



## Systemes d'efflux actifs bactériens : caractérisation et modélisation pour quelles perspectives ?

Julio Aires  
EA4565

Microbiologie  
Faculté de Pharmacie

06/10/2011



## QUELQUES DATES...

### ❖! *Escherichia coli*

- efflux spécifique tétracycline (Levy SB, MCMurry L. 1978. Nature)
- description de AcrAB-TolC (RND) (Nakamura et al. 1978. J.Bact)

### ❖! *Staphylococcus aureus* : NorA (MFS) (Yoshida et al. 1990. J.Bact)

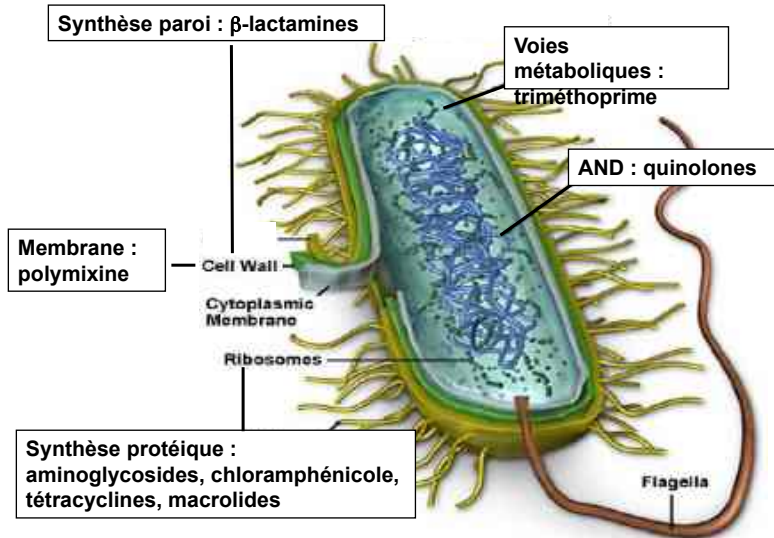
*Staphylococcus epidermidis* : MsrA (ABC) (Roos et al. 1990. Mol Microbiol)

### ❖! *Pseudomonas aeruginosa* : MexAB-OprM (RND) (Nikaido H. 1994. Science)

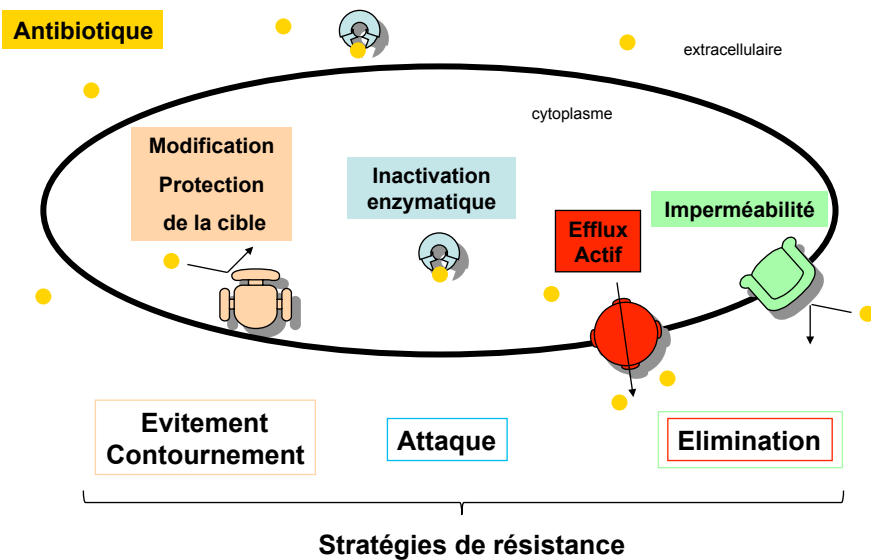
### ❖! *Streptococcus pneumoniae*: PmrA (MFS) (Gill et al. 1999. AAC)

- ! Efflux cellules leucémiques résistantes aux anthracyclines  
(Inaba et al. 1979. Leukemia Cancer Res)

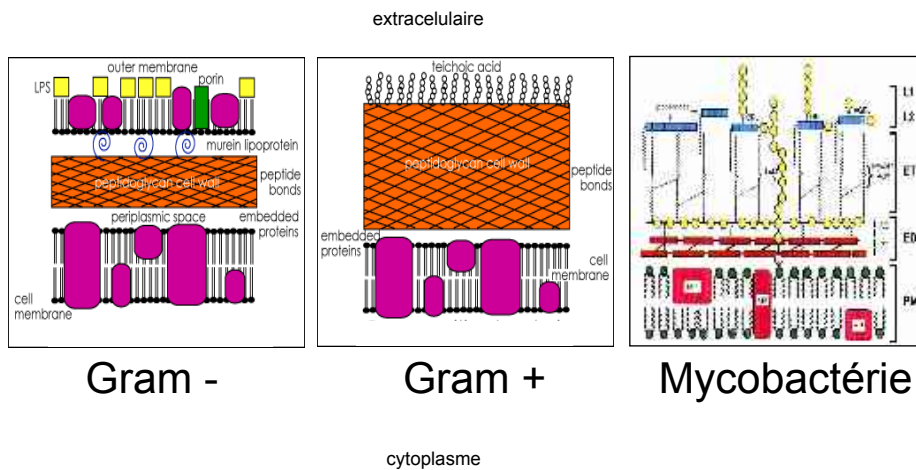
## CIBLES ANTIBIOTIQUES



## MECANISMES DE RESISTANCE



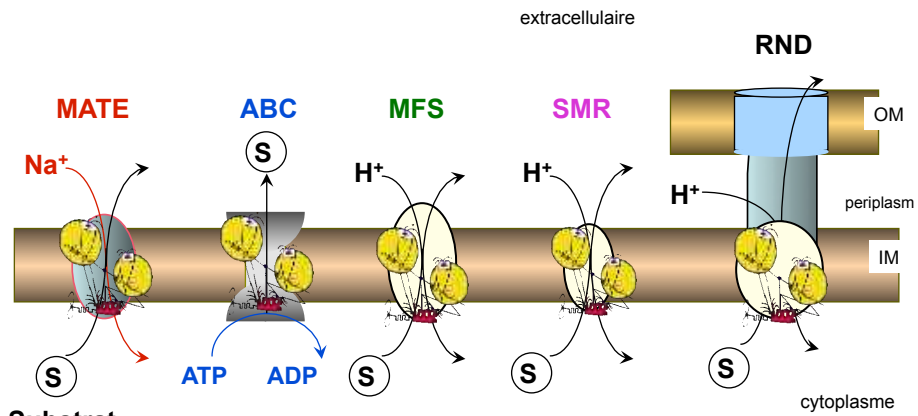
## MEMBRANES BACTERIENNES



## EFFLUX ACTIFS BACTERIENS

- SOURCE ENERGIE
- !RELATION PHYLOGENETIQUE
- SPECIFICITE SUBSTRAT

## CLASSES EFFLUX BACTERIENS



Substrat

**MATE** : Multidrug And Toxic compound Extrusion

**SMR** : Small Multidrug Resistance

**ABC** : ATP-Binding Cassette

**MFS** : Major Facilitator Superfamily

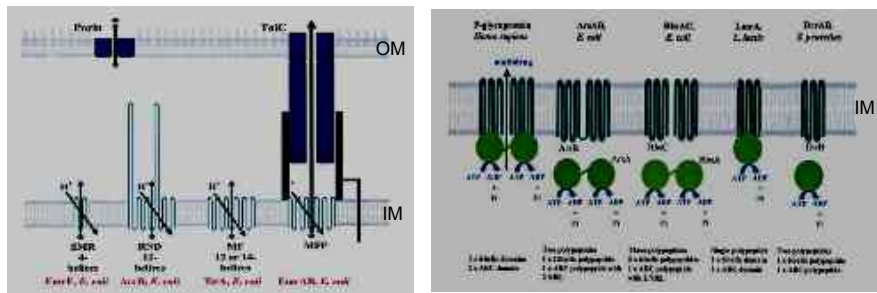
**RND** : Resistance/Nodulation/cell Division

## EFFLUX ACTIFS BACTERIENS

- SOURCE ENERGIE
- !RELATION PHYLOGENETIQUE
- SPECIFICITE SUBSTRAT

## STRUCTURE SECONDAIRE

extracelulaire



cytoplasme

*Borges-Walmsley et al. 2003. J. Biochem*

## EFFLUX ACTIFS BACTERIENS

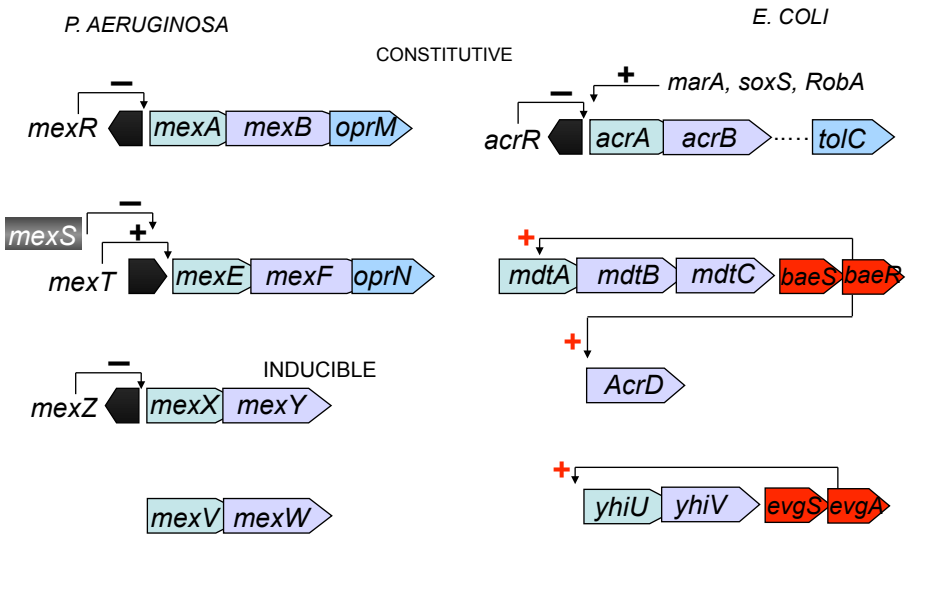
- SOURCE ENERGIE
- !RELATION PHYLOGENETIQUE
- SPECIFICITE SUBSTRAT

## EXEMPLES SUBSTRATS EFFLUX ACTIFS RND

	EFFLUX	SUBSTRATS
<i>P. aeruginosa</i>	MexAB-OprM	Cmp, Fq, Tmp, Tc, $\beta$ -Lact*, Nov, Fus, Rif, Sulf, etc...
	MexCD-OprJ	Cmp, Fq, Tmp, Tc, Zwitterion, Ery
	MexEF-OprN	Cmp, Fq, Tmp
	MexXY-OprM	Ery, Fq, Tc, Zwitterion, Aminoglycosides
<i>E. coli</i>	AcrAB-TolC	Cmp, Fq, Tc, $\beta$ -Lact, Nov, Fus, Rif, Sulf, Etb, Biolytins, Detergents, Dyes, ...
	AcrD-(TolC)	Fq, Tc, $\beta$ -Lact, Zwitterion, Aminoglycosides, Nov, Biolytins? Detergents

Cmp : chloramphénicol ; Fq : fluoroquinolones ; Tmp : triméthoprime ; Tc : tétracycline ;  $\beta$ -Lact :  $\beta$ -lactamines ; Nov : novobiocine ; Fus : acide fusidique ; Rif : rifampicine ; Sulf : sulfaméthoxazole ; Zwitterion : céfépime/céfépirome ; Ery : érythromycine ; etc : acriflavine, cristal violet, sels biliaires, bromure d'éthidium, triton X100, SDS, solvants...  
\* excepté imipénème

## ORGANISATION GENETIQUE : RND



### Exemple de pompes à efflux pathogènes humains

Pathogène	Efflux	Famille
<i>S. aureus</i>	NorA, NorB, NorC, TetK-L, MdeA MsrA	MFS ABC
<i>L. monocytogenes</i>	MdrL, Lde, TetK-L	MFS
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Mmr TetK-L DrrB	SMR MFS ABC
<i>Enterococcus</i> spp.	TetK-L, EmeA Lsa	MFS ABC
<i>H. Influenzae</i>	TetB, K AcrB-like	MFS RND

Bambeke F.V. et al. 2003. JAC  
Li & Nikaido. 2004. Drugs  
Li & Nikaido. 2009. Drugs

### Exemple de pompes à efflux pathogènes humains

Pathogène	Efflux	Famille
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	MtrD, FarB MacAB	RND MATE
<i>Salmonella</i> spp.	AcrB, MdtBC TetA-D, FloR	RND MFS
<i>E. coli</i>	EmrE YdhE TetA-E, Bcr, MdfA, YceL, EmrB AcrB, AcrD, AcrF, YegN, YhiV	SMR MATE MFS RND
<i>P. aeruginosa</i>	CImA, TetA,C,E MexB, MexD, MexF, MexK, MexY MexN, MexQ, MexW, TriC	MFS RND RND

Bambeke F.V. et al. 2003. JAC  
Li & Nikaido. 2004. Drugs  
Li & Nikaido. 2009. Drugs

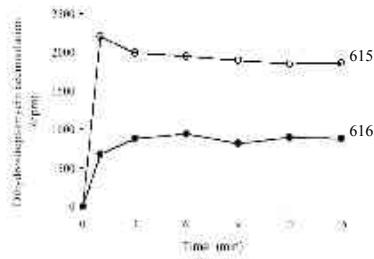
### Surexpression de l'efflux chez *P. aeruginosa*

	CMI (µg/ml)			
	CAR	CIP	CHL	TET
PAO1 (sauvage)	64	0.12	64	16
MexAB-oprM+++	256	0.25	256	64
<i>mexAB-oprM::kan</i>	0.5	0.03	2	1
MexCD-oprJ+++	16	1	256	1
$\Delta$ <i>mexCD-oprJ</i>		0.002	1	0.12
MexEF-oprN+++	0.5	16	0.5	>1024
MexXY-oprM+++		0.5	512	64
$\Delta$ <i>mexXY-oprM</i>		0.25	8	32
CLSI concentrations critiques	512	4	32	16

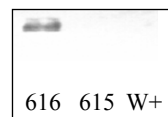
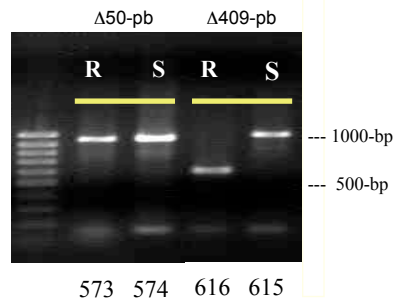
CAR, carbécilline; CIP, ciprofloxacine; CHL, chloramphénicol; TET, tétracycline

Piddock, 2004, *Clin Microbiol Rev*

### Souches cliniques de *P. aeruginosa* : mutations du répresseur *mexZ* de *mexXY*



Vogne et al. 2004. AAC





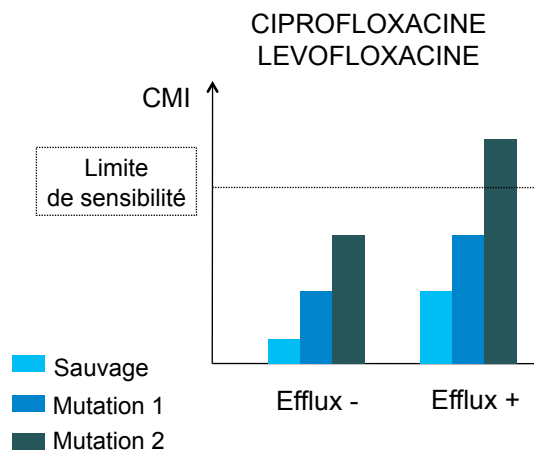
### Surexpression de l'Efflux

	CMI ( $\mu\text{g/ml}$ )			
	NOR	CIP	EtBr	ACR
<i>S. aureus</i> SA-1199 (sauvage)	0.5	0.5		
<i>S. aureus</i> SA-1199 (NorA+++)	<b>16</b>	<b>4</b>		
<i>S. pneumoniae</i> R6 (sauvage)	2	0.5	2	4
<i>S. pneumoniae</i> R6 (PmrA+++)	<b>16</b>	<b>2</b>	<b>16</b>	<b>16</b>
<i>S. pneumoniae</i> R6:: <i>cat</i>	2	0.5	2	4
CLSI concentrations critiques	16	4		

NOR, norfloxacine; CIP, ciprofloxacine; EtBr, bromure d'étidium; ACR, acriflavine

*Piddock, 2004, Clin Microbiol Rev*

### Conséquences cliniques de l'efflux



## Doubles Mutants Cible/Efflux

*P. aeruginosa*

CMI lévofloxacine (µg/ml)

	Type S	MexAB+++
Aucune	0.25	2
<i>gyrA</i> (Thr83->Ile)	2	8
<i>gyrA</i> (Thr83->Ile) + <i>parC</i> (Ser87->Leu)	4	32
<i>gyrA</i> (Thr83->Ile + Asp87->Tyr) + <i>parC</i> (Ser87->Leu)	16	128

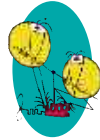


Lomovskaya O. et al. 1999. AAC

## IMPACT DE L'EFFLUX SUR LA RESISTANCE CLINIQUE AUX ANTIBIOTIQUES

- ! Surexpression possible : difficilement détectable en routine car faible augmentation des CMI et favorise l'apparition de résistances par sous estimation des taux de résistance
- ! Systèmes d'efflux peuvent coopérer avec d'autres mécanismes de résistance
- ! Expression concomitante de ++ pompes à efflux : résistance haut niveau pour un antibiotique; co-expression de ++ pompes à efflux : multirésistance
- ! Augmente le risque de sélection de mutants résistants (diminution de la concentration intracellulaire : survie de la population de souches à sensibilité diminuée)
- ! Transférabilité possible par éléments génétiques mobiles
- ❖! Développement résistance par efflux vis-à-vis des désinfectants : potentiellement problématique au niveau hospitalier

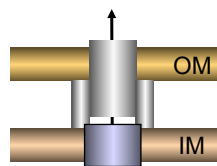
Comment ça marche ?



CARACTERISATION  
MODELISATION

## CARACTERISATION - MODELISATION

Exemple des Systèmes RND



Composante(s) impliquée(s) ?

⇒ Protéine membranaire externe interchangeable

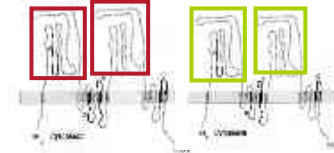
⇒ La pompe : élément dynamique  
- transport  
- reconnaissance

# CARACTERISATION - MODELISATION

## STRATEGIES

### ⇒ PROTEINES CHIMERIQUES

*Elkins et al. 2002. J Bact.*

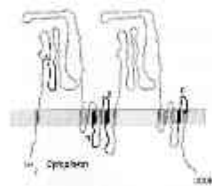


# CARACTERISATION - MODELISATION

### ⇒ PROTEINES CHIMERIQUES

### ⇒ MUTAGENESE DIRIGEE

*Aires et al. 2001. AAC.*



	TMS2	
MexB	IHEVVKTLGAILLVFLVMYFLQNFRA	365
MexD	IEKVIHTEAMVLVFLVMFLFLENVRY	367
MexF	IEKVVHTEALVVLVFLVFLQFWRA	368
MexY	IEKVVTEALVVLVFLVMYFLQNFRA	363
ActB	IHEVVKTEALVVLVFLVMYFLQNFRA	365
ActF	IHEVVKTEALVVLVFLVMYFLQNFRA	365

	TMS4	
MexB	FSINTLTFQGMVLAIGLLDDIIVVIVVERVM	420
MexD	FSVNMVTFQGMVLAIGLLDDIIVVIVVERIM	422
MexF	FSINAVLTFQGMVLAIGLLDDIIVVIVVERMI	422
MexY	FSINVLTFQGMVLAIGLLDDIIVVIVVERIM	418
ActB	FSINTLTFQGMVLAIGLLDDIIVVIVVERVM	420
ActF	FSINTLTFQGMVLAIGLLDDIIVVIVVERVM	420
CpxA	FSANLHGLAL--DFPIIIIDNVVIVVIVVERSL	421

	TMS10	
MexB	GLSNDVFPQVGLTTIIGLSKRALIVFPAKEL	950
MexD	GMNDVFPVGLTTIIGLSKRALIVFPAKEL	947
MexF	GSNDNIFQIGLVVLGSLKRALIVFPAKD-	962
MexY	GLPNDVFPVGLTTIIGLSKRALIVFPAKDH	944
ActB	GLSNDVFPQVGLTTIIGLSKRALIVFPAKEL	952
ActF	NQKNDVFPVGLTTIIGLSKRALIVFPAKDL	951

## CARACTERISATION - MODELISATION

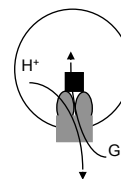
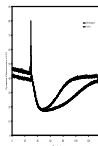
⇒ PROTEINES CHIMERIQUES

⇒ MUTAGENESE DIRIGEE

⇒ MODELISATION IN VITRO

Protéoliposomes

*Aires et al. 2004. J. Bact*



## CARACTERISATION - MODELISATION

⇒ PROTEINES CHIMERIQUES

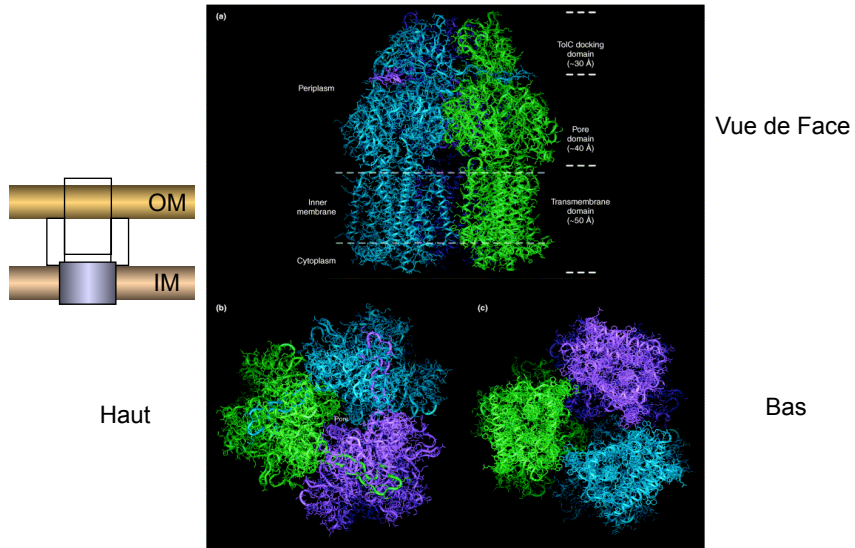
⇒ MUTAGENESE DIRIGEE

⇒ MODELISATION IN VITRO

⇒ CRISTALLOGRAPHIE

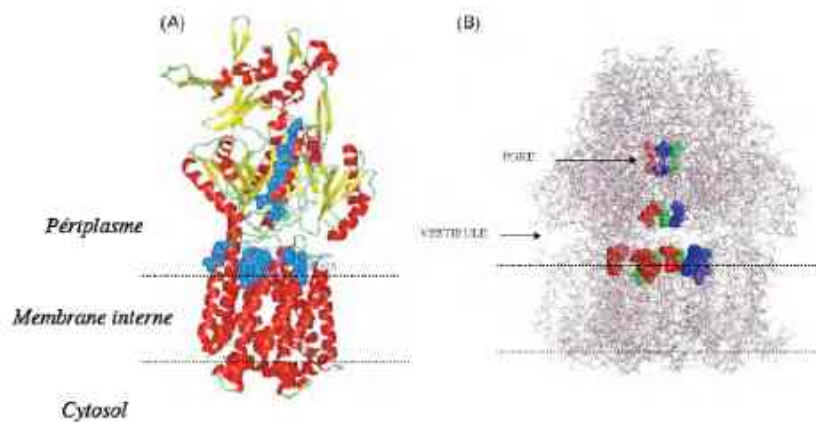


## *E. coli* AcrB (RND)



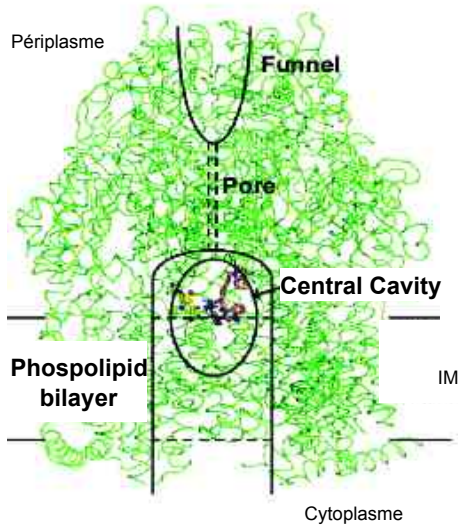
Murakami S., Yamaguchi A. 2003. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13:443-452

## RECONNAISSANCE SUBSTRAT : AcrB (RND)



Hernandez-Mendoza et al. 2007

### MUTAGENESE DIRIGEE AcrB



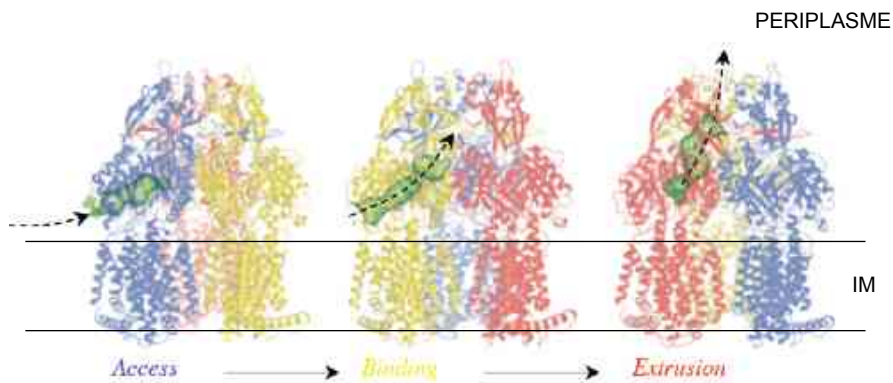
#### Mutations Ponctuelles

V	Perip	CC
F556A	F664A	L29A
	F666A	D99A
	E673A	D101A
		N109A
	D566A	F386A
	S715A	F388A
	R717A	F458A
	W859A	F459A

↓  
*E. coli*  $\Delta$ acrAB

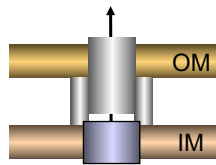
Yu et al. 2003. *J. Bact.* 185:5657-5664

### Modélisation de l'Evolution de la cavité Périplasmique



Seeger et al. 2008. *Nature Struct & Mol Biol*

# ASSEMBLAGE RND

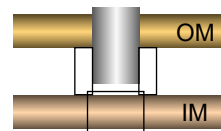
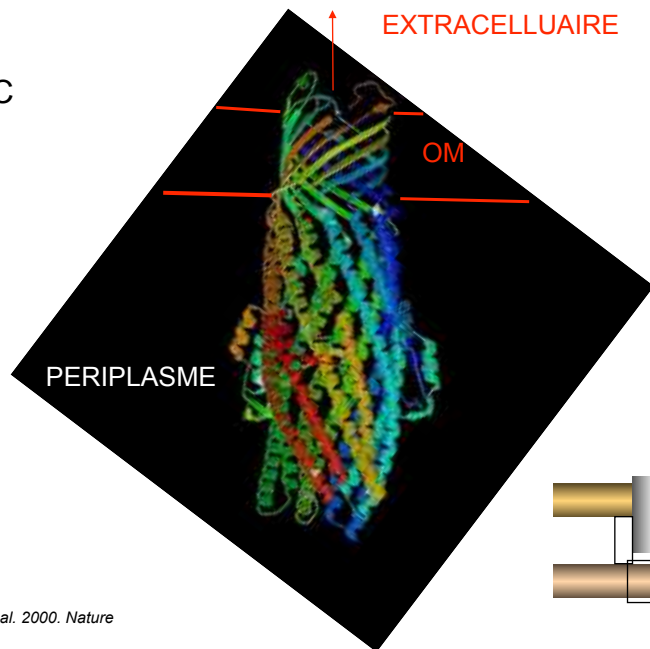


ToIC

EXTRACELLULAIRE

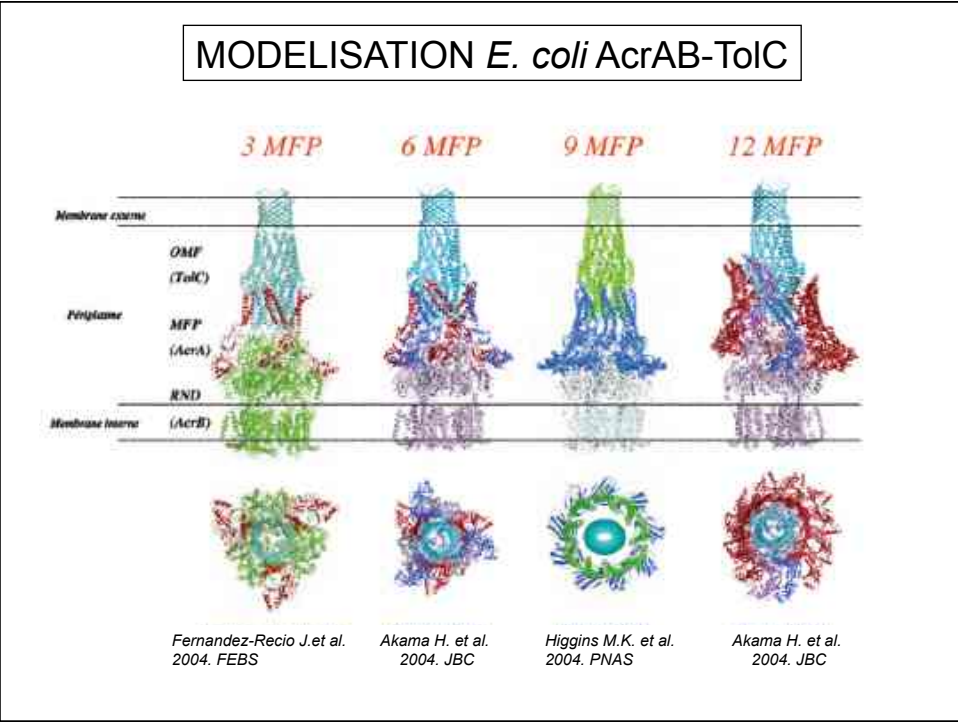
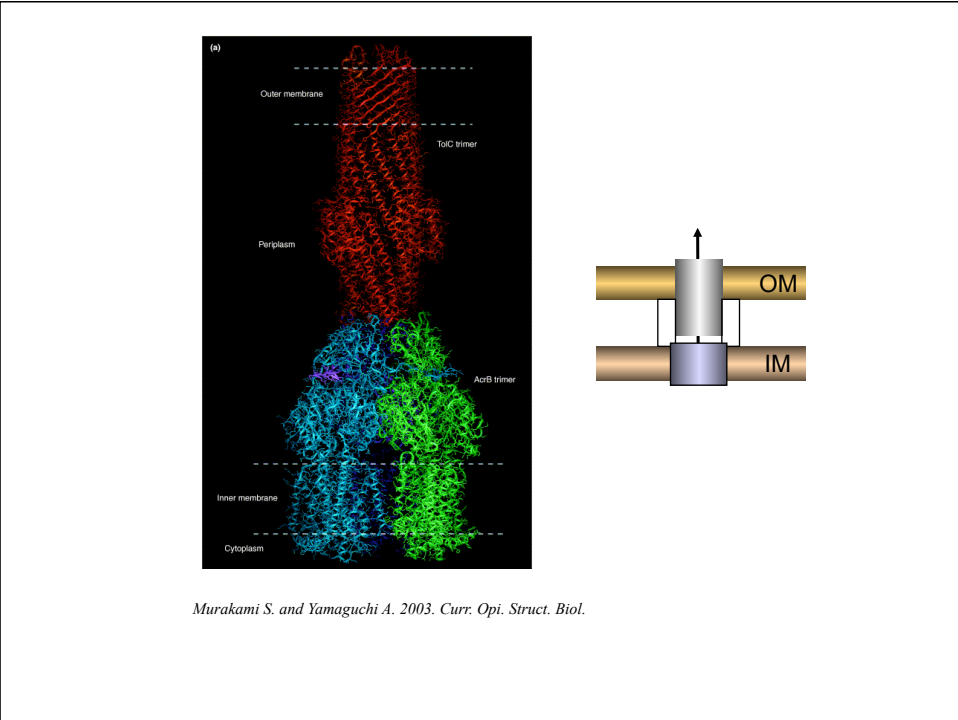
OM

PERIPLASME

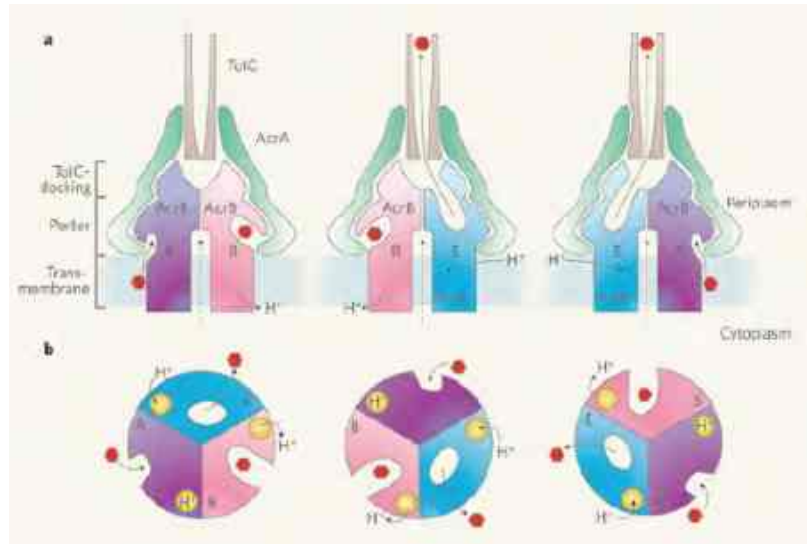


*Koronakis et al. 2000. Nature*

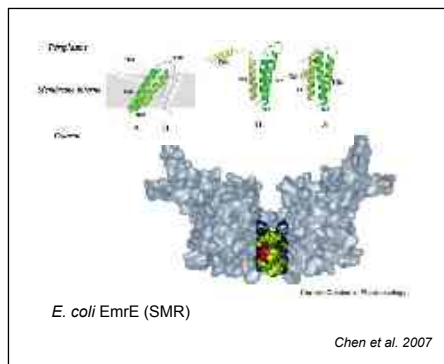
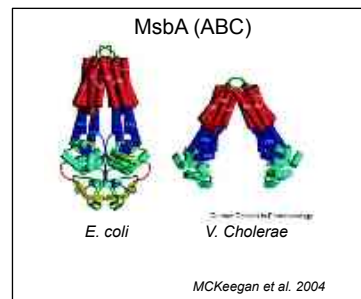
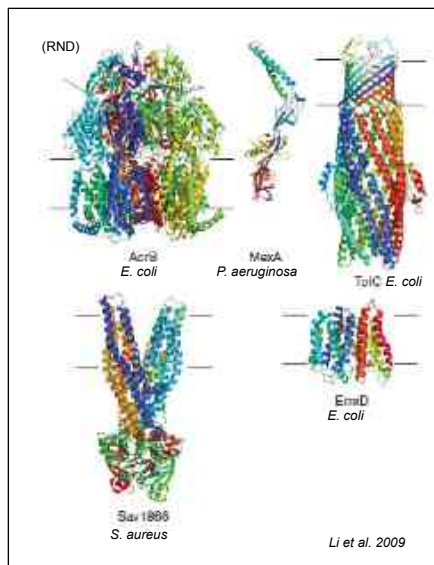




Modèle rotatif : *E. coli* AcrAB-TolC



Schuldiner, S. 2006. Nature



## Perspectives?

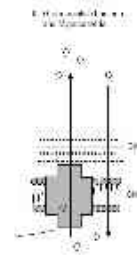
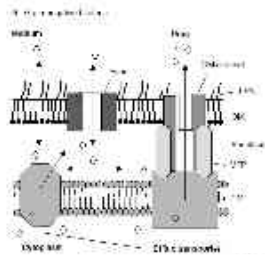
-!Absence de nouvelles molécules antibiotiques

-!Modèle des inhibiteurs des  $\beta$ -lactamases:  
Inhibiteurs de pompes à efflux (EPI)



Continuer à utiliser les molécules actuelles

## Inhibiteurs d'Efflux (EPI)



EPI

### CIBLES POTENTIELLES

Canal, membrane externe  
Protéine de liaison, périplasme  
Pompe, membrane cytoplasmique  
Energie

### ACTIVITES POTENTIELLES

Encombrement du canal  
Perturber l'assemblage  
Compétition  
Dissipation du potentiel

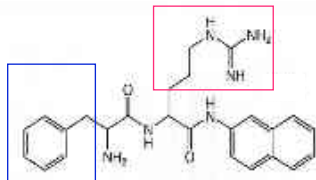
## EPI

- ❖!Inhibiteurs de la composante énergétique : utiles in vitro
  - Inhibiteurs ATPase
  - Inhibiteurs de la force proton motrice (CCCP),
  - Dissipateurs d'énergie (ionophores Nigéricine, Valinomycine)
- ❖!Inhibiteurs de la pompe : potentiellement utiles en thérapeutique
  - Agent hypertenseurs (réserpine)
  - Inhibiteurs des canaux calciques (vérapamil)
  - Certains anti-dépresseurs
  - Inhibiteurs de la P-glycoprotéine...

## EPI : STRATEGIES

### ❖!Criblage de composés synthétiques

- Dérivés peptidiques (Phe-Arg  $\beta$ -naphthylamide (PA $\beta$ N))
- Benzimidazoles
- Quinololines
- Arylpipéridines, arylpipérazines



L-Phe-L-Arg-beta-naphthylamide (PAN)

(MicrobioPharmacology's patent compound in W96/33285-A1)

### ❖!Criblage de composés naturels

- Extraits de plantes,
- !Produits de fermentation (actinomycètes)
- !Insectes...

## Doubles Mutants Cible/Efflux

*P. aeruginosa*

CMI lévofloxacine (µg/ml)

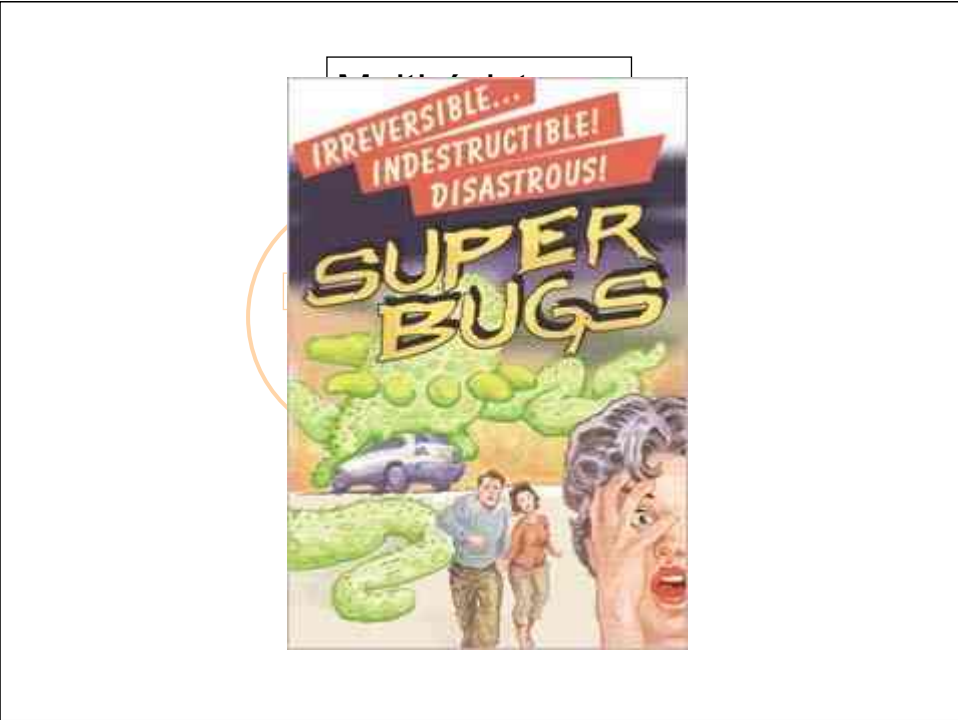
	Type S	MexAB+++	MexAB++ + EPI
Aucune	0.25	2	0.03
<i>gyrA</i> (Thr83->Ile)	2	8	0.5
<i>gyrA</i> (Thr83->Ile) + <i>parC</i> (Ser87->Leu)	4	32	2
<i>gyrA</i> (Thr83->Ile + Asp87->Tyr) + <i>parC</i> (Ser87->Leu)	16	128	8



Lomovskaya O. et al. 1999. AAC

## MECHANISMES RESISTANCE ANTIBIOTIQUES

	β-lactams	Aminosides	Quinolones	Macrolides	Tetracyclines
Inactivation Enzymatique	+	+	(+)	+	+
Mutation Cible	+	+	+	+	+
Imperméabilité Paroi	+	+	+	+	+
Efflux actif	+	+	+	+	+




*P. aeruginosa*

## The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria

Penney Nordmann, Gerlie Cuervo, Thierry Poizat

From early this decade, Enterobacteriaceae in the USA and subsequently worldwide and systemic infections; although they are isolates, KPC  $\beta$  lactamases (KPC-1 to KPC-27) are now the most common carbapenemase-producing bacteria. Infections with KPC-producing bacteria are leaving few available therapeutic options, and antibiotic susceptibility testing is the mainstay of treatment.



Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2014) 57, 223–231  
 Service de Bactériologie, Mycologie, Hygiène, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Université Paris-Saclay, Sorbonne Université, Paris, France  
 © 2014 British Society for Antimicrobial Chemotherapy



Quelles molécules ne sont pas transportées ?

## REMERCIEMENTS



Pr. P. Plésiat  
Laboratoire de Microbiologie  
CHUR de Besançon  
France



Pr. JC Pechère, Dr. T. Kohler  
Dpt. Biologie Cellulaire et Moléculaire  
Centre Universitaire Médical de Genève  
Suisse



Pr. H. Nikaido  
Dpt. Biologie Cellulaire et Moléculaire  
Université de Californie à Berkeley  
USA