récente de chirurgie	6 (50)	4 (40)	0,970
Ventilation mécanique	6 (50)	8 (80)	0,313
Cathéter veineux central	10 (83,3)	6 (60)	0,458
Thérapie intraveineuse à domicile	2 (16,7)	1 (10)	-
Sonde urinaire	9 (75)	7 (70)	-
Hémodialyse	2 (16,7)	2 (20)	-
Histoire récente d'infection bactérienne	5 (41,6)	7 (70)	0,370
Antécédent d'isolement de bactérie productrice de BLSE	0 (0)	3 (30)	0,156
Antécédent de production de carbapénémase	5 (41,6)	6 (60)	0,670
Contact avec un patient porteur de KPCR	2 (16,7)	3 (30)	0,706
Traitements antérieurs			
Amoxicilline + acide clavulanique	3 (25)	1 (10)	0,737
Piperacilline + acide clavulanique	4 (33,3)	5 (50)	0,721
Céphalosporine de 3ème génération	6 (50)	7 (70)	0,610
Carbapénèmes (imipénème, ertapénème ou méropénème)	3 (25)	6 (60)	0,220
Fluoroquinolones	5 (41,7)	6 (60)	0,670
Aminoglycosides	8 (66,7)	7 (70)	-
Colistine	2 (16,7)	1 (10)	-

b. Sensibilité aux antibiotiques.

Les isolats de KPCR présentaient un taux de résistance globalement plus élevé aux antibiotiques que les isolats de KPCS (Tableau 5), notamment en ce qui concerne la résistance à la piperacillline + tazobactam (95,5 vs 51,2%), à l'ertapénème (72,7 vs 22,7%), à la gentamicine (77,3% vs 43,2%, à la ciprofloxacine (90,5 vs 59,1%), à la fosfomycine (52,6 vs 20,7%), à la doxycycline (94,1 vs 56%), au cotrimoxazole (90,9 vs 63,6%), et à la tigecycline (66,7 vs 33,3%). Les souches de KPCR restaient le plus souvent sensibles à l'imipénème (68,2%), à l'amikacine (68,2%) et à la fosfomycine (47,4%).

Tableau 5. Taux de résistance et analyse statistique univariées des différents antibiotiques testés des groupes KPCR et KPCS. AMC=amoxicilline + acide clavulanique ; TZP= piperacilline + tazobactam ; CRO= ceftriaxone ; FEP= céfépime ; ETP=ertapénème ; IPM= imipénème ; MER=meropénème ; ATM= aztreonam ; GN= gentamicine ; AK= amikacine ; CIP= ciprofloxacine ; FF= fosfomycine ; DO= doxycycline ; SXT= cotrimoxazole ; RA= rifampicine ; TIGE= tigecycline

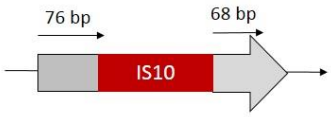
		AMC	TZP	CRO	FEP	ETP	IPM	MER	ATM	GN	AK	CIP	FF	DO	SXT	RA	TIGE
Groupe KPCR	n	22	22	22	22	22	22	18	20	22	22	21	19	17	22	15	18
	%R	95,5	95,5	90,9	81,8	72,7	31,8	66,7	85,0	77,3	31,8	90,5	52,6	94,1	90,9	100,0	66,7
Groupe KPCS	n	39	43	44	44	44	44	13	21	44	44	44	29	25	44	13	12
	%R	87,2	51,2	70,5	65,9	22,7	11,4	53,9	76,2	43,2	13,6	59,1	20,7	56,0	63,6	92,3	33,3
	p<0,05	0,574	**<0,001**	0,110	0,290	**<0,001**	0,096	0,470	0,754	**0,009**	0,159	**0,010**	**0,002**	**0,015**	**0,011**	0,275	**0,037**

c. Mécanismes moléculaires impliqués.

Seize des vingt-deux isolats de KPCR ont été retrouvés pour l'analyse moléculaire du mécanisme de la résistance à la colistine. Aucune souche n'était porteuse des gènes *mcr-1* ou *mcr-2* (Tableau 3.). Parmi les 16 souches analysées, 9 (56,3%) ne présentaient aucune mutation connue ou considérée comme pouvant être responsable de la résistance à la colistine par l'analyse PROVEAN. Les sept autres isolats (43,8%) présentaient des mutations dans les gènes *pmrA, pmrB, phoP, phoQ,* et *mgrB*. Une mutation faux-sens au niveau de la protéine PmrA de la souche KP2CR a été observée en position 53. Cette position a déjà été décrite comme responsable de l'activation de la synthèse de l'aminoarabinose chez *E. aerogenes, S. enterica* et *K. pneumoniae* mais la glycine était alors remplacée par une cystéine (11) contre une valine dans notre cas. La mutation T157P dans PmrB de la souche KP10CR a également déjà été décrite dans la littérature (12). En revanche, 3 souches présentaient des mutations faux-sens dans les gènes PhoP (L12Q) et PhoQ (L87P et F478C) non connues mais considérés comme modifiant la fonction protéique selon le logiciel PROVEAN. Des analyses complémentaires par insertion de ces gènes dans des souches sensibles sont néanmoins nécessaires pour évaluer le véritable rôle de ces mutations dans la résistance à la colistine. Le gène *mgrB* était tronqué dans deux souches. La souche KP8CR présentait une délétion au niveau de la valine en position 11 conduisant à un codon stop prématuré tandis que la souche KP15CR était tronquée par l'insertion d'une IS10 en position +76 (Figure 3). Plusieurs études ont montré que certaines IS, notamment les IS5 et les IS10 s'inséraient plus particulièrement à cette position (11,18), entrainant une inactivation du gène *mgrB* et une surexpression du système à deux composants PhoP/PhoQ.

Figure 3. a. Insertion d'une IS10 dans le gène *mgrB* de la souche KP15CR conduisant à l'inactivation du gène. b. Délétion de 10 nucléotides dans le gène *mgrB* de la souche KP8CR conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée.

- a. Insertion d'une IS10 dans le gène *mgrB* de la souche KP15CR



- b. Délétion du gène *mgrB* dans la souche KP8CR

```
                                                  31_40del
            *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
CP000647 GTG AAA AAA TTA CGG TGG GTT TTA CTG ATA GTC ATC ATA GCA GGC TGC CTG TTG CTG TGG ACT CAG ATG CTT AAC
    KP8CR GTG AAA AAA TTA CGG TGG GTT TTA CTG ATA CAG GCT GCC TGT TGC TGT GGA CTC AGA TGC TTA ACG TAA --- ---
```

Trois patients ont acquis une souche de *K. pneumoniae* productrice de carbapénémase et résistante à la colistine pendant leur séjour à l'hôpital, dans le même service et à la même période. Afin de déterminer s'il s'agissait de la même souche, les isolats ont été comparés par analyse génomique. L'analyse par Multi Locus Sequence Typing (MLST) des trois isolats KPCR12, KPCR13 et KPCR14 a montré qu'ils appartenaient tous au même clone ST307. De plus, les séquences des gènes impliqués dans la résistance à la colistine étaient identiques, suggérant qu'il s'agit du même clone qui s'est propagé d'un patient à l'autre. Deux autres patients porteurs de KPCR ont été hospitalisés dans le même service à la même période. Malheureusement, une des souches n'a pas été retrouvée, rendant impossible toute comparaison moléculaire.

Tableau 6. Résumé des caractéristiques biologiques des 16 souches de *K. pneumoniae* pour lesquelles l'analyse moléculaire a été effectuée. Les mutations en gras ont été évaluées comme modifiant la fonction protéique par l'analyse PROVEAN. Les numéros associés aux mutations indiquent la ou les références dans lesquelles cette mutation a déjà été rapportée, qu'elle soit responsable de la résistance ou non.

Strain	Colistin MIC (µg/ml)	PmrA	PmrB	PhoP	PhoQ	MgrB	*mcr-1/ mcr-2*
KP1CR	16	A41T[105]	L213M [105] ; T246A [106,107]	-	-	-	-
KP2CR	16	**G53V**[a] [106]	-	-	-	-	-
KP3CR	16	A41T	L213M ; T246A	-	-	-	-
KP4CR	8	A41T	L213M ; T246A	-	-	-	-
KP5CR	16	A41T	L213M ; T246A	**L12Q**	-	-	-
KP6CR	6	-	-	-	**L87P**	-	-
KP7CR	16	A41T	L213M ; T246A	-	-	-	-
KP8CR	32	A41T	L213M ; T246A	-	-	**V11QfsX13**	-
KP9CR	4	A41T	L213M ; T246A	-	**F478C**	-	-
KP10CR	8	A41T	**T157P** [108]; L213M ; T246A	-	-	-	-
KP11CR	16	A217V	T246A	-	-	-	-
KP12CR	8	A41T	L213M ; T246A	-	-	-	-
KP13CR	16	A41T	L213M ; T246A	-	-	-	-
KP14CR	4	A41T	L213M ; T246A	-	-	-	-
KP15CR	>64	S64T[106]	-	-	-	**IS10 in bp 76** [109]	-
KP16CR	4	A217V[105]	T246A	-	N135K	-	-

[a.] Cette position a été déjà décrite comme induisant une résistance à la colistine mais la mutation était G53C.

4. Discussion

Dans cette étude, nous avons mis en évidence par analyse univariée plusieurs facteurs de risque d'acquisition de KPCR incluant : le sexe masculin, la durée d'hospitalisation, une histoire récente d'infection bactérienne, un antécédent d'isolement de souche de *K. pneumoniae* résistante aux carbapénèmes, le contact avec un patient porteur d'une KPCR, et l'administration d'antibiotiques notamment de la famille des fluoroquinolones, des aminosides et des carbapénèmes. De plus, l'acquisition d'une KPCR était significativement associée aux soins, suggérant ainsi que la résistance à la colistine en milieu communautaire est très faible. Il a déjà été montré que la présence de *K. pneumoniae* productrice de carbapénémases était un facteur de risque d'acquisition de la résistance à la colistine (94). De plus, les études épidémiologiques ont montré que la prévalence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries, dont *K. pneumoniae*, était plus élevée chez les bactéries productrices de carbapénémases (72,98). Concernant le contact avec un patient porteur d'une KPCR, une précédente étude publiée en 2014 (97) avait déjà montré que le nombre de patients porteurs de KPCR productrices de carbapénémases à proximité du lit d'hospitalisation du patient était un facteur de risque d'acquisition de la résistance à la colistine. Dans notre étude, les résultats observés corroborent les conclusions de cette précédente étude, d'autant que toutes les souches de KPCR retrouvées chez les patients en contact avec d'autres patients porteurs de KPCR étaient également des souches productrices de carbapénémases. Trois de ces souches ont pu être analysées et ont montré qu'elles appartenaient au même clone ST307. Ce clone apparu récemment (110), peut contenir de nombreux gènes de résistance et notamment les gènes codant pour les carbapénémases OXA-48, KPC et NDM-1 (111,112). Il est devenu en quelques années le principal ST rencontré en Italie chez les souches de *K. pneumoniae* productrices de carbapénémases, supplantant les clones ST258 et ST512 (113). En Serbie, une souche de *K. pneumoniae* appartenant au clone ST307 résistante à la colistine et aux carbapénèmes a également été rapportée. La résistance à la colistine dans cette souche était due à l'insertion d'une IS *Kpn26* dans le gène *mgrB* (105). Ces résultats montrent que même si elle n'est pas médiée par un mécanisme d'origine plasmidique, la résistance à la colistine peut se propager à l'hôpital par transmission associée aux soins. Les analyses MLST n'ont pas pu être réalisées pour toutes les souches KPCR mais il serait intéressant de les effectuer pour mettre en évidence un éventuel clone prédominant au sein de l'AP-HM.

La comparaison des groupes « patients porteurs de KPCR » et « patients porteurs de KPCS » a montré que le sexe masculin était un facteur de risque d'acquisition de la résistance à la colistine. Cependant les différentes études menées jusqu'à présent n'ont jamais montré de différence significative entre les patients porteurs de KPCR, de KPCS et les patients non infectés. La différence observée dans notre étude pourrait être due à un biais de sélection des témoins, ce critère n'ayant pas été retenu initialement pour l'appariement cas-contrôle.

Alors que la plupart des études ont montré un lien entre l'administration de colistine et l'acquisition de KPCR (94,96,97,114), notre étude n'a pas permis de mettre en évidence cette association. Cette discordance peut être liée au faible nombre de patients ayant reçu de la colistine (N=5) dans nos deux groupes. Cependant, Giacobbe et al. (94) précisait que plus de 72% des patients ayant développé une bactériémie à KPCR dans leur étude n'avaient jamais reçu de colistine, démontrant que ce facteur ne pouvait être le seul responsable de la résistance à la colistine.

Dans notre étude, la variable séjour récent à l'étranger ne constituait pas non plus un facteur de risque d'acquisition de KPCR. Cependant la population des patients du groupe KPCR étant plutôt âgés (moyenne âge =61,1 ans), avec de nombreuses comorbidités (index de Charlson ≥3 pour 16/22 patients) et des hospitalisations fréquentes, le choix de ce critère dans notre population n'était peut-être pas le plus pertinent.

Cette étude a présenté plusieurs limites principalement imputables au faible nombre de patients inclus et au caractère rétrospectif de l'étude. La mise en place d'un questionnaire à compléter par le clinicien en cas d'isolement d'une KPCR associé à un suivi prospectif de ces patients permettrait de mieux préciser les facteurs de risque d'acquisition de la résistance à la colistine.

L'analyse univariée a permis d'identifier plusieurs facteurs de risque d'acquisition de KPCR mais une analyse multivariée sera nécessaire pour juger de leur indépendance. Ainsi, dans plusieurs études (94,97,115), certains paramètres tels qu'une antibiothérapie préalable ou une infection bactérienne récente ont déjà été identifiés en analyse univariée mais leur indépendance n'a pas été démontrée.

L'analyse génomique des gènes les plus fréquemment responsables de la résistance à la colistine a permis de mettre en évidence des mutations, délétions ou insertions chez 7 des 16 isolats étudiés. Trois de ces mutations sur PhoP (L12Q) et PhoQ (L87P, F478C) n'ont, à notre connaissance, jamais été rapportées. Bien que l'analyse PROVEAN nous donne une première

information sur l'impact de ces mutations sur la fonction protéique, il faudrait le confirmer par des tests *in vitro*. Les autres mutations dans PmrA (A41T, S64T, A217V) et PmrB (L213M ; T246A) étaient considérées comme neutre par l'analyse PROVEAN et ont été rapportées dans la littérature comme étant des substitutions fréquentes et non impliquées dans la résistance à la colistine (105–107). La mutation N135K sur PhoQ était également considérée comme neutre par le logiciel PROVEAN mais nous n'avons pas retrouvé de données de la littérature concernant sa fréquence et sa responsabilité dans la résistance. Dans notre étude, 56,3% des souches présentent un mécanisme de résistance à la colistine encore inexpliqué. Le séquençage des gènes *crrA* et *crrB* et la recherche des mutations déjà décrites dans la littérature (38,39) pourraient nous permettre d'en identifier le mécanisme moléculaire. Cependant, le séquençage du génome de ces souches semble être la meilleure solution pour mettre en évidence un nouveau mécanisme de résistance.

L'objectif à long terme de cette étude est de limiter la transmission intra-hospitalière de ces bactéries multi-résistantes en établissant un score de risque d'acquisition de bactéries résistantes à la colistine lors de l'entrée des patients à l'hôpital. Ce score pourrait nous permettre de limiter l'utilisation de la colistine chez les patients les plus à risque, pour limiter un éventuel échec thérapeutique, l'émergence de la résistance à la colistine et sa propagation.

IX. CONCLUSION

L'augmentation de l'usage médical de la colistine ces dernières années pour traiter les infections causées par des entérobactéries multi-résistantes aux antibiotiques majore le risque de sélection de bactéries résistantes à cet agent antimicrobien. Les mécanismes de résistance impliqués chez les entérobactéries font intervenir des systèmes complexes et variés, dont nous ne connaissons pas encore toutes les composantes. Ceci a d'ailleurs été conforté par la découverte récente d'un nouveau mécanisme régi par un plasmide, ouvrant ainsi un champ de recherche. En effet, il s'agit du premier mécanisme de résistance à la colistine porté par un transposon, donc mobile et transférable. Le dépistage des patients porteurs du gène *mcr-1/2* en milieu hospitalier afin de limiter la propagation de la résistance à la colistine chez les bactéries est un questionnement actuel. Ce gène a été décrit dans le monde entier, mais la proportion de patients porteurs et/ou infectés par une souche MCR^+ en Europe reste faible à ce jour. De plus, la détection de la résistance à la colistine chez les entérobactéries porteuses du gène *mcr-1* seul est difficile car la CMI d'antibiotique est modérément augmentée (2 à 16 µg/mL) ; celle-ci est beaucoup plus élevée lorsqu'un mécanisme chromosomique de résistance à la colistine est associé (14, 97, 98). De ce fait, il est impératif de développer des stratégies de criblage des patients potentiellement porteurs de ce gène que ce soit par culture ou par biologie moléculaire. Pour l'instant, la prévalence de la résistance à la colistine chez les entérobactéries reste basse mais l'augmentation de l'usage médical de cet antibiotique et son utilisation massive et incontrôlée dans les élevages d'animaux (notamment de porcs en Asie et de volailles en Afrique du Nord) (116) pourraient aboutir à un accroissement du nombre de souches résistantes : les cliniciens devraient alors faire face à une nouvelle impasse thérapeutique. Il est donc impératif d'envisager dès à présent de nouvelles stratégies pour combattre de tels microorganismes. Celles-ci sont essentiellement axées sur la recherche de nouveaux antibiotiques (117), le « détournement » de molécules utilisées dans d'autres indications cliniques que l'antibiothérapie telles que l'auranofine, un sel d'or utilisé dans la polyarthrite rhumatoide, ou la zidovudine, un traitement anti-VIH qui ont ainsi montré une efficacité antibactérienne sur des souches de *K. pneumoniae* (101) et la remise à disposition de vieux agents antimicrobiens dont la mise sur le marché a été arrêtée ou qui ne sont plus disponibles en France tels que la fosfomycine IV, la doxycycline IV ou encore le chloramphénicol (118,119). Il apparaît donc nécessaire de considérer les antibiotiques disponibles et anciens comme un patrimoine médicamenteux que l'on doit préserver pour pouvoir faire face à l'émergence de nouvelles résistances qui sont imprévisibles (104). En

effet, nous avons pu montrer récemment que toutes les bactéries « dites » multi-résistantes ayant fait l'objet d'une médiatisation alarmiste restent sensibles à plusieurs antibiotiques « anciens » (102). Les résistances aux antibiotiques chez les bactéries n'étant généralement pas cumulatives (103), une meilleure utilisation de ce patrimoine antibiotique adapté aux situations d'émergence et d'épidémiologie locale reste la meilleure option à ce jour pour traiter les patients infectés par ce type de bactéries.

(extrait des Feuillets de la Biologie, sous presse, 2017).

X. PERSPECTIVES

Ce travail a porté sur l'étude des mécanismes de résistance à la colistine chez les Entérobactéries, notamment chez celles qui y sont intrinsèquement résistantes. Par deux approches phénotypiques et génotypiques, nous avons identifié le mécanisme de résistance à la colistine chez *Proteus vulgaris* et mis en place de nouvelles techniques *in vitro* au laboratoire afin de confirmer les hypothèses définies *in silico*. La première perspective de ce travail est de continuer la mise en place de nouvelles techniques et notamment des techniques de knock-in et/ou knock-out qui nous manquent encore pour démontrer nos hypothèses. Dans notre deuxième travail, nous avons étudié l'effet de l'efflux sur des bactéries résistantes à la colistine. Il a été montré que le mécanisme d'efflux était impliqué dans la résistance à la colistine. Notre étude nous a montré que les bactéries intrinsèquement résistantes semblent particulièrement sensibles à l'inhibition de l'efflux sur la résistance à la colistine. La deuxième perspective de ce travail est d'identifier la (ou les) pompe(s) à efflux impliquées dans la résistance à la colistine, notamment chez *Serratia marcescens* qui présentent une résistance en cocarde similaire à celle des *Enterobacter* pour lequel nous avons récemment montré le rôle de AcrAB-TolC et de *soxRS*. Un criblage systématique de médicaments disponibles pourrait permmetre d'identifier un nouvel inhibiteur de ce type de pompe susceptible d'être administré chez l'homme. Enfin, nous avons identifié les facteurs de risques et les mécanismes moléculaires responsables de la résistance à la colistine chez des souches cliniques de *K. pneumoniae* isolées au sein de l'AP-HM. La 3ème perspective de ce travail consistera à poursuivre la surveillance de la résistance à la colistine chez les Entérobactéries et à identifier les mécanismes moléculaires de la résistance chez les autres Entérobactéries isolées au laboratoire, notamment des souches d'*Enterobacter* et d'*E. coli*.

Ce travail de thèse s'inscrit dans un travail de thèse de science sur lequel je travaille depuis deux ans.

XI. REFERENCES

1. Siegel RE. Emerging gram-negative antibiotic resistance: daunting challenges, declining sensitivities, and dire consequences. Respir Care. 2008 Apr.

2. Mathlouthi N, Areig Z, Al Bayssari C, Bakour S, Ali El Salabi A, Ben Gwierif S, et al. Emergence of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates Collected from Some Libyan Hospitals. Microb Drug Resist Larchmt N. 2015 Jun.

3. Kempf M, Rolain J-M, Azza S, Diene S, Joly-Guillou M-L, Dubourg G, et al. Investigation of *Acinetobacter baumannii* resistance to carbapenems in Marseille hospitals, south of France: a transition from an epidemic to an endemic situation. APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand. 2013 Jan.

4. Bouguenoun W, Bakour S, Bentorki AA, Al Bayssari C, Merad T, Rolain J-M. Molecular epidemiology of environmental and clinical carbapenemase-producing Gram-negative bacilli from hospitals in Guelma, Algeria: Multiple genetic lineages and first report of OXA-48 in *Enterobacter cloacae*. J Glob Antimicrob Resist. 2016 Dec.

5. Temkin E, Adler A, Lerner A, Carmeli Y. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: biology, epidemiology, and management. Ann N Y Acad Sci. 2014 Sep.

6. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2005 May.

7. Biswas S, Brunel J-M, Dubus J-C, Reynaud-Gaubert M, Rolain J-M. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. Expert Rev Anti Infect Ther. 2012 Aug.

8. Stein A, Raoult D. Colistin: An Antimicrobial for the 21st Century? Clin Infect Dis. 2002 Oct.

9. Benedict R, Langlykke A. Antibiotic activity of *Bacillus polymyxa*. J Bacteriol. 1947 Jul.

10. Falagas ME, Rafailidis PI. Nephrotoxicity of colistin: new insight into an old antibiotic. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2009 Jun.

11. Johansen HK, Moskowitz SM, Ciofu O, Pressler T, Høiby N. Spread of colistin resistant non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* among chronically infected Danish cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros. 2008 Sep.

12. Mammina C, Bonura C, Di Bernardo F, Aleo A, Fasciana T, Sodano C, et al. Ongoing spread of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in different wards of an acute general hospital, Italy, June to December 2011. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 2012.

13. Arduino SM, Quiroga MP, Ramírez MS, Merkier AK, Errecalde L, Di Martino A, et al. Transposons and integrons in colistin-resistant clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* with epidemic or sporadic behaviour. J Med Microbiol. 2012 Oct.

14. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016 Feb.

15. Gruenheid S, Moual HL. Resistance to antimicrobial peptides in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Lett. 2012 May.

16. Raetz CRH, Reynolds CM, Trent MS, Bishop RE. Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. Annu Rev Biochem. 2007.

17. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. Front Microbiol. 2014.

18. Baron S, Hadjadj L, Rolain J-M, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. Int J Antimicrob Agents. 2016 Dec.

19. Yan A, Guan Z, Raetz CRH. An Undecaprenyl Phosphate-Aminoarabinose Flippase Required for Polymyxin Resistance in *Escherichia coli*. J Biol Chem. 2007 Dec.

20. Trent MS, Ribeiro AA, Lin S, Cotter RJ, Raetz CR. An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: induction on polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. J Biol Chem. 2001 Nov 16.

21. Chen Y-Y, Ko T-P, Lin C-H, Chen W-H, Wang AH-J. Conformational change upon product binding to *Klebsiella pneumoniae* UDP-glucose dehydrogenase: a possible inhibition mechanism for the key enzyme in polymyxin resistance. J Struct Biol. 2011 Sep.

22. Jiang S-S, Lin T-Y, Wang W-B, Liu M-C, Hsueh P-R, Liaw S-J. Characterization of UDP-glucose dehydrogenase and UDP-glucose pyrophosphorylase mutants of *Proteus mirabilis:* defectiveness in polymyxin B resistance, swarming, and virulence. Antimicrob Agents Chemother. 2010 May.

23. Lin QY, Tsai Y-L, Liu M-C, Lin W-C, Hsueh P-R, Liaw S-J. *Serratia marcescens arn,* a PhoP-regulated locus necessary for polymyxin B resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Sep.

24. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. Clin Microbiol Rev. 2017 Apr.

25. Rubin EJ, Herrera CM, Crofts AA, Trent MS. PmrD is required for modifications to *Escherichia coli* endotoxin that promote antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Apr.

26. Kato A, Latifi T, Groisman EA. Closing the loop: the PmrA/PmrB two-component system negatively controls expression of its posttranscriptional activator PmrD. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr.

27. Zowawi HM, Forde BM, Alfaresi M, Alzarouni A, Farahat Y, Chong T-M, et al. Stepwise evolution of pandrug-resistance in *Klebsiella pneumoniae*. Sci Rep. 2015.

28. Jayol A, Nordmann P, Desroches M, Decousser J-W, Poirel L. Acquisition of broad-spectrum cephalosporin resistance leading to colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Mar.

29. Lee H, Hsu F-F, Turk J, Groisman EA. The PmrA-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica*. J Bacteriol. 2004 Jul.

30. Reynolds CM, Kalb SR, Cotter RJ, Raetz CRH. A phosphoethanolamine transferase specific for the outer 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid residue of *Escherichia coli* lipopolysaccharide. Identification of the *eptB* gene and Ca2+ hypersensitivity of an *eptB* deletion mutant. J Biol Chem. 2005 Jun.

31. Olaitan AO, Diene SM, Gupta SK, Adler A, Assous MV, Rolain J-M. Genome analysis of NDM-1 producing *Morganella morganii* clinical isolate. Expert Rev Anti Infect Ther. 2014 Oct.

32. Acuña LG, Barros MJ, Peñaloza D, Rodas PI, Paredes-Sabja D, Fuentes JA, et al. A feed-forward loop between SroC and MgrR small RNAs modulates the expression of *eptB* and the susceptibility to polymyxin B in *Salmonella Typhimurium*. Microbiol Read Engl. 2016 Nov.

33. Moon K, Gottesman S. A PhoQ/P-regulated small RNA regulates sensitivity of *Escherichia coli* to antimicrobial peptides. Mol Microbiol. 2009 Dec;74(6):1314–30.

34. Klein G, Müller-Loennies S, Lindner B, Kobylak N, Brade H, Raina S. Molecular and structural basis of inner core lipopolysaccharide alterations in *Escherichia coli:* incorporation of glucuronic acid and phosphoethanolamine in the heptose region. J Biol Chem. 2013 Mar.

35. Aquilini E, Merino S, Knirel YA, Regué M, Tomás JM. Functional Identification of *Proteus mirabilis eptC* Gene Encoding a Core Lipopolysaccharide Phosphoethanolamine Transferase. Int J Mol Sci. 2014 Apr.

36. Tamayo R, Choudhury B, Septer A, Merighi M, Carlson R, Gunn JS. Identification of *cptA*, a PmrA-regulated locus required for phosphoethanolamine modification of the *Salmonella enterica* serovar typhimurium lipopolysaccharide core. J Bacteriol. 2005 May.

37. Salazar J, Alarcón M, Huerta J, Navarro B, Aguayo D. Phosphoethanolamine addition to the Heptose I of the Lipopolysaccharide modifies the inner core structure and has an impact on the binding of Polymyxin B to the *Escherichia coli* outer membrane. Arch Biochem Biophys. 2017 Apr.

38. Wright MS, Suzuki Y, Jones MB, Marshall SH, Rudin SD, van Duin D, et al. Genomic and transcriptomic analyses of colistin-resistant clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* reveal multiple pathways of resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Jan.

39. Cheng Y-H, Lin T-L, Lin Y-T, Wang J-T. Amino acid substitutions of CrrB responsible for resistance to colistin through CrrC in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Apr.

40. Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompart CM, Albertí S, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. Infect Immun. 2004.

41. De Majumdar S, Yu J, Fookes M, McAteer SP, Llobet E, Finn S, et al. Elucidation of the RamA regulon in *Klebsiella pneumoniae* reveals a role in LPS regulation. PLoS Pathog. 2015.

42. Tran AX, Lester ME, Stead CM, Raetz CRH, Maskell DJ, McGrath SC, et al. Resistance to the antimicrobial peptide polymyxin requires myristoylation of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* lipid A. J Biol Chem. 2005 Aug.

43. Kong Q, Six DA, Liu Q, Gu L, Roland KL, Raetz CRH, et al. Palmitoylation State Impacts Induction of Innate and Acquired Immunity by the *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium *msbB* Mutant ▿. Infect Immun. 2011 Dec.

44. McCoy AJ, Liu H, Falla TJ, Gunn JS. Identification of *Proteus mirabilis* mutants with increased sensitivity to antimicrobial peptides. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Jul.

45. Parra-Lopez C, Baer MT, Groisman EA. Molecular genetic analysis of a locus required for resistance to antimicrobial peptides in *Salmonella typhimurium*. EMBO J. 1993 Nov.

46. Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Jan.

47. Telke A, Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. SoxRS induces colistin hetero-resistance in *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter cloacae* by regulating AcrAB-TolC efflux pump. J Antimicrob Chemother. 2017 in press;

48. Li X-Z, Plésiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Rev. 2015 Apr.

49. Ni W, Li Y, Guan J, Zhao J, Cui J, Wang R, et al. Effects of efflux pump inhibitors on colistin resistance in multidrug resistant Gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Mar.

50. Osei Sekyere J, Amoako DG. Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazine (CCCP) Reverses Resistance to Colistin, but Not to Carbapenems and Tigecycline in Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae*. Front Microbiol. 2017.

51. Srinivasan VB, Rajamohan G. KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Sep.

52. Llobet E, Tomás JM, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. Microbiol Read Engl. 2008 Dec.

53. Chiou C-S, Chen Y-T, Wang Y-W, Liu Y-Y, Kuo H-C, Tu Y-H, et al. Dissemination of *mcr-1*-Carrying Plasmids among Colistin-Resistant *Salmonella* Strains from Humans and Food-Producing Animals, Taiwan. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Apr 17.

54. Leangapichart T, Gautret P, Brouqui P, Mimish Z, Raoult D, Rolain J-M. Acquisition of *mcr-1* Plasmid-Mediated Colistin Resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during Hajj 2013 and 2014. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Nov.

55. Zeng K-J, Doi Y, Patil S, Huang X, Tian G-B. Emergence of plasmid-mediated *mcr-1* gene in colistin-resistant *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Mar.

56. Li X-P, Fang L-X, Jiang P, Pan D, Xia J, Liao X-P, et al. Emergence of the colistin resistance gene *mcr-1* in *Citrobacter freundii*. Int J Antimicrob Agents. 2017 Jun.

57. Dobias J, Poirel L, Nordmann P. Cross-resistance to human cationic antimicrobial peptides and to polymyxins mediated by the plasmid-encoded MCR-1? Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2017 Mar 23.

58. Liu B-T, Song F-J, Zou M, Hao Z-H, Shan H. Emergence of Colistin Resistance Gene *mcr-1* in *Cronobacter sakazakii* Producing NDM-9 and in *Escherichia coli* from the Same Animal. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Feb.

59. Zhao F, Zong Z. *Kluyvera ascorbata* Strain from Hospital Sewage Carrying the *mcr-1* Colistin Resistance Gene. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Dec.

60. Pham Thanh D, Thanh Tuyen H, Nguyen Thi Nguyen T, Chung The H, Wick RR, Thwaites GE, et al. Inducible colistin resistance via a disrupted plasmid-borne *mcr-1* gene in a 2008 Vietnamese *Shigella sonnei* isolate. J Antimicrob Chemother. 2016 Aug.

61. Shen Z, Wang Y, Shen Y, Shen J, Wu C. Early emergence of *mcr-1* in *Escherichia coli* from food-producing animals. Lancet Infect Dis. 2016 Mar.

62. Di Pilato V, Arena F, Tascini C, Cannatelli A, Henrici De Angelis L, Fortunato S, et al. *mcr-1.2*, a New mcr Variant Carried on a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain of Sequence Type 512. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Sep.

63. Yang Y-Q, Li Y-X, Song T, Yang Y-X, Jiang W, Zhang A-Y, et al. Colistin Resistance Gene *mcr-1* and Its Variant in *Escherichia coli* Isolates from Chickens in China. Antimicrob Agents Chemother. 2017 May.

64. Lu X, Hu Y, Luo M, Zhou H, Wang X, Du Y, et al. MCR-1.6, a New MCR Variant Carried by an IncP Plasmid in a Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolate from a Healthy Individual. Antimicrob Agents Chemother. 2017 May.

65. Xavier B, Lammens C, Ruhal R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2,* in *Escherichia coli,* Belgium, June 2016. Eurosurveillance, Volume 21, Issue 27. 2016 Jul

66. Li R, Xie M, Zhang J, Yang Z, Liu L, Liu X, et al. Genetic characterization of *mcr-1*-bearing plasmids to depict molecular mechanisms underlying dissemination of the colistin resistance determinant. J Antimicrob Chemother. 2017 Feb.

67. Zhao F, Feng Y, Lü X, McNally A, Zong Z. IncP Plasmid Carrying Colistin Resistance Gene *mcr-1* in *Klebsiella pneumoniae* from Hospital Sewage. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Feb.

68. Poirel L, Kieffer N, Nordmann P. In-vitro study of ISApl1-mediated mobilization of the colistin resistance gene *mcr-1*. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Apr.

69. Zurfluh K, Kieffer N, Poirel L, Nordmann P, Stephan R. Features of the *mcr-1* Cassette Related to Colistin Resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Sep.

70. Kieffer N, Nordmann P, Poirel L. Moraxella Species as Potential Sources of MCR-Like Polymyxin Resistance Determinants. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Jun.

71. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2015. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2017 [Internet]. [cited 2017 Jun 1]. Available from: http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-europe-2015.pdf

72. Jayol A, Poirel L, Dortet L, Nordmann P. National survey of colistin resistance among carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and outbreak caused by colistin-resistant OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*, France, 2014. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 2016 Sep.

73. Mavroidi A, Katsiari M, Likousi S, Palla E, Roussou Z, Nikolaou C, et al. Characterization of ST258 Colistin-Resistant, *blaKPC*-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek Hospital. Microb Drug Resist Larchmt N. 2016 Feb.

74. Bathoorn E, Tsioutis C, Voorham JM da S, Scoulica EV, Ioannidou E, Zhou K, et al. Emergence of pan-resistance in KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Crete, Greece: a close call. J Antimicrob Chemother. 2016 Jan.

75. Giani T, Pini B, Arena F, Conte V, Bracco S, Migliavacca R, et al. Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 2013 May.

76. Maraki S, Vardakas KZ, Samonis G, Perdikis D, Mavromanolaki VE, Kofteridis DP, et al. In vitro susceptibility and resistance phenotypes in contemporary *Enterobacter* isolates in a university hospital in Crete, Greece. Future Microbiol. 2017 May.

77. Maraki S, Vardakas KZ, Mavromanolaki V-E, Kyriakidou M, Spais G, Kofteridis DP, et al. In vitro susceptibility and resistance phenotypes in contemporary *Citrobacter* isolates in a University Hospital in Crete, Greece. Infect Dis Lond Engl. 2017 Jul.

78. Giamarellou H. Epidemiology of infections caused by polymyxin-resistant pathogens. Int J Antimicrob Agents. 2016 Dec.

79. Rhouma M, Beaudry F, Letellier A. Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? Int J Antimicrob Agents. 2016 Aug.

80. Olaitan AO, Thongmalayvong B, Akkhavong K, Somphavong S, Paboriboune P, Khounsy S, et al. Clonal transmission of a colistin-resistant *Escherichia coli* from a domesticated pig to a human in Laos. J Antimicrob Chemother. 2015 Aug.

81. Carnevali C, Morganti M, Scaltriti E, Bolzoni L, Pongolini S, Casadei G. Occurrence of *mcr-1* in Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Isolates Recovered from Humans and Animals in Italy, 2012 to 2015. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Dec.

82. Cannatelli A, Giani T, Antonelli A, Principe L, Luzzaro F, Rossolini GM. First detection of the *mcr-1* colistin resistance gene in *Escherichia coli*, Italy. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Mar.

83. Giufrè M, Monaco M, Accogli M, Pantosti A, Cerquetti M, PAMURSA Study Group. Emergence of the colistin resistance *mcr-1* determinant in commensal *Escherichia coli* from residents of long-term-care facilities in Italy. J Antimicrob Chemother. 2016 Aug.

84. Corbella M, Mariani B, Ferrari C, Comandatore F, Scaltriti E, Marone P, et al. Three cases of *mcr-1*-positive colistin-resistant *Escherichia coli* bloodstream infections in Italy, August 2016 to January 2017. Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull. 2017 Apr.

85. Doumith M, Godbole G, Ashton P, Larkin L, Dallman T, Day M, et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. J Antimicrob Chemother. 2016 Apr.

86. von Wintersdorff CJH, Wolffs PFG, van Niekerk JM, Beuken E, van Alphen LB, Stobberingh EE, et al. Detection of the plasmid-mediated colistin-resistance gene *mcr-1* in faecal metagenomes of Dutch travellers. J Antimicrob Chemother. 2016 Dec.

87. Solheim M, Bohlin J, Ulstad CR, Schau Slettemeås J, Naseer U, Dahle UR, et al. Plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* detected from 2014 in Norway. Int J Antimicrob Agents. 2016 Aug.

88. Bernasconi OJ, Kuenzli E, Pires J, Tinguely R, Carattoli A, Hatz C, et al. Travelers Can Import Colistin-Resistant *Enterobacteriaceae*, Including Those Possessing the Plasmid-Mediated *mcr-1* Gene. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Aug.

89. Merkier AK, Rodríguez MC, Togneri A, Brengi S, Osuna C, Pichel M, et al. Outbreak of a Cluster with Epidemic Behavior Due to *Serratia marcescens* after Colistin Administration in a Hospital Setting. J Clin Microbiol. 2013 Jul.

90. Hayakawa K, Marchaim D, Divine GW, Pogue JM, Kumar S, Lephart P, et al. Growing prevalence of *Providencia stuartii* associated with the increased usage of colistin at a tertiary health care center. Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis. 2012 Sep.

91. Abat C, Desboves G, Olaitan AO, Chaudet H, Roattino N, Fournier P-E, et al. Increasing burden of urinary tract infections due to intrinsic colistin-resistant bacteria in hospitals in Marseille, France. Int J Antimicrob Agents. 2015 février.

92. Lee C-R, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. Front Microbiol. 2016.

93. Petrosillo N, Giannella M, Lewis R, Viale P. Treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae:* the state of the art. Expert Rev Anti Infect Ther. 2013 Feb.

94. Giacobbe DR, Del Bono V, Trecarichi EM, De Rosa FG, Giannella M, Bassetti M, et al. Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae:* results from a multicenter case-control-control study. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2015 Dec.

95. Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G, Koratzanis E, Galani I, Papadomichelakis E, et al. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. J Antimicrob Chemother. 2007 Apr.

96. Matthaiou DK, Michalopoulos A, Rafailidis PI, Karageorgopoulos DE, Papaioannou V, Ntani G, et al. Risk factors associated with the isolation of colistin-resistant gram-negative bacteria: a matched case-control study. Crit Care Med. 2008 Mar.

97. Papadimitriou-Olivgeris M, Christofidou M, Fligou F, Bartzavali C, Vrettos T, Filos KS, et al. The role of colonization pressure in the dissemination of colistin or tigecycline resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients. Infection. 2014 Oct.

98. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). J Antimicrob Chemother. 2011 Sep.

99. Parisi SG, Bartolini A, Santacatterina E, Castellani E, Ghirardo R, Berto A, et al. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* strains producing carbapenemases and increase of resistance to colistin in an Italian teaching hospital from January 2012 To December 2014. BMC Infect Dis. 2015.

100. Quan H, Li B, Couris CM, Fushimi K, Graham P, Hider P, et al. Updating and validating the Charlson comorbidity index and score for risk adjustment in hospital discharge abstracts using data from 6 countries. Am J Epidemiol. 2011 Mar.

101. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, et al. Health care-associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. Ann Intern Med. 2002 Nov.

102. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P-E, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2009 Aug.

103. Chabou S, Leangapichart T, Okdah L, Le Page S, Hadjadj L, Rolain J-M. Real-time quantitative PCR assay with Taqman(®) probe for rapid detection of MCR-1 plasmid-mediated colistin resistance. New Microbes New Infect. 2016 Sep.

104. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. PLoS ONE. 2012 Oct.

105. Novović K, Trudić A, Brkić S, Vasiljević Z, Kojić M, Medić D, et al. Molecular Epidemiology of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Serbia from 2013 to 2016. Antimicrob Agents Chemother. 2017.

106. Olaitan AO, Diene SM, Kempf M, Berrazeg M, Bakour S, Gupta SK, et al. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae f*rom healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator *mgrB*: an epidemiological and molecular study. Int J Antimicrob Agents. 2014 Dec.

107. Aires CAM, Pereira PS, Asensi MD, Carvalho-Assef APD. *mgrB* Mutations Mediating Polymyxin B Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Rectal Surveillance Swabs in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2016 Nov.

108. Jayol A, Poirel L, Brink A, Villegas M-V, Yilmaz M, Nordmann P. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Aug

109. Cheng Y-H, Lin T-L, Pan Y-J, Wang Y-P, Lin Y-T, Wang J-T. Colistin resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* strains from Taiwan. Antimicrob Agents Chemother. 2015 May.

110. Castanheira M, Farrell SE, Wanger A, Rolston KV, Jones RN, Mendes RE. Rapid expansion of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in two Texas hospitals due to clonal spread of ST258 and ST307 lineages. Microb Drug Resist Larchmt N. 2013 Aug

111. Bonura C, Giuffrè M, Aleo A, Fasciana T, Di Bernardo F, Stampone T, et al. An Update of the Evolving Epidemic of *blaKPC* Carrying *Klebsiella pneumoniae* in Sicily, Italy, 2014: Emergence of Multiple Non-ST258 Clones. PloS One. 2015;10(7):e0132936.

112. Gona F, Barbera F, Pasquariello AC, Grossi P, Gridelli B, Mezzatesta ML, et al. In vivo multiclonal transfer of bla(KPC-3) from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in surgery patients. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2014 Oct.

113. Capone A, Giannella M, Fortini D, Giordano A, Meledandri M, Ballardini M, et al. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2013 Jan.

114. Kontopidou F, Plachouras D, Papadomichelakis E, Koukos G, Galani I, Poulakou G, et al. Colonization and infection by colistin-resistant Gram-negative bacteria in a cohort of critically ill patients. Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2011 Nov.

115. Zarkotou O, Pournaras S, Voulgari E, Chrysos G, Prekates A, Voutsinas D, et al. Risk factors and outcomes associated with acquisition of colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: a matched case-control study. J Clin Microbiol. 2010 Jun.

116. Rhouma M, Fairbrother JM, Beaudry F, Letellier A. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. Acta Vet Scand. 2017 May.

117. Ling LL, Schneider T, Peoples AJ, Spoering AL, Engels I, Conlon BP, et al. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. Nature. 2015 Jan.

118. Dubourg G, Okdah L, Le Page S, Rolain J-M, Raoult D. In vitro activity of "old antibiotics" against highly resistant Gram-negative bacteria. Int J Antimicrob Agents. 2015 Dec.

119. Rolain J-M, Abat C, Jimeno M-T, Fournier P-E, Raoult D. Do we need new antibiotics? Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis. 2016 May.

XII. Liste des autres publications scientifiques

1. Baron S., Bardet L., Dubourg G., Fichaux M., Rolain JM. *mcr-1* plasmid-mediated colistin-resistant gene detection in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate in France. **Accepted in JGAR (IF=1,087)** DOI: 10.1016/j.jgar.2017.05.004
2. Bardet L, Baron S, Leangapichart T, Okdah L, Diene S, Rolain JM. Deciphering heteroresistance to colistin in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate from Marseille, France **Accepted in AAC (IF=4,301)** DOI: 10.1128/AAC.00356-17
3. Abou Abdallah R, Cimmino T, Baron S, Cadoret F, Michelle C, Raoult D, Fournier PE, Bittar F. Description of Chryseobacterium timonianum sp. nov., isolated from a patient with pneumonia. **Accepted in Antonie Van Leeuwenhoek. 2017 (IF=1,944)** DOI: 10.1007/s10482-017-0885-8
4. Orfanos S., Gomez C., Baron S., Rolain JM., Reynaud-Gaubert JM. Impact of Gram negative bacteria recolonization and de-novo colonization of lung allograft on chronic lung allograft dysfunction in a cystic fibrosis population. **Submitted in Respirology (IF=3,256)**
5. Dubourg G, Baron S., Cadoret F., Couderc C, Fournier PE., Raoult D. From culturomics to clinical microbiology and forward. **Submitted in EID (IF=8,22)**

Journal of Global Antimicrobial Resistance 10 (2017) 35–36

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Global Antimicrobial Resistance

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jgar

Letter to the Editor

mcr-1 plasmid-mediated colistin resistance gene detection in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate in France

Keywords:
mcr-1 gene
Colistin
Antimicrobial resistance

Sir,

The plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* and its variant *mcr-2* (sharing 76.5% homology) were recently described but already appeared to have spread worldwide [1], modifying our understanding of colistin resistance. In University Hospital La Timone (Marseille, France), a diagnostic strategy was developed for antibiotic susceptibility testing of *Enterobacteriaceae* consisting of testing a panel of 12 antibiotics that enable clinicians to treat most infections. However, when a strain is susceptible to less than three antibiotics in the panel, last-line antibiotics and old antibiotics are tested, including tigecycline, minocycline, fosfomycin and colistin. This was the case for an *Enterobacter cloacae* isolated from an abdominal drain of a 50-year-old woman from Algeria hospitalised in Marseille, France, who had breast cancer with metastases, peritoneal carcinomatosis and ascites. During her hospitalisation she received ceftriaxone, metronidazole, clindamycin and trimethoprim/sulfamethoxazole for an intra-abdominal abscess due to *Staphylococcus aureus*. An abdominal drain was inserted but subcutaneous fluid was collected, from which *E. cloacae* was isolated. However, because the patient's condition did not deteriorate, antibiotic treatment remained unchanged. The *E. cloacae* strain had an extended-spectrum β-lactamase (ESBL) profile and was highly resistant to antibiotics from the first panel, with the exception of imipenem and amikacin (Table 1). Further analysis showed that it was also resistant to colistin [minimum inhibitory concentration (MIC) = 2 mg/L by Etest and 4 mg/L by broth microdilution]. Given this atypical ESBL profile and the low colistin resistance MIC, the diagnostic strategy was to screen for the presence of the *mcr-1* gene using a new real-time PCR assay as well as standard PCR and sequencing [3]. These tests were positive. The presence of a $bla_{\text{TEM-1}}$ and $bla_{\text{CTX-M-15}}$ gene confirmed the ESBL profile. The search for carbapenemases with the Carba NP test and real-time quantitative PCR (qPCR) for $bla_{\text{OXA-48}}$, bla_{NDM} and bla_{KPC} genes was negative, suggesting that resistance to ertapenem and meropenem was linked to loss of porins. The multilocus sequence typing (MLST) profile (http://pubmlst.org/ecloacae/) showed that this strain belonged to the ST114 clone. Conjugation tests showed that the *mcr-1* gene was transferable to *Escherichia coli* J53RAZ. No faecal samples were available for investigation of carriage, and no known contact with animals was found. To the best of our knowledge, *mcr-1* in *E. cloacae* clinical isolates has only been described in Asia [1,4,5].

In France, *mcr-1*-positive strains have only been reported to date among *E. coli* in animals and food [1] but as well as in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* [1]. Although the patient in the current study was from Algeria where *mcr-1* has already been described in *E. coli* [1], she had not travelled to this country for several years. This shows that there is a need to establish an *mcr-1* and *mcr-2* gene screening strategy. This report shows that its prevalence may be underestimated, as routine screening does not exist and colistin susceptibility is not tested in most European countries. Moreover, the in vivo impact of *mcr-1*-mediated colistin resistance is still unknown. It would seem appropriate to establish a screening strategy for patients carrying multidrug-resistant (MDR) bacteria for whom therapeutic strategies are already limited. In such cases, appropriate diagnostics tools should be used. Development of a universal agar plate to screen for polymyxin resistance in Gram-negative bacteria is a first solution [6]. This tool continues, however, to present some limitations as it has only been tested directly on strains and spiked stools inoculated with known strains and has not yet been tested routinely. In our laboratory, we developed a medium that presents good results with fresh stools and strains (unpublished data) that will be soon tested routinely. The combination of colistin MIC determination and *mcr-1* real-time qPCR [3] could confirm the diagnosis of plasmid-mediated colistin resistance, following the same strategy already established for resistance to carbapenems. However, given the frequent low level of MIC to colistin and the consequent risk of a false-negative result, direct molecular screening may be more appropriate. This screening could take place in a point-of-care laboratory using an 'MDR kit' to establish, as early as possible, the necessary isolation measures to be taken. Routine detection of plasmid-mediated colistin resistance raises questions regarding the management of patients who carry *mcr-1*-positive strains. Plasmid-mediated resistance involves a risk of transmission to patients. Plasmid-mediated *mcr-1* colistin resistance was first described in animals and it has been shown that this resistance is transferable to humans [1]. We also know that strains can be transferred from animals to humans [1]. Some countries widely use colistin for animal growth-promotion purposes [1] and this consumption may have an impact on colistin resistance in humans. Isolation of patients carrying *mcr-1*-positive strains should be the rule in order to prevent the spread of colistin resistance, further limiting therapeutic options for MDR bacterial infections.

Funding

This work was partly funded by CNR and IHU Méditerranée Infection (Marseille, France).

http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2017.05.004
2213-7165/© 2017 International Society for Chemotherapy of Infection and Cancer. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

AAC Accepted Manuscript Posted Online 17 April 2017
Antimicrob. Agents Chemother. doi:10.1128/AAC.00356-17
Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Accepted Manuscript Posted Online

Antimicrobial Agents and Chemotherapy

AAC

Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Downloaded from http://aac.asm.org/ on April 21, 2017 by Drexel University Libraries

France2

1 Deciphering heteroresistance to colistin in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Marseille,

3 Running title: Colistin heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae*

4 Lucie Bardet[1], Sophie Baron[1], Thongpan Leangapichart[1], Liliane Okdah[1], Seydina M. Diene[1],

5 Jean-Marc Rolain[1*].

6 [1]URMITE, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Aix Marseille Université, UM63, CNRS 7278,

7 IRD 198, INSERM 1095, IHU-Méditerranée Infection, 19-21 bd Jean Moulin 13385 Marseille

8 Cedex 05.

9 **Author information:**

10 Lucie bardet : lucie.bardet@etu.univ-amu.fr

11 Sophie Baron : sophiebaron363@gmail.com

12 Thongpan Leangapichart : winmicro40@hotmail.com 13

Liliane Okdah : liliane.okdah@hotmail.com

14 Seydina M. Diene: seydina.diene@univ-amu.fr

15 ***Corresponding author:**

16 **Tel:** +33 4 91 32 43 75

17 **Fax:** +33 4 91 38 77 72

18 **Email:** jean-marc.rolain@univ-amu.fr

19

20 **Key words:** *Klebsiella pneumoniae*, heteroresistance, colistin, *mgrB*.

Antonie van Leeuwenhoek (2017) 110:1121–1132
DOI 10.1007/s10482-017-0885-8

ORIGINAL PAPER

Description of *Chryseobacterium timonianum* sp. nov., isolated from a patient with pneumonia

Rita Abou Abdallah · Teresa Cimmino · Sophie Baron · Frédéric Cadoret · Caroline Michelle · Didier Raoult · Pierre-Edouard Fournier · Fadi Bittar

Received: 24 January 2017 / Accepted: 5 May 2017 / Published online: 16 May 2017
© Springer International Publishing Switzerland 2017

Abstract Using a polyphasic taxonomic strategy, an aerobic, Gram-negative, non-motile, yellow pigmented rod isolated from a sputum sample of a patient with pneumonia was characterised. This bacterial strain, designated G972^T, could not be identified by our systematic MALDI-TOF screening on a MicroFlex. This led to the sequencing of the 16S rRNA gene, which shows 98.57% sequence identity with that of *Chryseobacterium indologenes* 16777^T, the phylogenetic closely related type strain of a species with standing in nomenclature, which putatively classifies it as a new species. The major cell fatty acids were identified as 13-methyl-tetradecanoic acid (61%), 3-hydroxy-heptadecanoic acid (16%) and 15-methyl-11-hexadecenoic acid (11%). D-glucose, D-mannose, aesculin, D-maltose, D-trehalose, and gentibiose are the main carbon source. Digital DNA–DNA hybridization (dDDH) estimation and average nucleotide identity values (ANI) of the strain G972^T against genomes of the type strains of related species ranged between 18.9 and 32.8% and between 71.46 and 83.61%, respectively, thus confirming again the new species status of the strain. Here, we describe the characteristics of this organism, complete genome sequence and annotation. The 5,390,132 bp size genome contains 4867 protein-coding genes, 89 RNAs (three genes are 5S rRNA, one gene is 16S rRNA, one gene is 23S rRNA and 84 tRNAs) with 35.51% GC content. Finally, on the basis of these polyphasic data, consisting of phenotypic and genomic analyses, we conclude that strain strain G972^T (= DSM 103388^T = CSUR P2233^T) represents a novel species for which we propose the name *Chryseobacterium timonianum*. The 16S rRNA and genome sequences are available in GenBank database under accession numbers LT161886 and FJVD00000000.

Keywords *Chryseobacterium* · Pneumonia · Taxono-genomics · New species

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10482-017-0885-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Rita Abou Abdallah and Teresa Cimmino have contributed equally to this work.

R. Abou Abdallah · T. Cimmino · S. Baron · F. Cadoret · C. Michelle · D. Raoult · P.-E. Fournier · F. Bittar (✉)
Aix-Marseille Univ, CNRS 7278, IRD 198, Inserm 1095, AP-HM, URMITE, IHU Méditerranée Infection, Marseille, France
e-mail: fadi.bittar@univ-amu.fr

D. Raoult
King Fahad Medical Research Center, King Abdul Aziz University, Jeddah, Saudi Arabia

Introduction

The genus *Chryseobacterium,* belonging to the family of *Flavobacteriaceae,* was first described by Vandamme and colleagues in 1994 with *Chryseobacterium gleum* as a type species (Vandamme et al.

From culturomics to clinical microbiology and forward

Grégory DUBOURG[1,2], Sophie BARON[,1,2], Frédéric Cadoret[1], Carine COUDERC[1,2], Morand A[2], Pierre-Edouard FOURNIER[1,2], Jean-Christophe LAGIER[1,2], Didier RAOULT[1,2]

1. Pôle des Maladies Infectieuses et Tropicales Clinique et Biologique, Fédération de Bactériologie-Hygiène-Virologie, Institut Hospitalo-Universitaire (IHU) Méditerranée Infection, Assistance Publique - Hôpitaux de Marseille, Marseille, France
2. Université Aix-Marseille, Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE) UM 63 CNRS 7278 IRD 198 INSERM U1095, Marseille, France.

#To whom correspondence should be addressed.

Prof. Didier RAOULT

IHU Méditerranée Infection
19-21 Boulevard Jean Moulin
13385 Marseille cedex 5
France
Tel: +33 (0)4 91 32 43 75
Fax: +33 (0)4 91 38 77 72

Introduction

The diagnosis of infectious diseases involving bacteria in Clinical Microbiology relied on phenotypical identification, which was based on the bacterial repertoire known to be associated with human beings. This mode of identification, which is in a fact a recognition of previously described microorganisms, does not allow the identification of new bacteria Recently, the systematic use of universal 16S rDNA gene sequencing of cultured bacteria presenting an atypical phenotypical profile paved the way for identifying rare, fastidious and new microorganisms (1;2). However, this implies to redefine specific phenotypical characteristics, which sometimes cannot be done, due to the limited number of available biochemical tests. More recently, the revolution of the MALDI-TOF identification allows comparing a protein spectrum obtained from a colony to a database, which can be permanently incremented with newly identified bacteria (3;4). The use of an identification score cut-off, with values ranging from 1.7 to 2, enables correct identification of the isolate. However, if MALDI-TOF MS recognizes bacteria never associated to human, it is reasonable to carry out a confirmation by sequencing of 16S rDNA gene. The main advantage of the MALDI-TOF MS compared to the sequencing methods is that it is extremely fast and cost-effective (3;4). Indeed, the cost mainly relies on the cost of the machine, the individual cost per test being insignificant. Thus, the ease to test the bacterial colonies led us establish the repertoire of commensal bacteria of human microbiota using high throughput culture and MALDI-TOF identification. Sequencing of 16S rDNA gene enables identification of atypical bacteria, with definition of new bacterial species, of which genomes are then sequenced. This approach, called culturomics (5;6) made possible to add 672 bacteria to the known repertoire of the bacteria already isolated from human mucosa. Since then, other teams conducted similar approach (7;8). Usefulness of Culturomics as increase of the knowledge of the repertoire of the cultivable bacteria of the human mucous

Title: Impact of gram negative bacteria airway recolonization on the occurrence of chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation in a population of cystic fibrosis patients.

Sarah Orfanos* MD (1), Carine Gomez MD (1, 2), Sophie Baron PharmD (1,3), Ritesh Akkisetty (4), Nadine Dufeu MD (2), Bérengère Coltey MD (2), Pascal Alexandre Thomas MD-PhD (1, 5), Jean Marc Rolain PharmD-PhD (1, 3), Martine Reynaud-Gaubert MD-PhD (1, 2)

1: Aix-Marseille University, Faculté de médecine, Marseille, France
2: Department of Respiratory Diseases, Lung Transplant Team, University Hospital of Marseille
3: URMITE CNRS IRD UMR 6236, IHU Méditerranée Infection, Aix-Marseille University, Marseille France
4: Drexel University College of Art and Sciences, Department of Biology
5: Department of Thoracic Surgery, Lung Transplant Team APHM, University Hospital of Marseille
*Corresponding author: Sarah.orfanos@gmail.com

Summary at a glance:

This retrospective study analyzed all microbiological data pre- and post-lung transplant of a population of cystic fibrosis patients. This study confirmed with a larger number of culture samples pre- and post-transplant the negative impact of newly isolated gram negative bacteria post-lung transplant on the occurrence of chronic lung allograft dysfunction.

Abstract:

Background: Chronic Lung Allograft Dysfunction (CLAD) is the main cause of morbidity and mortality after the first year following lung transplantation (LTx). Risk factors of CLAD have been extensively studied, but the association between gram-negative bacteria (GNB) bronchial colonization and the development of CLAD is controversial.

Methods: We retrospectively analyzed microbiological data from all adult cystic fibrosis (CF) patients who underwent a first bilateral LTx in the University Hospital of Marseille, between January 2010 and December 2014. The main analysis was performed at the species level on airways bacterial cultures. The association between post-transplant recolonization with the same species or de-novo colonization with a new GNB species and CLAD was investigated. The same analysis was performed on a sub-group of patients at the strain level using Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry technique.

Results: Forty patients were included in the study. Patients with GNB de-novo colonization had a higher risk of developing CLAD (OR=7.47, p=0.03) and a lower rate of CLAD-free survival (p=0.005). Patients with GNB recolonization were protected from CLAD (OR=0.12 p=0.01) and exhibited a higher rate of CLAD-free survival. No conclusion could be drawn from the subgroup MALDI-TOF MS analysis at the strain level.

Conclusion: Post-LTx GNB airway recolonization seems to be a protective factor against CLAD, whereas de-novo colonization with a new species of GNB seems to be a risk factor for CLAD.

Key words: Chronic lung allograft dysfunction / Lung transplantation / Infection and inflammation / Cystic Fibrosis

SERMENT DE GALIEN

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

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

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

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

RESUME

Du fait de l'émergence et de la diffusion de bactéries à Gram négatif résistantes aux carbapénèmes ces dernières années, la colistine a été réutilisée pour traiter des infections liées à ces germes. Néanmoins, depuis sa réintroduction, la résistance acquise à la colistine chez les bactéries à Gram négatif a émergé. Les mécanismes expliquant la résistance à la colistine au sein des entérobactéries sont encore incompris, tout particulièrement pour les espèces naturellement résistantes des genres *Serratia, Proteus, Providencia* et *Morganella*.

L'objectif de cette thèse était d'identifier de nouveaux mécanismes de résistance à la colistine chez les entérobactéries, notamment chez celles qui y résistent naturellement. Dans une première partie, nous avons réalisé une revue de la littérature des mécanismes de la résistance à la colistine identifiés à ce jour et définis l'épidémiologie de la résistance à la colistine en Europe. Dans une deuxième partie, nous nous sommes intéressés au mécanisme de la résistance à la colistine chez *Proteus vulgaris* en comparant d'une souche anormalement sensible à la colistine et d'une souche résistante par des méthodes génomiques et phénotypiques. La mise en évidence d'une mutation délétère sur le gène *arnD* a permis de montrer le rôle de l'aminoarabinose dans la résistance à la colistine chez *P. vulgaris*. Un troisième volet de cette thèse a porté sur la compréhension du rôle de l'efflux dans la résistance à la colistine chez les entérobactéries. A partir d'une collection de souches résistantes à la colistine, nous avons évalué l'effet d'un inhibiteur de pompes à efflux sur la CMI de la colistine. Nous avons montré que les bactéries hétérorésistantes ainsi que les souches résistants naturellement à la colistine étaient beaucoup répondeuses à l'effet inhibiteur de pompe du Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazine (CCCP) que les autres entérobactéries. Enfin, dans une troisième partie, nous avons cherché à identifier les facteurs de risque d'acquisition de *Klebsiella pneumoniae* résistantes à la colistine (KPCR) et à déterminer le support moléculaire de cette résistance chez des patients hospitalisés au sein de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille. L'analyse univariée nous a permis d'identifier plusieurs facteurs de risque incluant la durée d'hospitalisation, l'isolement préalable d'une souche productrice de carbapénémases ou la présence de patients porteurs de KPCR dans le même service à la même période. L'analyse moléculaire des souches a permis de décrire 3 nouvelles mutations rapportées pour la première fois ici.

Ce travail a permis de mieux comprendre les mécanismes qui régissent la résistance à la colistine chez les entérobactéries et les facteurs qui conduisent à cette résistance.

Mots-clés : colistine, polymyxines, mécanismes de résistance, *mcr-1*, entérobactéries.