

RÉSUMÉ

Plusieurs micro-organismes possèdent des pompes à efflux capables de pomper des molécules à l'extérieur de la cellule bactérienne. La pompe EmrAB chez *E. coli* appartient à la superfamille des pompes majeures et confère une résistance à des molécules hydrophobes. Un homologue de *emrAB* de *E. coli* a été identifié chez *P. aeruginosa*. Suite à un séquençage au hasard d'une banque génomique de *P. aeruginosa*, un plasmide recombinant a été identifié contenant un insert de 1.0 kb et codant pour une protéine ayant une identité de 43 % à *emrB* de *E. coli*. La séquence du locus *pmrAB* de 3.2 kb a été déterminée à partir d'un recombinant isolé d'une banque de chromosomes bactériens artificiels (BACs) de *P. aeruginosa*. Un premier cadre de lecture ouvert (*pmrB*) démontrait une homologie avec *emrB* et un deuxième (*pmrA*) était homologue à *emrA*, de *E. coli*. Des analyses génomiques nous ont permis de proposer un modèle à 14 régions transmembranaires pour la protéine PmrB. Le locus *pmrAB* a ensuite été cloné dans un vecteur à haute copie, et le transport de drogues évalués par une technique sensible à la fluorescence. Ceci nous a permis de démontrer le rôle des protéines PmrA et PmrB dans le transport du bromure d'éthidium et la proflavine.

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier, en premier lieu, mon directeur de recherche, Dr Roger C. Levesque, pour m'avoir accordé la chance de poursuivre ma maîtrise dans son laboratoire.

De plus, j'aimerais remercier les assistants de recherche, Guy Cardinal, François Sanschagrin et Esther Thériault pour leur aide dans mon cheminement pendant ma maîtrise. Je remercie aussi Dario Lehoux pour ces bons conseils, de même que les autres étudiants, soit Yves Sabbagh (mon frère), Martin Handfield, Christian Therrien, Ahmed Abdel Aziz El Zoeiby et Annie Savoie.

Je remercie aussi les correcteurs de mon mémoire de maîtrise, Dr Sylvain Moineau du département de biochimie de l'Université Laval et Dr Danielle Malo du département de médecine de l'Université McGill pour le temps qu'ils ont pris pour l'évaluation du manuscrit du mémoire.

Finalement, je voudrais spécialement remercier ma famille pour leur support et leurs encouragements durant cette période de maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

	<u>Page</u>
RÉSUMÉ	i
REMERCIEMENTS	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES FIGURES	vii

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1.1 Les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries	1
1.2 Les systèmes de transport de substances à travers les membranes	3
1.2.1 Le transport de drogues par la force motrice proton-dépendante (PMF-dépendant)	6
1.3 Les familles des pompes à résistance multiple (MDRs) PMF-dépendantes	8
1.3.1 La superfamille des pompes majeures (MFS)	8
1.3.1.1 Phylogénie et relation évolutive chez la superfamille MFS	9
1.3.1.2 Structure et fonction des protéines 12-TMS et 14-TMS	12
1.3.2 La famille des petites pompes à résistance multiple (SMR)	15
1.3.2.1 Structure et fonction des protéines de la famille SMR	17
1.3.3 La famille des protéines résistance/nodulation/division cellulaire (RND)	19
1.3.3.1 Structure et fonction des protéines de la famille RND.....	21
1.4 Les MDRs chez divers micro-organismes	22
1.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i> et le modèle d'un MDR à 14 régions transmembranaires: QacA	24
1.4.2 <i>Escherichia coli</i> et un MDR de la famille MFS: EmrB	25
1.5 Les systèmes de transport PMF-dépendant chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
1.5.1 Les MDRs chez <i>P. aeruginosa</i>	28
1.5.1.1 MexAB-OprM	28
1.5.1.2 MexCD-OprJ	28
1.5.1.3 MexEF-OprN	29
1.6 But du projet de recherche	29

CHAPITRE 2: RESULTATS ET DISCUSSION

	<u>Page</u>
2.1 Characterization of the <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>pmrAB</i> locus: A Multidrug Efflux Pump of the Major Facilitator Superfamily.....	32

CHAPITRE 3: CONCLUSION

Conclusion	73
RÉFÉRÉNCES	76

ANNEXES

ANNEXE A: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PAO1 Bacterial Artificial Chromosomes: Strategies for Mapping, Screening and Sequencing 100 kb Loci of the 5.9 Mb Genome. Microbial and Comparative Genomics. (en impression)	88
ANNEXE B: PRÉSENTATION À L'ASM (AMERICAN SOCIETY OF MICROBIOLOGY) Bacterial Genomics and Characterization of the Cell Division/Cell-Wall Biosynthesis Locus Isolated from a BAC Library of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Strain PAO1. - Mai 1997	122
ANNEXE C: PRÉSENTATION À CBDN (CANADIAN BACTERIAL DISEASES NETWORK) Bacterial Genomics and Sequencing of a 100 Kb Locus Encoding Cell Division/Cell-Wall Biosynthesis Genes from BACs of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . - Mai 1997	123
ANNEXE D: PRÉSENTATION À LA CSM (CANADIAN SOCIETY OF MICROBIOLOGISTS) Bacterial Genomics and Sequencing of a Locus Encoding Cell Division/Cell-Wall Biosynthesis Genes from a Bacterial Artificial Chromosome Library of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain PAO1. - Juin 1997	124

ANNEXE E: PRÉSENTATION À LA CSM (CANADIAN SOCIETY OF MICROBIOLOGISTS) Construction of Bacterial Artificial Chromosomes and development of a rapid method for isolation of defined regions and specific genes from the 5.9 Mb genome of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . - Juin 1997	125
ANNEXE F: PRÉSENTATION À L'ICAAC (INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY) Isolation of a 130 Kb Locus and Characterization of the Multidrug Resistance Pump <i>emrB</i> Homologue from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . - Octobre 1997	126
ANNEXE G: PRÉSENTATION À L'ACFAS (ASSOCIATION CANADIENNE-FRANÇAISE POUR L'AVANCEMENT DE LA SCIENCE) Identification de domaines homologues aux composantes régulant les gènes de virulence de <i>Bordetella pertussis</i> chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . - Mai 1998	127
ANNEXE H: PRÉSENTATION À L'ACFAS (ASSOCIATION CANADIENNE-FRANÇAISE POUR L'AVANCEMENT DE LA SCIENCE) Caractérisation d'une pompe à résistance multiple (MDR) homologue au locus <i>emrAB</i> de <i>E. coli</i> chez <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . - Mai 1998	128
ANNEXE I: PRÉSENTATION À L'ASM (AMERICAN SOCIETY OF MICROBIOLOGY) Bacterial Genomics and Isolation of Homologous Components to the <i>Bordetella pertussis</i> <i>bvgAS</i> Locus in a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Bacterial Artificial Chromosomes (BAC) Library - Mai 1998	129

LISTE DES TABLEAUX**CHAPITRE 1: INTRODUCTION**

	<u>Page</u>
TABLEAU 1: Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries	1
TABLEAU 2: Des systèmes d'efflux chez les bactéries	4
TABLEAU 3: Transporteurs secondaires chez les procaryotes	7
TABLEAU 4: Séquences consensus des motifs conservés	10
TABLEAU 5: Protéines de la famille des petites pompes à résistance multiples (SMR)	16
TABLEAU 6: Les protéines de la famille de résistance/nodulation/division cellulaire (RND)	20

LISTE DES FIGURES**CHAPITRE 1: INTRODUCTION**

	<u>Page</u>
FIGURE 1: Représentation de systèmes d'efflux à résistance multiple	6
FIGURE 2: Relation évolutive des six familles de la superfamille des pompes majeures (MFS)	9
FIGURE 3: Évolution des familles à 12- et 14-TMS de la superfamille des pompes majeures (MFS)	11
FIGURE 4: Modèles des protéines à 12- et 14-TMS dans la membrane cytoplasmique	13
FIGURE 5: Modèle de la protéine Smr chez les staphylocoques	17
FIGURE 6: Modèle des protéines de la famille de résistance/nodulation/division cellulaire (RND)	22
FIGURE 7: Modèle de la protéine QacA	25

L'usage universel de ces drogues a mené à l'apparition de nouveaux mécanismes de résistance chez les micro-organismes. Ceci a entraîné un problème majeur dans le traitement des maladies infectieuses dont la résistance multiple aux drogues. Ces différents mécanismes d'évasion des drogues (Tableau 1), acquis par les bactéries comprennent: (i) l'inactivation enzymatique ou la dégradation des drogues, (ii) le changement des sites de liaison des drogues et (iii) le pompage des substances à l'extérieur des bactéries.

(i) L'inactivation des drogues est le mécanisme principal de résistance envers les antibiotiques β -lactamines. Ce genre de résistance dirigé vers les antibiotiques, comme la pénicilline, est due aux pénicillinases. Ces enzymes catalysent l'hydrolyse de l'anneau β -lactame (Spratt, 1994; Rasmussen et Bush, 1997). Les chloramphénicols acétyles transférases (Alton et Vapnek, 1979) et les autres enzymes modifiant les aminoglycosides (Chevereau *et al.*, 1974) sont des exemples d'inactivateurs de drogues.

(ii) La résistance aux antibiotiques due à l'altération des sites de liaison de la drogue peut empêcher l'interaction ainsi que la toxicité du substrat chez la bactérie pathogène. Ces changements comprennent des substitutions d'acides aminés diminuant l'affinité au site de liaison pour son substrat. Les protéines liant la pénicilline (PBPs) peuvent contenir des mutations altérant les sites de liaison pour les pénicillines et empêchant l'activité antibactérienne. Le substrat forme un complexe irréversible avec les PBPs inhibant leur rôle dans la synthèse des peptidoglycans (Spratt, 1994). La résistance à l'érythromycine et à la tétracycline peut être due à une modification covalente des protéines ribosomales. Ceci les rend moins susceptibles à l'action de ces antibiotiques (Takata *et al.*, 1970; Speer *et al.*, 1992).

(iii) Le pompage des drogues à l'extérieur des cellules représente un autre mécanisme de résistance chez les bactéries. Les pompes diminuent les concentrations de drogues dans le cytoplasme entraînant une augmentation de la résistance aux antibiotiques (Levy, 1992). Les systèmes de pompes à résistances multiple peuvent être divisés en quatre familles en se basant sur l'assemblage moléculaire, le mécanisme d'expulsion et l'homologie en acides aminés des

séquences: (i) la superfamille des pompes majeures (MFS) (Marger et Saier Jr., 1993), (ii) la famille de résistance-nodulation-division cellulaire (RND) (Saier Jr. *et al.*, 1994), (iii) la famille des petites pompes, comme la pompe à résistance multiple des staphylocoques (SMR) (Grinius *et al.*, 1992) et (iv) la famille des transporteurs ABC [adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette] (Nikaido et Saier Jr., 1992). Chaque membre des trois premières familles est formé d'une seule protéine cytoplasmique membranaire. Ces pompes expulsent les drogues en utilisant une force motrice proton-dépendante (PMF-dépendant); en d'autres termes, jouent un rôle d'un antiporteur H^+ -substrat (Grinius *et al.*, 1992; Nikaido et Saier Jr., 1992; Marger et Saier Jr., 1993; Saier Jr. *et al.*, 1994).

1.2 Les systèmes de transport de substances à travers les membranes

Les bactéries ainsi que les cellules eucaryotes ont une grande diversité de systèmes de transport dans leurs membranes cytoplasmiques. Ces transporteurs jouent un rôle vital dans l'acquisition de nutriments essentiels, dans l'excrétion de substances toxiques et dans le maintien de l'homéostasie cellulaire (Paulsen *et al.*, 1996). Depuis quelques années, plusieurs transporteurs à drogues multiples (MDRs) ont été identifiés chez les bactéries. Ces MDRs sont des protéines membranaires reconnaissant des substances toxiques n'ayant aucune conformation structurale similaire et les exportent à l'extérieur de la cellule (Neyfakh, 1997).

Les gènes codant pour ce genre de transporteurs ont été identifiés en premier sur un plasmide de *Staphylococcus aureus* (Tennent *et al.*, 1989) et ensuite sur le chromosome de *Bacillus subtilis* (Ahmed *et al.*, 1995; Ohki et Murata, 1997), *Escherichia coli* (Lomovskaya et Lewis, 1992; Ma *et al.*, 1993), *Lactococcus lactis* (Bolhuis *et al.*, 1995; van Veen *et al.*, 1996), *Mycobacterium smegmatis* (Takiff *et al.*, 1996), *Neisseria gonorrhoeae* (Hagman *et al.*, 1995), *Pseudomonas aeruginosa* (Poole *et al.*, 1993; Kohler *et al.*, 1997), *Salmonella typhimurium* (Hongo *et al.*, 1994) et *S. aureus* (Kaatz *et al.*, 1993; Neyfakh *et al.*, 1993).

TABLEAU 2. Des systèmes d'efflux chez les bactéries.

Transporteurs	Organisme	Localisation	Substrats
La superfamille des pompes majeures (MFS) chez les Gram-positives			
TetL	Divers cocci, <i>Bacillus subtilis</i>	Plasmide	Tétracycline
Mmr	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Chromosome	Méthylénomicine
NorA	<i>Staphylococcus aureus</i>	Chromosome	Fluoroquinolones, Puromycine, Chloramphénicol
QacA	<i>S. aureus</i>	Plasmide	Ammoniums quaternaires
Bmr	<i>B. subtilis</i>	Chromosome	Fluoroquinolones, Puromycine, Chloramphénicol
La superfamille des pompes majeures (MFS) chez les Gram-négatives			
TetA	<i>Escherichia coli</i>	Plasmide	Tétracycline
CmlA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Plasmide	Chloramphénicol
EmrB	<i>E. coli</i>	Chromosome	CCCP ¹ , PMA ² , Acide nalidixique
EmrD	<i>E. coli</i>	Chromosome	CCCP ¹ , PMA ²
La famille des protéines résistance/nodulation/division cellulaire (RND)			
AcrB	<i>E. coli</i>	Chromosome	SDS ³ , Érythromycine, Tétracycline, Novobiocine
EnvD	<i>E. coli</i>	Chromosome	SDS ³ , Érythromycine, Tétracycline
MexB	<i>E. coli</i>	Chromosome	Tétracycline, Chloramphénicol, Fluoroquinolones, Pyoverdine β-lactamines
La famille des petites pompes à résistance multiple (SMR)			
Smr	<i>S. aureus</i>	Plasmide	Ammoniums quaternaires
QacE	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Plasmide	Ammoniums quaternaires
EmrE	<i>E. coli</i>	Chromosome	Methyltriphenylphosphonium

TABLEAU 2. Suite.

Transporteurs	Organisme	Localisation	Substrats
Transporteurs ABC			
MsrA	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Plasmide	Macrolides
DrrA, DrrB	<i>Streptomyces peucetius</i>	Chromosome	Daunorubicine, Doxorubicine
TlrC	<i>Streptomyces fradiae</i>	Chromosome	Tylosine

Tiré de Nikaido, H. 1994. ¹CCCP, carbonyle cyanide *m*-chlorophenylhydrazone; ²PMA, acétate phenylmercurique; ³SDS, sodium dodecylsulfate.

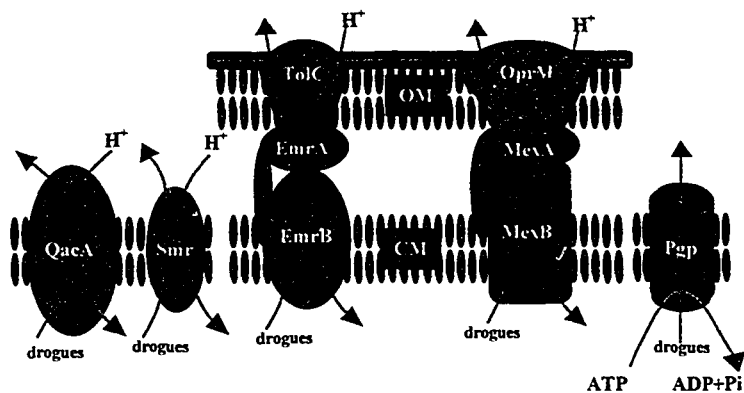


FIGURE 1. Représentation de systèmes d'efflux à résistance multiple. CM, membrane cytoplasmique; OM, membrane externe (Paulsen *et al.*, 1996).

Les pompes qui confèrent la résistance aux substances toxiques ainsi qu'aux antibiotiques dépendent d'une source d'énergie. Ces pompes peuvent être des transporteurs primaires ou secondaires (Levy, 1992; Nikaido, 1994). Un grand nombre de pompes à résistances multiple (MDRs) faisant partie des transporteurs secondaires, dépendent d'une force motrice de proton (PMF-dépendant) du gradient transmembranaire électrochimique ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) (Lomovskaya et Lewis, 1992; Grinius et Goldberg, 1994). Tandis que les transporteurs primaires emploient l'hydrolyse de l'ATP comme énergie (Gottesman et Pastan, 1993) pendant le transport de substances à travers la membrane. Les P-glycoprotéines sont un exemple de transporteurs primaires (Tableau 2; Fig. 1) (Endicott et Ling, 1989).

1.2.1 Le transport de drogues par la force motrice proton-dépendante (PMF-dépendant)

Les transporteurs secondaires constituent le plus grand groupe de système d'exportation de drogues chez les bactéries. Certains sont impliqués dans la résistance multiple alors que d'autres pompes démontrent une haute spécificité à un substrat particulier. Les membres des familles de MFS, RND et SMR font tous parties des transporteurs

secondaires (Fig. 1; Tableau 3). En plus d'être des MDRs, chacune de ces familles comprend des protéines impliquées dans différentes fonctions de transport, poussées par la PMF-dépendant. Autrement dit, ces familles ne sont pas seulement associées à l'exportation des drogues hors de la cellule bactérienne.

TABLEAU 3. Transporteurs secondaires chez les procaryotes.

Famille	TMS ^a	Protéine	Organisme
MFS	12	LmrP	<i>Lactococcus lactis</i>
		Bmr	<i>Bacillus subtilis</i>
		Blt	<i>B. Subtilis</i>
		NorA	<i>Staphylococcus aureus</i>
	14	QacA	<i>S. aureus</i>
		QacB	<i>S. aureus</i>
		EmrB	<i>Escherichia coli</i>
		LfrA	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
RND	12	AcrB	<i>E. coli</i>
		AcrE	<i>E. coli</i>
		MexB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		MexD	<i>P. aeruginosa</i>
		MexF	<i>P. aeruginosa</i>
		MtrD	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
SMR	4	QacC/Smr	<i>S. aureus</i>
		QacE	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
		EmrE	<i>E. coli</i>
	10	TehA	<i>E. coli</i>

Tiré de Bolhuis *et al.*, 1997. ^aTMS, régions transmembranaires.

Le mécanisme de transport comprend différentes composantes physico-chimiques. Le gradient transmembranaire de proton ($\Delta\mu_{H^+}$) est composé d'un gradient chimique d'ions d'hydrogène (ΔpH) et d'un gradient de charge électrique ($\Delta\Psi$). Un ou les deux des gradients ΔpH et $\Delta\Psi$ de la PMF est capable de transporter des substances à travers la membrane. Ceci dépend du système en particulier. Les protéines formant les MDRs PMF-dépendant comme

QacA et EmrB (MFS), Smr (famille SMR) et MexB (famille RND) (Tableau 3) fonctionnent probablement toutes par le mécanisme d'un échange d'un substrat pour un proton (Paulsen *et al.*, 1996). Chez les bactéries Gram-négatives, certains MDRs (EmrB et MexB) nécessitent, en plus, la fonction de protéines auxiliaires. Ces protéines appartiennent à la famille des protéines de fusion membranaire (MFP) (Dinh *et al.*, 1994; Saier Jr. *et al.*, 1994) et la famille des facteurs de la membrane externe (OMF) (Dong et Mergeay, 1994). Ces protéines auxiliaires, retrouvées souvent sur le même opéron, permettent l'exportation des drogues à travers la barrière de la membrane externe (Fig. 1).

1.3 Les familles des pompes à résistance multiple (MDRs) PMF-dépendantes

1.3.1 La superfamille des pompes majeures (MFS)

Dans la famille des MFS nous retrouvons des protéines impliquées dans le transport transmembranaire de substances chez les bactéries et les eucaryotes. Parmi les protéines identifiées nous retrouvons la lactose perméase LacY chez *E. coli* (Kaback, 1992; Kaback *et al.*, 1994) et les transporteurs de glucose GLUT chez les humains (Gould et Bell, 1990). Parmi les MFS ont été identifiés cinq groupes ou familles de transporteurs. Ceux-ci sont impliqués dans (i) la résistance aux drogues, (ii) l'importation de sucres, (iii) l'importation des intermédiaires du cycle de Krebs, (iv) les antiporteurs ester phosphate / phosphate et (v) l'importation d'oligosaccharides (Marger et Saier Jr., 1993). À l'intérieur de ces groupes nous retrouvons, en plus des MDRs, des pompes spécifiques à un substrat comme l'exporteur de la tétracycline TetB (Levy, 1992).

Les principaux MDRs appartenant aux MFS ainsi que leurs organismes et le substrat pour lequel ces protéines confèrent la résistance sont: NorA (quinolone chez *S. aureus*); TetA (tétracycline chez *E. coli*); QacA (antiseptiques chez *S. aureus*); MmrA (methylenomycin A chez *Streptomyces coelicolor*); TetE (tétracycline chez *Streptococcus pneumoniae*); EmrB (drogues multiples chez *E. coli*) et Atr-1 (aminotriazole chez *Saccharomyces cerevisiae*) (Marger et Saier Jr., 1993).

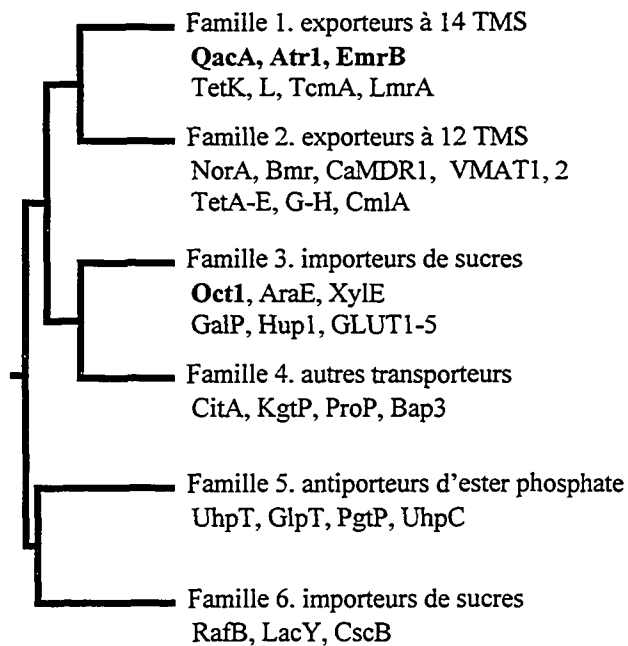


FIGURE 2. Relation évolutive des six familles de la superfamille des pompes majeures (MFS). Les systèmes d'efflux à résistance multiple sont indiqués en gras (Paulsen *et al.*, 1996).

1.3.1.1 Phylogénie et relation évolutive chez la superfamille MFS

La superfamille des MFS comprend des transporteurs de divers substances comme les drogues, les exporteurs et importeurs de sucres et d'autres substrats (Fig. 2). Les familles 3 à 6 de MFS présentées à la Figure 2 sont impliquées dans le transport de divers substances autre que les drogues. Ces protéines partagent une structure commune dont 12 régions transmembranaires (TMS) (Calamia et Manoil, 1990; Lloyd et Kadner, 1990; Hresko *et al.*, 1994). Les régions TMS ont été déduites à partir des études des profils d'hydrophobicité

ainsi que des analyses expérimentales. Par contre, les familles 1 et 2 (Fig. 2) démontrent, d'après leurs profils d'hydrophobicité, qu'ils peuvent être divisés en deux familles ayant 14- et 12-TMS (Allard et Bertrand, 1992; Paulsen *et al.*, 1996). Ces transporteurs sont impliqués dans le transport et la résistance à une multitude de drogues.

Plusieurs analyses d'alignement multiple de séquences de la superfamille des MFS en général, mais plus particulièrement les familles des 14- et 12-TMS ont démontré plus de similarités en acides aminés au niveau des séquences N-terminales que C-terminales (Griffith *et al.*, 1992; Marger et Saier Jr., 1993; Paulsen et Skurray, 1993). La majorité des motifs conservés se retrouvent aux N-terminales des protéines, bien que des similarités de séquences ont été démontrées aux C-terminales due à certains motifs conservés (Tableau 4) (Paulsen et Skurray, 1993). Ces motifs conservés sont retrouvés seulement parmi la famille des 12- ou 14-TMS. D'autres motifs conservés se retrouvent chez les deux familles (Tableau 4) (Paulsen et Skurray, 1993).

TABLEAU 4. Séquences consensus des motifs conservés.

Motif	Localisation	Séquence consensus
Motifs communs aux deux familles		
A	Entre les TMS ^a 2 et 3	GXLXDrXGrR-KXXIL
B	TMS 4	LiXXRXIqGXXXA
C	À la fin de TMS 5	GXXXGPXiGG
Motifs spécifiques à la famille des 14-TMS		
D1	À la fin de TMS 1	LdXtvlvalp
E	TMS 7	DXXGXXL
F	TMS 13	LGXXXGiAvIGXI
Motifs spécifiques à la famille des 12-TMS		
D2	À la fin de TMS 1	GiglxxPvlp

Tiré de Paulsen et Skurray, 1993. ^aTMS, régions transmembranaires. X, représente n'importe quel acide aminé et les lettres en minuscules représentent des séquences moins fréquentes.

Un modèle de l'évolution des protéines qui confèrent la résistance chez les bactéries a été proposé par Paulsen et Skurray (1993) pour les familles des 12- et 14-TMS (Fig. 3). Chez la famille des 12-TMS il existe une similarité significative en acides aminés parmi les six portions transmembranaires du N- et C-terminale de ces protéines. Ces observations ont mené Levy (1992) à suggérer que les similarités internes entre ces protéines étaient dues à une répétition provenant d'une protéine ancestrale ayant six domaines transmembranaires (Fig. 3). Une duplication génique codant pour les motifs de la portion N-terminale a été reconnue due à une séquence partiellement conservée dans la portion C-terminale de la protéine. Le motif G (GPLig) du C-terminale semble être une duplication du motif C (GPXiG) de la région N-terminale de la protéine (Tableau 4).

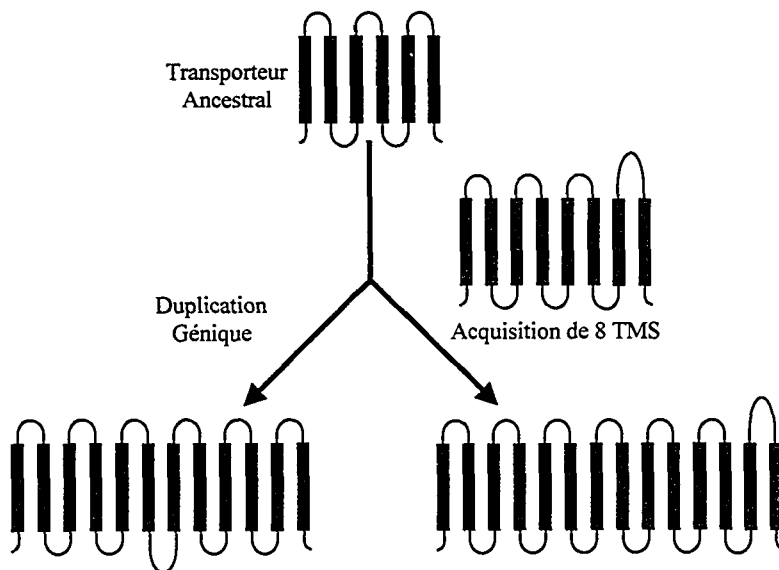


FIGURE 3. Représentation de l'évolution des familles à 12- et 14-TMS des protéines de la superfamille des pompes majeures (MFS). TMS, régions transmembranaires (Paulsen et Skurray, 1993).

Ce genre de duplication de gène a déjà été suggéré pour d'autres genres de transporteurs comme les importeurs d'arabinose et de xylose chez *E. coli* (Maiden *et al.*, 1987). Ces études proposent qu'il s'agit vraiment d'une protéine ancestrale à six régions transmembranaires qui est à l'origine de la famille des 12-TMS. De plus, la famille des 14-TMS semble avoir évolué de la même protéine ancestrale à 6-TMS. Ceci est basé sur les homologies de séquence que nous retrouvons dans la portion N-terminale de la protéine des familles des 12- et 14-TMS. Par contre, cette dernière famille ne semble pas être à l'origine d'une duplication de gène. Cette conclusion est basée sur l'absence d'homologie significative entre les portions N- et C-terminales des protéines appartenant à la famille des 14-TMS.

Une des hypothèses émise expliquant l'évolution de la famille des 14-TMS propose que la protéine ancestrale à 6-TMS aurait acquis huit autres régions transmembranaires d'une source inconnue (Paulsen et Skurray, 1993). L'alternative plausible serait qu'il y a eu duplication du gène codant pour les six TMS de la protéine ancestrale et une évolution divergente significative serait produite au niveau de la portion C-terminale de la protéine. C'est au cours de l'évolution que la protéine aurait acquis deux autres régions transmembranaires (Fig. 3).

1.3.1.2 Structure et fonction des protéines 12-TMS et 14-TMS

Les familles des 12- et 14-TMS contiennent plusieurs protéines qui confèrent la résistance aux drogues. Ceux-ci comprennent aussi des MDRs ainsi que certaines protéines ayant des fonctions qui sont toujours inconnues. Une des protéines qui a été la mieux caractérisée a déjà été purifiée et reconstituée comme le transporteur de la tétracycline. Ceci a permis de démontrer une fonction d'un transporteur de type antiporteur ayant un potentiel transmembranaire neutre capable de catalyser l'échange du complexe tétracycline-cation-métallique-divalent avec un proton (Hickman *et al.*, 1990; Someya *et al.*, 1995; Aldema *et al.*, 1996). Plusieurs transporteurs des autres familles des MFS ont aussi été purifiés et reconstitués *in vitro*, puis caractérisés en détail comme: LacY chez *E. coli* (Newman *et al.*, 1981), PgtP (Varadhachary et Maloney, 1991) et UhpT (Ambudkar *et al.*, 1990). Ces études

ont démontré que ces protéines transportent simultanément deux molécules différentes dans la même direction (transporteurs de type symport) dont H^+ /lactose, H^+ /phosphoglycerate et H^+ /phosphate de sucre, respectivement (Fig. 2).

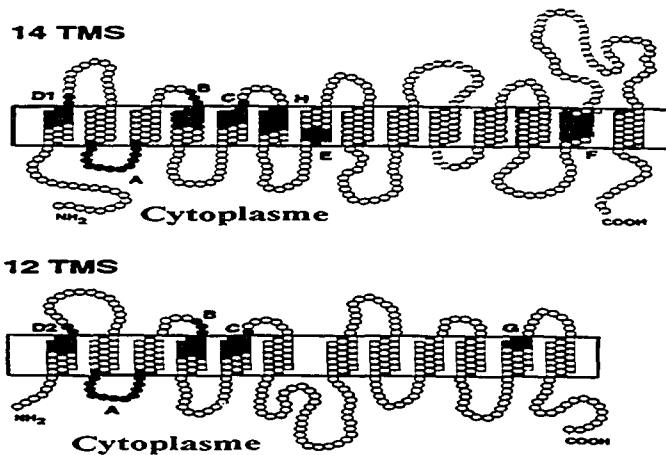


FIGURE 4. Modèles représentatifs des protéines des familles à 12- et 14-TMS dans la membrane cytoplasmique. La localisation des motifs conservés sont indiqués en noir et désignés par une lettre représentant chaque motif (Paulsen *et al.*, 1996).

Des modèles représentant les protéines des familles des 12- et 14-TMS ont été proposés ainsi que la localisation des motifs conservés en acides aminés uniques pour chaque famille ou commun chez les deux (Fig. 4). Le fait que ces motifs conservés existent parmi les transporteurs spécifiques à divers substrats, ainsi que chez les MDRs, suggère qu'ils peuvent jouer un rôle commun essentiel dans la structure et la fonction chez ces protéines (Griffith *et al.*, 1992; Paulsen et Skurray, 1993). Les trois caractéristiques qui sont probablement nécessaire au fonctionnement des pompes antiporteurs ont été proposées par Yamaguchi *et al.* (1991): (i) un site d'amorçage liant les substrats ayant une affinité faible ou forte; (ii) un mécanisme à barrière pouvant s'ouvrir et se refermer suite à une interaction avec le substrat

et un proton; (iii) un site de transfert de H^+ qui affecte l'affinité du site de liaison suite à un gain ou une perte d'un proton.

Le motif A localisé dans la boucle cytoplasmique entre les TMS 2 et 3 (Fig. 4) est conservé non seulement chez les familles des 12- et 14-TMS mais aussi parmi quatre autres familles des MFS (familles 3 à 6 de la Figure 2) (Marger et Saier, Jr., 1993; Paulsen et Skurray, 1993). Puisque le motif se retrouve dans une boucle à caractère hydrophile il a été suggéré, suite à des études de mutagenèse, que cette région est impliquée dans un changement conformationnel réversible nécessaire à l'ouverture et à la fermeture du transporteur (Yamaguchi *et al.*, 1990).

Le motif B conservé parmi les familles des 12- et 14-TMS ainsi que la famille 3 des MFS (Fig. 2) se situe dans la TMS 4 chez les protéines de ces familles (Fig. 4). Des études approfondies n'ont pas été effectuées pour ce motif mais la présence d'une arginine conservée indique qu'il pourrait jouer un rôle dans le transfert de proton (Paulsen et Skurray, 1993). Le motif C est situé dans la TMS 5 (Fig. 4) des transporteurs des familles 12- et 14-TMS seulement. Ceci suggère que cette région peut être impliquée dans la translocation d'un proton des exporteurs plutôt que les importeurs de substances (Fig. 2) (Griffith *et al.*, 1992; Paulsen et Skurray, 1993).

Le motif D, retrouvé aussi seulement parmi les familles des 12- et 14-TMS, est localisé dans la TMS1 (Fig. 4). Par contre, il existe une certaine différence dans les séquences de ce motif retrouvées chez les deux familles (Tableau 4) (Paulsen et Skurray, 1993). Le rôle de ce motif n'a pas été étudié ainsi que le rôle des motifs E, F et H retrouvés seulement parmi la famille des 14-TMS. Le motif G, conservé seulement parmi la famille des 12-TMS, correspond probablement à une duplication de la région du C-terminale du motif C (Paulsen et Skurray, 1993), mentionné dans la section précédente. Par contre, si ce motif joue un rôle semblable à celui du motif C, ceci reste à être déterminé.

Comme il a été mentionné auparavant, des alignements en acides aminés de séquences multiples entre les familles des 12- et 14-TMS indiquent l'existence d'une plus grande similarité parmi les régions N-terminales des protéines par rapport aux régions C-terminales. En tenant compte du fait que les protéines de la famille des MFS reconnaissent une grande variété de substrats, une hypothèse a été émise et suggère que les régions C-terminales sont principalement impliquées dans la spécificité du substrat chez les transporteurs de la famille des MFS. De plus, les régions N-terminales sont principalement impliquées dans la translocation de proton (Rouch *et al.*, 1990; Griffith *et al.*, 1992).

1.3.2 La famille des petites pompes à résistance multiple (SMR)

La famille des SMRs constitue la deuxième famille ayant des pompes à résistance multiple PMF-dépendant (Tableau 5) (Midgley, 1986; Grinius *et al.*, 1992; Littlejohn *et al.*, 1992). Certains membres de cette famille sont impliqués dans le transport de plusieurs cations lipophiliques (Grinius *et al.*, 1992; Paulsen *et al.*, 1993). D'autres membres de cette famille des SMRs suppriment des mutations chez les protéines chaperones (Tableau 5) (Greener *et al.*, 1993). Les protéines de la famille des SMRs ne démontrent aucune homologie avec les protéines des familles MFSs et RNDs. Elles consistent en petites pompes à quatre régions transmembranaires (TMS) contenant environ 110 acides aminés (Fig. 5).

Parmi les MDRs de la famille des SMRs, les protéines QacC, Ebr ou Smr des staphylocoques ont été les mieux caractérisées (Lyons et Skurray, 1987; Sasatsu *et al.*, 1989; Littlejohn *et al.*, 1991; Grinius *et al.*, 1992). Le gène codant pour cette MDR a été retrouvé sur plusieurs plasmides d'isolats cliniques de *S. aureus* et chez d'autres staphylocoques (Littlejohn *et al.*, 1992; Leelapom *et al.*, 1994). Chez *E. coli* d'autres MDRs, à médiation chromosomique, ont été identifiés, dont Ebr ou MvrC et EmrE (Tableau 5) (Purewal, 1991; Morimyo *et al.*, 1992; Lewis, 1994). La protéine QacE du gène *qacE* codé par le plasmide R751 chez *Klebsiella aerogenes* (Paulsen *et al.*, 1993) ainsi qu'un dérivé semifonctionnel, *qacEΔ1* (Stokes et Hall, 1989; Paulsen *et al.*, 1993) appartiennent aussi à la famille des SMRs (Tableau 5). Ce dernier est retrouvé chez plusieurs bactéries Gram-négatives puisqu'il

est localisé dans la région 3' conservé de plusieurs intégrons.

TABLEAU 5. Protéines de la famille des petites pompes à résistance multiple (SMR).

Protéine	Fonction	Organisme
Protéines de transport		
QacC / Smr / Ebr	Efflux de cations lipophiliques	<i>Staphylococcus aureus</i>
Ebr / MvrC / EmrE	Efflux de cations lipophiliques	<i>Escherichia coli</i>
QacE	Efflux de cations lipophiliques	<i>Klebsiella aerogenes</i>
QacEA1	Dérivé semi-fonctionnel de QacE	Bactéries Gram-négatives
Protéines Sug		
SugES	Suppresseur de mutations des gènes des chaperonines moléculaires	<i>E. coli</i>
Sug	Homologue de SugES	<i>Proteus vulgaris</i>
Sug	Homologue de SugES	<i>Citrobacter freundii</i>
SocX	Inconnue	<i>Myxococcus xanthus</i>
BaOrf6	Inconnue	<i>Bacillus subtilis</i>

Tiré de Paulsen *et al.*, 1996.

L'autre moitié de la famille des SMRs comprend le produit du locus chromosomique SugE chez *E. coli*. Apparemment la protéine est capable de supprimer phénotypiquement les mutations dans le gène *groE* codant pour une chaperonine moléculaire (Greener *et al.*, 1993). Des homologues à SugE ont été identifiés (Tableau 5) chez *Proteus vulgaris* (Cole, 1987), *Myxococcus xanthus* (Paulsen *et al.*, 1993), *Citrobacter freundii* (Bishop et Weiner, données non-publiées) et *B. subtilis* (Paulsen *et al.*, 1996). Chez *E. coli* la protéine TehA confère la résistance au tellurite (Walter *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 1994). Cette protéine de 330 acides aminés est bien plus grande que les protéines typiques de la famille des SMRs. Par contre, une région de TehA démontre une similarité significative de séquences avec les protéines de cette famille. Elle semble aussi avoir une fonction semblable puisqu'elle confère la résistance à divers cations organiques (Turner et Weiner, données non-publiées). Ceci peut suggérer que

la protéine TshA ait une relation évolutive éloignée avec la famille des protéines SMRs (Paulsen *et al.*, 1996).

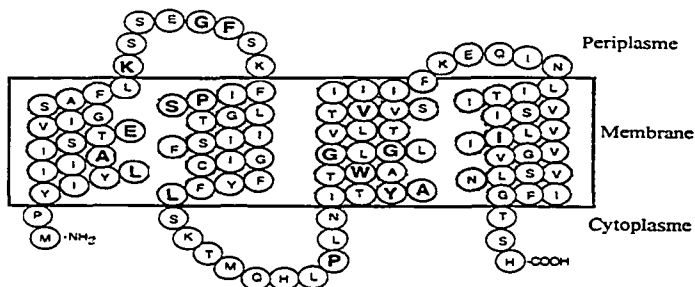


FIGURE 5. Modèle proposé de la protéine Smr chez les staphylocoques. Les acides aminés conservés, parmi les protéines de la famille des petites pompes à résistance multiple (SMR), sont indiqués en caractère gras (Paulsen *et al.*, 1996).

1.3.2.1 Structure et fonction des protéines de la famille SMR

Les protéines de la famille des SMRs sont très petites comparées aux protéines des autres familles PMF-dépendants, spécialement concernant les MDRs. Il a été suggéré qu'ils puissent fonctionner en complexe d'oligomères (Paulsen *et al.*, 1993). Maloney (1994) propose que l'unité minimale active des transporteurs transmembranaires consiste en un centre à caractère hydrophobe d'environ 12-TMS. Les antiporteurs ATP/ADP, dans les mitochondries, contiennent seulement 6 TMS (Aquilla *et al.*, 1987) et semblent fonctionner en homodimères. Dernièrement, des expériences ont établi que les MDRs chez les staphylocoques fonctionnent comme des transporteurs indépendants (Grinius et Goldberg, 1994).

D'autres expériences, sur des protéines purifiées et reconstituées (Smr et EmrE), démontrent que ces pompes sont PMF-dépendantes. Elles emploient probablement le mécanisme d'antiporteur où il y a un échange de drogue pour un proton (Grinius et Goldberg, 1994; Yerushalmi *et al.*, 1995). Comme chez les autres familles, les MDRs de la famille des

SMRs transportent plusieurs substrats qui partagent des propriétés physiques semblables mais n'ont aucune conformation structurale commune. Il est probable que certains acides aminés conservés contribuent à la flexibilité des sites de liaison du substrat dans les pompes type SMR (Paulsen *et al.*, 1996).

Parmi les acides aminés conservés il semble que Glu-13 dans la protéine Smr, est essentiel durant l'échange d'un proton pour une drogue (Fig. 5) (Grinius et Goldberg, 1994; Paulsen *et al.*, 1996). Paulsen *et al.* (1996a) ont proposé un modèle pour le transport de substances chez les protéines SMR. Leurs observations démontrent que les trois premières TMS sont amphipatiques avec plusieurs résidus de glutamate, sérine, tyrosine et tryptophane, retrouvés sur le côté polaire de ces hélices (Fig. 5). Ces résidus peuvent former une partie des régions transmembranaires impliqués dans le passage des protons et des drogues. Il y a aussi la possibilité que les chaînes latérales des résidus conservés Tyr-59 et Trp-62 (Smr; Fig. 5), interagissent directement avec les régions hydrophobes des substrats ce qui facilite le transport à travers la membrane (Paulsen *et al.*, 1996). Ce genre de transport transmembranaire ressemble au mécanisme suggéré pour les MDRs de mammifère type P-glycoprotéine (Pawagi *et al.*, 1994; Paulsen *et al.*, 1995).

Il a été démontré que la P-glycoprotéine transporte et confère la résistance à plusieurs classes de substances hydrophobes et peptides cytotoxiques (Sarkadi *et al.*, 1994). Donc, il y a la possibilité que cet MDR soit impliqué dans le transport de défensines, des petits peptides cationiques hydrophobes jouant un rôle dans la défense chez l'hôte (Kagan *et al.*, 1994). Certaines caractéristiques physiques (charge et lipophilicité) des défensines ressemblent à des substrats typiques des protéines de la famille des SMRs (Paulsen *et al.*, 1996). Si les MDRs sont capables de transporter ces peptides cationiques, les bactéries seront donc capables de se protéger contre les peptides toxiques sécrétées par l'hôte.

Les chaperonines moléculaires GroEL-GroES semblent jouer un rôle dans la dégradation des protéines chez *E. coli* (Kandron *et al.*, 1994). Par ce mécanisme, les cellules sont donc capables d'éliminer des peptides endommagés, puisque l'accumulation de ces

peptides peut être létale à l'organisme. Si les protéines de la famille SMR sont impliquées dans le transport de peptides toxiques, nous pourrions spéculer qu'ils sont capables de transporter des peptides ayant un mauvais repliement (Grinius *et al.*, 1996). Ainsi, une relation entre la fonction des protéines chaperonines et la fonction des SMRs pourra être établie.

1.3.3 La famille des protéines résistance/nodulation/division cellulaire (RND)

Une troisième famille de MDR PMF-dépendant a été identifiée et désignée RND (Tableau 6) (Dinh *et al.*, 1994; Saier, Jr., *et al.*, 1994). Les protéines appartenant à cette famille sont retrouvées en majorité chez les bactéries Gram-négatives. Ces protéines fonctionnent probablement comme les exporteurs proton-dépendants, traversant la membrane cytoplasmique (Saier, Jr., *et al.*, 1994). Cependant, il y a des preuves directes pour plusieurs membres identifiés de cette famille, qu'ils confèrent un transport PMF-dépendant (Nies *et al.*, 1989; Ma *et al.*, 1993; Poole *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1994).

La famille RND comprend des protéines dont plusieurs sont des pompes à résistance multiple: AcrB et AcrF chez *E. coli* (Ma *et al.*, 1993; Ma *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1994), MexB et MexD ainsi que MexE, découvertes récemment, chez *P. aeruginosa* (Poole *et al.*, 1996; Poole *et al.*, 1996a; Köhler *et al.*, 1997) et MtrD chez *Neisseria gonorrhoeae* (Pan et Spratt, 1994; Hagman *et al.*, 1995). Ces MDRs semblent avoir en commun un large spectre de spécificité de substrats (Tableau 6). D'autres membres de cette famille comprennent les exporteurs de métaux-lourds ioniques chez *Alcaligenes*: CzcA (Nies *et al.*, 1989), CnrA (Liesegang *et al.*, 1993) et NccA (Schmidt et Schlegel, 1994). Chez *Rhizobium meliloti*, le système NolGHI appartient à la famille RND et peut exporter des oligosaccharides impliqués dans la signalisation cellulaire durant la nodulation (Baer *et al.*, 1991).

TABLEAU 6. Les protéines de la famille de résistance/nodulation/division cellulaire (RND).

Protéine RND	Protéine MFP ^a	Protéine OMF ^b	Organisme
Pompes à résistance multiple			
AcrB	AcrA	TolC(?)	<i>Escherichia coli</i>
AcrF	AcrE		<i>E. coli</i>
MexB	MexA	OprM	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
MexD	MexC	OprJ	<i>P. aeruginosa</i>
MexF	MexE	OprN	<i>P. aeruginosa</i>
MtrD	MtrC	MtrE	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
YhiV	YhiU		<i>E. coli</i>
Autres protéines de résistance			
CnrA	CnrB		<i>Alcaligenes eutrophus</i>
CzcA	CzcB		<i>A. eutrophus</i>
NccA	NccB		<i>A. xylooxidans</i>
NolGHI	NolF		<i>Rhizobium meliloti</i>

Tiré de Paulsen *et al.*, 1996. ^aMFP, protéines de fusion membranaire; ^bOMF, facteurs de la membrane externe.

Les gènes codant pour les protéines de la famille RND chez les bactéries Gram-négatives sont souvent associés avec des gènes codants pour des protéines appartenant à la famille MFP et souvent font partie d'un même opéron (Dinh *et al.*, 1994; Saier, Jr., *et al.*, 1994). Certains travaux suggèrent que les protéines RND et MFP fonctionnent ensemble, permettant le transport de drogues à travers les membranes cytoplasmiques et périplasmiques des bactéries Gram-négatives (Fig. 1) (Lewis, 1994; Ma *et al.*, 1994; Nikaido, 1996). Les protéines MFP sont aussi associées avec d'autres protéines, comme les transporteurs ABC et MFS et jouant un rôle similaire (Dinh *et al.*, 1994). Chez les bactéries Gram-positives les protéines RND ne sont pas associées avec des protéines MFP (Paulsen *et al.*, 1996).

Des analyses de comparaison de séquences démontrent que les régions N- et C-terminales des protéines RND partagent une similarité de séquences (Saier, Jr., *et al.*, 1994). Ceci suggère que ces protéines ont évolué à partir d'une duplication intragénique en tandem, similaire aux protéines de la famille MFS. Donc, les protéines RND semblent avoir évoluées à partir d'une protéine ancestrale ayant six régions transmembranaires (Paulsen *et al.*, 1996).

1.3.3.1 Structure et fonction des protéines de la famille RND

Une représentation schématique des protéines de la famille RND a été proposée, basée sur des alignements de séquences ainsi que des analyses des profils d'hydrophobicité (Saier, Jr., *et al.*, 1994). Ces protéines consistent en 12 régions transmembranaires ayant deux larges boucles externes situées entre les TMS 1 et 2 et entre les TMS 7 et 8 (Fig. 6). Ce modèle démontre une duplication des régions N- et C- terminales des protéines RND. À partir de ces alignements de séquences, quatre motifs conservés ont été identifiés; les motifs A, B, C (Saier, Jr., *et al.*, 1994) et récemment le motif conservé D a été identifié par Paulsen *et al.* (1996) (Fig. 6). Le rôle de ces motifs n'a pas encore été déterminé, mais puisqu'ils sont conservés parmi les protéines RND, il a été suggéré qu'ils peuvent jouer un rôle structural et fonctionnel essentiel chez ces protéines (Paulsen *et al.*, 1996).

Dans certains cas, les transporteurs RND semblent fonctionner avec deux autres composantes, les protéines MFP et OMF. Ces protéines sont responsables du transport de substances à travers les deux membranes de la cellule (Fig. 1). Les protéines MFP et dans certains cas les protéines OMF, fonctionnent ensemble avec les transporteurs des familles MFS ou ABC. Par exemple, la protéine OMF TolC est nécessaire à l'exportation de l'hémolysine par HlyB et HlyD chez *E. coli* (Wandersman et Deleplaire, 1990) et OprM est impliquée dans le transport de plusieurs drogues de concert avec les protéines MexA et MexB chez *P. aeruginosa* (Poole *et al.*, 1993).

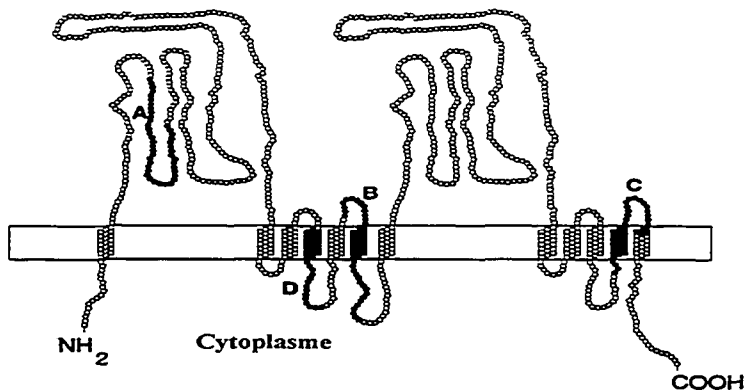


FIGURE 6. Modèles représentatifs des protéines de la famille de résistance/nodulation/division cellulaire (RND) dans la membrane cytoplasmique. Les motifs conservés sont indiqués en noire et désignés par une lettre représentant chaque motif (Paulsen *et al.*, 1996).

Aucune protéine RND n'a été purifiée et reconstituée; il n'a pas été démontré que les protéines RND soient vraiment des transporteurs PMF-dépendant. Cependant, des études génétiques ainsi que des preuves biochimiques (Paulsen *et al.*, 1996), supportent l'idée que ces protéines fonctionnent comme un système d'expulsion PMF-dépendant. Les MDRs identifiés, de la famille RND, font preuve d'un plus large spectre de spécificité de substrats que les pompes des familles MFS ou SMR (Paulsen *et al.*, 1996). Comme ces deux dernières familles, il n'existe aucune base moléculaire concernant la reconnaissance des substrats dans les pompes RND.

1.4 Les MDRs chez divers micro-organismes

Les pompes à résistance multiple sont retrouvées chez les bactéries Gram-négatives ainsi que les bactéries Gram-positives. Par contre, les bactéries Gram-négatives semblent être plus résistantes aux inhibiteurs lipophiliques et amphiphiliques. Nous retrouvons aussi des

MDRs chez quelques parasites et chez les levures. Chez ces organismes certaines pompes sont des transporteurs ATP-dépendant comme les P-glycoprotéines des mammifères codées par le gène *mdr1* (Endicott et Ling, 1989; Gottesman et Pastan, 1993).

Des homologues de *mdr* ont été retrouvés chez *Plasmodium falciparum* (Foote *et al.*, 1989), *Entamoeba histolytica* (Samuelson *et al.*, 1992) et *Schizosaccharomyces pombe* (Nishi *et al.*, 1992). Les MDRs chez ces parasites démontrent des résistances aux agents contre le paludisme, comme l'iodoquinol et l'émétine, et la léptomycine B. Des analyses de séquences ont permis aussi l'identification de plusieurs homologues de *mdr*, chez *Arabidopsis thaliana*, *E. coli*, *H. influenzae*, *S. cerevisiae*, *S. aureus* et *Xenopus laevis* (Dudler et Hertig, 1992; Allikmets *et al.*, 1993; Castillo *et al.*, 1995; Henze et Berger-Bachi, 1995).

Des MDRs PMF-dépendant sont aussi retrouvés chez divers micro-organismes. En plus du transport de drogues et substances toxiques ces pompes possèdent des rôles physiologiques importants. Chez *P. aeruginosa* les opérons des MDRs isolés et caractérisés sont *mexAB/oprM* (Poole *et al.*, 1993), *mexCD/oprJ* (Poole *et al.*, 1996) et *mexEF/oprN* (Köhler *et al.*, 1997). Le gène *ptr* chez *Streptomyces pristinaespiralis* confère la résistance à des antibiotiques ayant des conformations structurales différentes (Blanc *et al.*, 1995). Deux MDRs homologues sont Bmr et Blt chez *Bacillus subtilis* (Ahmed *et al.*, 1995) et NorA chez *S. aureus* (Neyfakh *et al.*, 1993). Les pompes chez ces micro-organismes confèrent la résistance aux antibiotiques fluoroquinolones et à plusieurs cations monovalents et bivalents organiques.

D'autres gènes, comme *qacA*, *qacB* et *smr* codant pour des MDRs, sont retrouvés chez *S. aureus*. Ces gènes sont localisés sur le chromosome, contrairement aux gènes *qacE* et *qacEΔ1* retrouvés sur des plasmides. Bien que les gènes *qac* ont peut être eu un rôle physiologique chez les cellules hôtes, ils semblent avoir été acquis par des pathogènes cliniques pour se protéger contre des agents antimicrobiens organiques hydrophobes (Paulsen *et al.*, 1996). Chez *E. coli* nous retrouvons aussi des systèmes de transport de plusieurs drogues, telle que AcrAB (Ma *et al.*, 1995), EmrAB (Lomovskaya et Lewis, 1992), EmrD

(Naraditskaya *et al.*, 1993) et EmrE (Yerulshalmi *et al.*, 1995). La majorité de ces pompes confèrent une résistance à divers inhibiteurs hydrophobes. Il existe aussi des MDRs PMF-dépendant chez *Neisseria gonorrhoea* (Hagman *et al.*, 1995) et *Candida albicans* (Becker *et al.*, 1995), comme les systèmes de transport MtrCDE et CaMDR1, respectivement.

1.4.1 *Staphylococcus aureus* et le modèle d'un MDR à 14 régions transmembranaires: QacA

De tous les transporteurs à résistances multiple PMF dépendantes, *qacA* chez *S. aureus* fut le premier gène à être caractérisé et séquencé. (Rouch *et al.*, 1990; Littlejohn *et al.*, 1992). Cet MDR donne une résistance à des cations organiques incluant les cations monovalents comme l'éthidium, le benzalkonium et le cetrimide. Il confère aussi la résistance à des cations bivalents, comme la chlorhexidine et la pentamidine (Littlejohn *et al.*, 1992). Des expériences mesurant les niveaux de transports de divers substrats ont démontré que *qacA* confère la résistance au bromure d'éthidium et à d'autres cations organiques en utilisant la force motrice proton-dépendante comme source d'énergie (Paulsen *et al.*, 1996).

Parmi la famille MFS, QacA représente la première protéine de transport transmembranaire, qui contient 14 régions transmembranaires (TMS). La structure de cette protéine et l'organisation transmembranaire ont été élucidées par des fusions de protéines avec l'alkaline phosphatase et la β -galactosidase (Paulsen *et al.*, 1996). La famille MFS contient 5 groupes de transporteurs divisés en six familles (Fig. 2). En premier, les familles 14- et 12-TMS ont été considérées des transporteurs ayant seulement 12 TMS. En générale, les transporteurs secondaires ont 12 TMS, soit en deux séries de 6 TMS chacun (Maloney, 1994). De plus, un membre représentatif de chacun des 5 groupes de MFS a démontré qu'ils contiennent 12 TMS (Calamia et Manoil, 1990; Lloyd et Kadner, 1990; Allard et Bertrand, 1993; Hresko *et al.*, 1994).

Des analyses de profils d'hydrophobicité et des séquences en acides aminés des transporteurs formant les premiers groupes de la famille des MFSs suggèrent que ce groupe comprend en fait deux familles (Paulsen et Skurray, 1993). Ces familles séparées comprennent des protéines exporteurs contenant 12 et 14 TMS. Le modèle représentant QacA avec ces 14 TMS (Fig. 7) a été basé sur des études de fusions de protéines (Paulsen *et al.*, 1996). La famille 1 inclut des exporteurs à 14 TMS représentée par QacA et les familles 2 à 6 représentant les protéines ayant 12 TMS (Fig. 2).

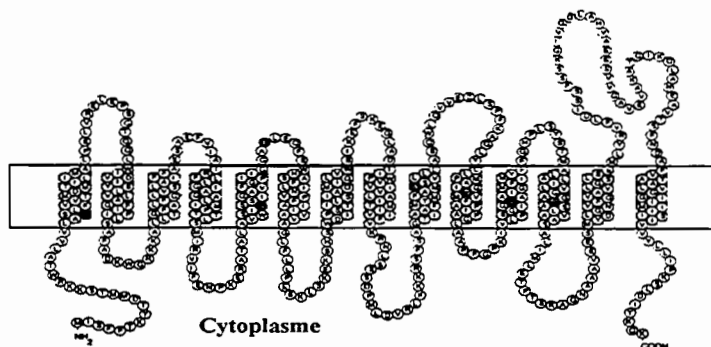


FIGURE 7. Modèle de la protéine QacA, chez *Staphylococcus aureus*, dans la membrane cytoplasmique (Paulsen *et al.*, 1996).

1.4.2 *Escherichia coli* et un MDR de la famille MFS: EmrAB

Le locus *emrAB* chez *E. coli* code pour deux protéines impliquées dans le transport de substances hydrophobes incluant les découpleurs de la phosphorylation oxydative. Il a été démontré que des cellules contenant un plasmide à haute copie contenant les gènes *emrA* et *emrB* sont plus résistantes aux découpleurs carbonyle cyanide *m*-chlorophenylhydrazine (CCCP), au 2-chlorohydrazine (CHH) et au tétrachlorosalicylanilide (TSA). En plus, une diminution de la sensibilité à l'acétate phenylmercurique (PMA) et l'antibiotique l'acide nalidixique a été observée (Lomovskaya et Lewis, 1992). Les protéines EmrA et EmrB

appartiennent aux familles des protéines de fusion membranaire (MFP) (Dinh *et al.*, 1994) et MFS (Marger et Saier, 1993), respectivement.

Des preuves indirectes ont suggéré que les protéines EmrA et EmrB fonctionnent ensemble. EmrB transporterait probablement les drogues à travers la membrane cytoplasmique chez *E. coli*, et EmrA à travers la membrane extracellulaire (Fig. 1) (Lomovskaya et Lewis, 1992; Lewis, 1994). Ces deux protéines pourraient fonctionner en coopération avec des protéines de la famille OMF (Paulsen *et al.*, 1997), de la même façon que les protéines de la famille des RND chez les bactéries Gram-négatives. La protéine EmrB a été le premier transporteur transmembranaire d'une espèce Gram-négative à être identifié et semble appartenir à la famille des MFSs. Auparavant, cette famille comprenait seulement des MDRs de bactéries Gram-positives (Lomovskaya et Lewis, 1992).

Une caractéristique importante des protéines EmrA et EmrB est qu'elles confèrent seulement la résistance à des substrats hydrophobes. Ces protéines protègent la cellule bactérienne contre l'antibiotique l'acide nalidixique mais non pas contre des analogues hydrophiles comme le norfloxacine (Lomovskaya et Lewis, 1992). Par contre, le spectre de résistance des espèces Gram-positives ayant la protéine NorA ou Bmr, démontre le contraire. Certains inducteurs de l'expression du locus *emr* comprennent des substrats de EmrB, tels le CCCP et l'acide nalidixique, mais aussi des substrats qui ne sont pas transportés par EmrB, tels le bromure d'éthidium (Lomovskaya *et al.*, 1995).

Il a été démontré que le gène régulateur (*emrR*) adjacent au locus *emrAB*, est orienté dans la même direction et fait partie du même opéron. En plus, il contrôle l'expression du locus par une régulation négative (Lomovskaya *et al.*, 1995). EmrR partage des similarités de séquences avec une famille de régulateurs transcriptionnels, incluant MarR. Ce dernier régule le locus *mar* (multi-antibiotic-resistance) (Cohen *et al.*, 1993).

1.5 Les systèmes de transport PMF-dépendant chez *Pseudomonas aeruginosa*

Il est connu que la majorité des souches chez *P. aeruginosa* démontrent un niveau significatif de résistance inhérente à une grande variété d'agents antimicrobiens. Ceux-ci comprennent la majorité des antibiotiques β -lactamines, les tétracyclines, le chloramphénicol et les fluoroquinolones. La membrane externe chez *P. aeruginosa* possède une très faible perméabilité non-spécifique à des petites molécules hydrophiles (Angus *et al.*, 1982; Yoshimura et Nikaido, 1982). Ces observations suggèrent que la cause principale de résistance chez cet organisme est due à la nature de sa membrane extracellulaire.

P. aeruginosa démontre une résistance à plusieurs agents, comme la tétracycline, le chloramphénicol et les fluoroquinolones. Cependant, des études ont démontrées que des pompes sont responsables de la résistance à ces antibiotiques chez *P. aeruginosa*. (Li *et al.*, 1994).

Parmi la famille MFS, plus précisément la famille des 12-TMS, deux transporteurs ont été identifiés chez *P. aeruginosa*. Il a été démontré que les protéines CmlA (Bissonnette *et al.*, 1991) et TetC (Pedon, 1983), confèrent la résistance au chloramphénicol et à la tétracycline par un système d'efflux. Ces transporteurs transmembranaires sont spécifiques pour un substrat. Par contre, trois MDRs ont été isolés chez *P. aeruginosa*, où chacun contient trois composantes ou protéines nécessaires au transport de drogues à travers les deux membranes cellulaires.

Les trois MDRs chez *P. aeruginosa* sont codées par les opérons *mexA-mexB-oprM* (Poole *et al.*, 1996), *mexC-mexD-oprJ* (Poole *et al.*, 1996) et *mexE-mexF-oprN* (Köhler *et al.*, 1997) et sont les seuls gènes de MDR à être isolés chez *P. aeruginosa*. Parmi la famille MFS aucun MDR n'a été identifié chez cet organisme, seulement parmi la famille RND. De plus, aucune pompe appartenant à la famille SMR n'a été identifiée chez *P. aeruginosa*, jusqu'à présent.

Chaque pompe comprend une composante soit MexB, MexD et MexF, traversant la membrane intrinsèque (12 TMS). Ces protéines appartiennent à la famille des exporteurs RND (Nies, 1995; Saier, Jr. *et al.*, 1994). La deuxième protéine de fusion membranaire (MexA, MexC et MexE) est nécessaire à l'association de l'exporteur RND avec la composante de la membrane externe (Ma *et al.*, 1994; Nikaido, 1994). Cette dernière protéine de la membrane externe, soit OprM, OprJ ou OprN forme apparemment un canal afin d'assurer le transport des drogues à travers la membrane périsplasmique vers l'environnement externe (Fig. 1) (Paulsen *et al.*, 1997).

1.5.1 Les MDRs chez *P. aeruginosa*

1.5.1.1 MexAB-OprM

Il a été suggéré que le rôle physiologique du système MexA-MexB-OprM est d'exporter la pyoverdine vers le milieu externe (Poole *et al.*, 1993). Par contre, il semblerait que ce système est généralement impliqué dans le transport de métabolites secondaires (Poole, 1994). Une surexpression de l'opéron *mexA-mexB-oprM*, entraîne une augmentation de la sensibilité de *P. aeruginosa* au chloramphénicol, à la tétracycline, à l'acide nalidixique, au ciprofloxacine et à la streptomycine. Par contre, une mutation dans cet opéron rend l'organisme hypersensible à ces agents (Poole *et al.*, 1993). Une autre étude a aussi démontré que le système MexA-MexB-OprM est capable de pomper une variété d'agents antimicrobiens en employant l'énergie dépendante de la force motrice de proton (Poole *et al.*, 1995).

1.5.1.2 MexCD-OprJ

L'expression de l'opéron *mexC-mexD-oprJ* est sous la régulation du gène *nfxB*. Des mutations dans ce gène causent une surexpression de la protéine OprJ. Ceci expliquerait le haut taux de pompage des quinolones chez *P. aeruginosa*. Ces souches résistantes, sélectionnées avec les fluoroquinolones sont prédominantes (Yoshida *et al.*, 1990; Jakics *et*

al., 1992). Ces observations démontrent que cet opéron est le mécanisme de résistance en clinique que l'on rencontre par rapport à l'utilisation des nouvelles fluoroquinolones (Poole *et al.*, 1996). Les protéines MexC-MexD-OprJ démontrent un haut niveau d'homologie avec les composantes du transporteur MexA-MexB-OprM. Bien que ces deux transporteurs reconnaissent et exportent certains substrats communs, il existe des différences spécifiques à chacun de ces complexes protéiques quant à l'exportation d'autres drogues. Ceci implique que les substrats naturels de ces pompes semblent être distincts (Poole *et al.*, 1996).

1.5.1.3 MexEF-OprN

L'opéron *mexE-mexF-oprN* a été récemment caractérisé (Köhler *et al.*, 1997) et semble être régulé de façon positive chez *P. aeruginosa*. Cet opéron semble prévenir l'accumulation d'intermédiaires potentiellement toxiques, qui sont produits durant la biosynthèse ou le métabolisme de certaines substances aromatiques. Certains substrats seraient produits durant le métabolisme de catéchols, benzoates et anthranilates (Köhler *et al.*, 1997). Il a été prouvé que des mutants de type *nfxC* démontrent une augmentation de la résistance au chloramphénicol, à des quinolones et aux carbapénèmes ainsi que la surexpression de la protéine de la membrane externe, OprN (Fukuda *et al.*, 1990; Masuda *et al.*, 1995).

Des études avec du carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP), ont démontré que les systèmes de transport, MexA-MexB-OprM (Li *et al.*, 1995), MexC-MexD-OprJ (Poole *et al.*, 1996) et MexE-MexF-OprN (Köhler *et al.*, 1997) chez *P. aeruginosa*, sont des exporteurs dépendants d'une source d'énergie. Cette source d'énergie proviendrait de la force motrice proton-dépendante de la membrane bactérienne.

1.6 But du projet de recherche

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste causant des infections nosocomiales. Cet organisme se retrouve partout dans l'environnement. Chez la

mucoviscidose (fibrose kystique), il existe des problèmes extrapulmonaires, mais des statistiques démontrent que 95% à 98% du taux de mortalité est dû aux complications pulmonaires, telles que les infections causées par *P. aeruginosa*. Les colonisations bactériennes peuvent être contrôlées à l'aide d'antibiotiques au début, sauf pour *P. aeruginosa* qui semble être extrêmement résistant à ces drogues.

Par une stratégie de criblage d'une banque de chromosomes bactériens artificiels (BAC) de *P. aeruginosa*, nous avons voulu isoler un ou plusieurs recombinants contenant le locus *pmrAB*, homologue au locus *emrAB* de *E. coli*, pour ensuite caractériser un nouveau transporteur chez *P. aeruginosa*. En plus nous avons voulu étudier la structure transmembranaire de la protéine PmrB, afin de la classer parmi la famille des 14-TMS des MFSs. De plus, nous avons voulu étudier le rôle des protéines PmrA et PmrB dans le transport du bromure d'éthidium et la proflavine, en mesurant les changements de fluorescence.

Ces études nous permettront d'identifier et de caractériser un nouveau système de transport de drogues et d'autres molécules chez *P. aeruginosa*. Ceci sera accompli par des analyses génomiques des séquences en acides aminés et des études sur la fonction biologique des protéines PmrA et PmrB, faisant objet de cette étude.

CHAPITRE 2

RESULTATS ET DISCUSSION

Ce chapitre contient un article scientifique soumis à la revue scientifique *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. L'article décrit les méthodes utilisées pour proposer un modèle de la protéine PmrB dans la membrane cytoplasmique et étudier les fonctions des protéines PmrA et PmrB dans le pompage de drogue chez *Pseudomonas aeruginosa*. Ces travaux permettent de déterminer si les protéines PmrA et PmrB sont impliquées dans le transport de substrat à travers la membrane bactérienne. Les résultats présentés dans cet article par les différentes méthodes comme l'analyse génomique des séquences en acides aminés des protéines PmrA et PmrB et des études biologiques à partir des expériences de transport pour PmrB démontrent que ces protéines sont impliquées dans le transport de molécules hydrophobes.

RÉSUMÉ

Le locus *pmrAB*, localisé sur le chromosome de *Pseudomonas aeruginosa* a été isolé d'une banque de chromosomes bactériens artificiels (BACs) de 264 recombinants. Une analyse profonde a démontré des protéines appartenant à la famille des protéines de fusion membranaire (MFP) et la superfamille des pompes majeurs (MFS). Les protéines PmrA et PmrB, codées par le locus *pmr* avaient des identités significatives avec les protéines EmrA (43%) et EmrB (49%) chez *E. coli*. À partir de la séquence en acide aminé de PmrB, un modèle ayant potentiellement 14 régions transmembranaires (TMS) a été proposé. L'application des charges positives internes au modèle prédit confirme la présence des 14 TMS. Dans le peptide de PmrB des motifs conservés ont été identifiés et correspondent aux régions déjà définies chez d'autres protéines parmi la famille des 14-TMS des MFSs. Plusieurs prolines identifiées supportent l'idée que PmrB peut fonctionner comme un transporteur. Le locus *pmrAB* a été cloné dans un plasmide à haute copie et des expériences de transport ont démontré que la protéine PmrB transporte le bromure d'éthidium et la proflavine. Puisque l'efflux a été inhibé par le découpleur carbonyle cyanure *m*-chlorophénylhydrazone (CCCP), la protéine PmrB utilise la force motrice proton dépendante comme source d'énergie. Les protéines identifiées, représente le premier transporteur de plusieurs drogues à être isolé chez *P. aeruginosa*, parmi la famille des MFSs.

**Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *pmrAB* Locus: A Multidrug Efflux
Pump of the Major Facilitator Superfamily**

LAURENT SABBAGH, GUY CARDINAL, FRANÇOIS SANSCHAGRIN
AND ROGER C. LEVESQUE*

Microbiologie Moléculaire et Génie des Protéines, Sciences de la Vie et de la
Santé, Faculté de Médecine, Pavillon Charles-Eugène Marchand,
Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada. G1K 7P4

Tel.: (418) 656-3070; Fax: (418) 656-7176; e-mail: rclevesq@rsvs.ulaval.ca

* Corresponding author

Running Title: *P. aeruginosa* PmrB Efflux

ABSTRACT

The *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal *pmrAB* locus has been isolated from a bacterial artificial chromosome (BAC) array of 264 clones. Detailed analysis showed proteins belonging to the membrane fusion protein family and a transmembrane protein of the major facilitator superfamily (MFS). Both the PmrA and PmrB proteins encoded by the *pmr* locus had significant identities to the *E. coli* EmrA (44%) and EmrB (49%) proteins, respectively. Based on the amino acid sequence of PmrB, a putative model with 14 potential α -helices spanning the inner membrane was predicted. The 14 transmembrane segment model is supported by the charge bias obtained from applying the positive-inside rule. Conserved motifs found within the PmrB peptide, supported the model of designated regions of other proteins within the 14-TMS family of the MFS. Prolines identified supported that PmrB could function as a transport protein. The *pmrAB* locus was cloned on a multicopy plasmid and transport experiments showed that the PmrB protein mediated efflux of ethidium bromide and proflavin. Since efflux was uncoupled when the protonophore carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) was present, the PmrB protein was involved in energy coupling (proton translocation) using the proton-motive force. The identified proteins represent the first multidrug efflux pump within the MFS to be isolated from *P. aeruginosa*.

INTRODUCTION

Bacterial and eukaryotic cells possess a wide variety of membrane transporters. These proteins play a vital role in nutrient acquisition, in maintaining cellular homeostasis, and in multidrug and unrelated toxin efflux (23). The latter function has been a well-studied phenomenon due to the rising problems of resistance to several commonly used antibiotics. Multidrug resistance genes (MDR) in bacteria were first identified on a *Staphylococcus aureus* plasmid (33) and later on the chromosomes of *Bacillus subtilis* (1, 18, 21), *Escherichia coli* (12, 14), *Lactococcus lactis* (2), *Mycobacterium smegmatis* (32), *Neisseria gonorrhoeae* (6), *Pseudomonas aeruginosa* (9, 26), *Salmonella typhimurium* (7) and *S. aureus* (8, 19).

Most of the pumps identified in these organisms belong to a secondary type of transporters requiring the energetics of a proton motive force. These constitute the largest group of transporters to be found in bacteria, which have been divided into three major families: the major facilitator superfamily (MFS), the small multidrug resistance pump (SMR) family, and the resistance/nodulation/cell-division (RND) family. The MFS consists of various transport proteins involved in symport, antiport or uniport of a wide range of substrates (5, 15). Based on hydropathy and comparative amino acid sequence analysis it has been suggested that the MFS can be divided into five distinct clusters of membrane transport proteins (15, 24). Clusters 2 to 5 shared a common structural motif of 12 transmembrane spanning segments (TMS), whereas cluster 1, upon closer studies has been divided into two families consisting of proteins with 12- and 14-TMS. The best-characterized member of the

12-TMS family (cluster 1) is the tetracycline exporter TetB from *E. coli* (10). Within the 14-TMS family (cluster 1) the multidrug exporter QacA from *S. aureus* (22, 24, 29) has been extensively studied.

Within the 12- and 14-TMS families of export proteins several multidrug resistance efflux pumps have been identified, such as the *B. subtilis* Bmr (18), *E. coli* EmrB (12), and *S. aureus* QacA (29) proteins. The substrates transported by these proteins seemed to share no structural similarities although they have common physical properties (lipophilicity and charge). However, the molecular basis of substrate recognition by these pumps has yet to be determined.

The proteins EmrA and EmrB of *E. coli* belong to the membrane fusion protein (MFP) family and the MFS, respectively. The MFP is required in order to export the substrate across the membranes of Gram-negative bacteria. The EmrB protein has been shown to export various unrelated hydrophobic compounds. The *emrB* gene is chromosomally located and has been cloned, sequenced and expressed on a multicopy plasmid (12). The translated amino acid sequence showed 23% and 26% identity to QacA and Mmr, respectively. All three of these proteins have 14 putative transmembrane segments (17).

In this study, we describe the isolation and characterization of a chromosomal locus, *pmr*, from a bacterial artificial chromosome (BAC) library of *P. aeruginosa*. The complete amino acid sequences of PmrA and PmrB were compared with previously determined sequences of other MFPs and members of the MFS, respectively. We propose a 14-TMS topology of the PmrB protein based on hydropathy analysis, multiple-sequence alignment,

and the application of the positive-inside rule in order to classify the protein within the 14-TMS family of the MFS. Additionally, the ability of the PmrA/PmrB protein pair to transport ethidium and proflavin was measured by an *in vivo* fluorescence quenching assay. In this study we have isolated and characterized the first multidrug efflux pump of *P. aeruginosa* that would belong to the MFS.

MATERIALS AND METHODS

Enzymes and Antibiotics. Restriction endonuclease *Bam*HI and *Hind*III and T4 DNA ligase were purchased from New England Biolabs Ltd. (Mississauga, Ontario, Canada). Ampicillin, proflavin and carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) were purchased from Sigma Diagnostic Canada (Mississauga, Ontario, Canada).

Bacterial strains and plasmids. *E. coli* strain used was DH5 α F': *F'*/*endA1 hsdR17(rk⁻mk⁻) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 D(lacIZYA-argF) U169 deoR (f80dlacD(lacZ) M15). The bacterial strain *P. aeruginosa* PAO1293, a derivative of PAO1 constructed using the transducing phage E79tv-2 and carries a mutation for chloramphenicol resistance (kindly provided by Dr. Bruce W. Holloway, Monash University, Australia), was used for the preparation of high molecular weight genomic DNA for PCR amplification and BAC constructions (4). All cloning were performed with pUC18 (Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Quebec, Canada).*

Plasmid construction and recombinant DNA methods. Primers 5'-CGCGGATCCCATCTGACCCGGCATTCTATT-3' and 5'-CCCAAGCTTAAGCGCCGGAATGAACGA-3' with *Bam*HI and *Hind*III restriction sites, respectively, were prepared for amplification of a 3.0 kb PCR product and coding for PmrA and PmrB proteins. PCR was performed in 50 μ l reactions in 1X Expand High Fidelity buffer with 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 300 nM of each primer, and 2.6 U Expand High Fidelity PCR system enzyme mix (Boehringer Mannheim Canada, Laval, Quebec).

Amplifications were conducted in a programmable thermal cycler (Perkin-Elmer/Cetus) with an initial template denaturation at 94°C for 2 min, then 10 cycles of 1 min denaturation at 94°C, 1 min annealing at 55°C, and 4 min extension at 68°C, followed by 20 cycles of 1 min denaturation at 94°C, 1 min annealing at 55°C, and 4 min extension at 68°C with a cycle elongation of 20 sec for each extension cycle. Finally, 1 cycle of prolonged elongation was done for 10 min at 68°C. Reaction products were purified using the QIAquick PCR purification kit (QIAGEN Inc., Chatsworth, Ca., USA). The amplified product was digested with *Bam*HI and *Hind*III and cloned into the multicopy pUC18 plasmid. The ligation mixture was then electroporated in *E. coli* DH5 α F' and cells grown on Tryptic Soy Agar plates (DIFCO, Detroit, MI, USA) supplemented with ampicillin (100 μ g/ml). Plasmid DNA was isolated by the alkali lysis procedure (29).

DNA sequencing and oligonucleotide synthesis. Sequencing gels were run on a 373 DNA Sequencer (Applied Biosystems) following sequencing reactions performed with ABI Prism DyeDeoxy kits with *Taq* FS (Perkin-Elmer). DNA preparations for sequencing were done using Qiagen Midikits (Qiagen). Sequencing and PCR primers were synthesized on an Oligo1000 DNA synthesizer (Beckman) or Model 394 DNA/RNA synthesizer (Applied Biosystems), then purified using the EasyPrep System Oligo Prep Kit (Pharmacia). The sequence was determined by a primer walking sequencing approach for *pmrAB*. Primers were synthesized from the last 50 nucleotides read and both DNA strands were completely sequenced.

Library pooling and PCR screening. For library pooling, the 264 BAC clones having >80 kb inserts were grown to saturation in individual 1.5 ml cultures, and 100 μ l aliquots were withdrawn for each pool. Pooled cultures were prepared as previously described (4). Briefly, cells were centrifuged for 2 min, and resuspended in 100 μ l 10 mM Tris-HCl (pH 8), 0.1 mM EDTA. Cells were lysed by incubation at 100°C for 10 min then 10 μ l was withdrawn from each pool for each PCR reaction. PCR was performed in 100 μ l reactions in 1.5 mM MgCl₂, 1X PCR buffer (Gibco BRL), 5 pmoles of each primer, 200 μ M dNTPs (Boehringer Mannheim) and 5 units *Taq* DNA polymerase (Gibco BRL). Amplifications were conducted with an initial template denaturation at 94°C for 7 min, then 25 cycles of 1 min denaturation at 95°C, 1 min annealing at 50°C, and 1 min extension at 72°C. For each PCR reaction, 15 μ l was electrophoresed in agarose gels and the PCR products visualized after ethidium bromide staining.

Ethidium fluorescence assay. The general method for transport studies was adopted as previously described (16, 34). Briefly, 1 ml from an overnight saturated culture grown in LB broth was used to inoculate 100 ml of LB broth in a 500-ml flask with appropriate antibiotics for plasmid maintenance. The cultures were incubated at 37°C for 2 h., IPTG was added to a final concentration of 1mM to those cultures requiring induction, and were further incubated for 2 h. Cells were harvested by centrifugation at 3,000 X g for 10 min, washed in 20 mM HEPES (pH 7.0) and recentrifuged. Washed cells were resuspended in 10 ml of wash buffer with 10 μ M ethidium bromide and 20 μ M CCCP and incubated at 37°C for 30 min to load cells with dye. The cells were then placed on ice for 15 min. Ethidium bromide-loaded cells

were collected by centrifugation as before and resuspended in wash buffer quantitatively at 50 mg (wet weight) of cells per ml.

Transport experiments were performed with a 1-cm-path-length fluorescence cuvette, which contained 1.7 ml of buffer to which 200 μ l of cell suspension was added. Fluorescence was measured using the Shimadzu spectrofluorophotometer RF-540. Transport was initiated by the addition of 100 μ l of 1M sodium formate, which serves as respiratory chain donor to generate a proton motive force. Assays were performed at room temperature (22°C). The wavelengths used were as follows: excitation, 530 nm, and emission, 600 nm, with a 10-nm bandwidth. Under conditions in which uncoupler was utilized, CCCP was added to the buffer in the cuvette to a final concentration of 20 μ M.

Proflavin fluorescence assay. A similar assay as the above ethidium fluorescence was used with the dye proflavin, as previously described (34). Cells were prepared as described above. *E. coli* cells were loaded with dye for 30 min at 37°C at a final concentration of 20 μ M with 20 μ M CCCP. The assay was performed with 2.0 ml of 20 mM HEPES buffer (pH 7.0) and 10 μ l of cell suspension (50 mg [wet weight] of cells per ml). Transport was initiated by the addition of 100 μ l of 1 M Na formate. The excitation wavelength used was 450 nm with emission measured at 510 nm with a 10-nm bandwidth. Under conditions in which uncoupler was utilized, CCCP was added to the buffer in the cuvette to a final concentration of 100 μ M. Values shown in Table 3 represent the slopes obtained from the plots of changes in fluorescence over time. Readings were recorded every 30 s. for 3 min. for the proflavin fluorescence assay and every 1 min. for 10 min. for the ethidium fluorescence assay.

Nucleotide and amino acid sequence analysis. DNA sequence analysis was done on a Sun Sparcs 1000C workstation with the Genetics Computer Group software packages (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc.). Comparisons of sequences with the GenBank, European Molecular Biology Laboratory, and National Biomedical Research Foundation databases were done using FASTA and BLAST programs. Nucleotide sequence and mRNA translation alignment was performed using PUBLISH, and DISTANCES to determine percent identities. The *pmrAB* sequence has been deposited with GenBank under the accession number AF047693. Multiple sequence alignments were performed with the program PILEUP, ClustalW, and prepared with BOXShade. Topological prediction was performed using TMpred (ISERC) and the hydropathy plots generated by the program (35).

RESULTS

PCR screening and MDR gene isolation. Initial screening was done on a *P. aeruginosa* library in pTZ18R (*EcoRI* – *MboI*) by random sequencing, using primers flanking the multiple cloning site of the vector. These recombinants contained inserts of approximately 1.0 to 4.0 kb. This first screening allowed the identification of several sequences, within the *P. aeruginosa* PAO1 genome, showing identities to known genes among other organisms. One of the isolated clones had a 1044 bp insert showing 43% identity to the 3' end of the *E. coli emrB*, a multidrug resistance (MDR) gene (data not shown). Complete sequencing of the identified *emrB* orthologue, allowed the design of internal primers amplifying a 172 bp fragment. These were used to screen by PCR a selected array of *P. aeruginosa* bacterial artificial chromosomes (BAC) of 264 clones having inserts > 80 kb (4). The BAC screening consisted of a pooling strategy of BAC recombinants and PCR (4). PCR screening was then performed on the 12 individual BACs within the second level pools, and two BAC clones were identified.

The PCR screening allowed the isolation of two BACs, having inserts of 140 kb and 80 kb within the *HindIII* cloning site of the pBeloBAC11 vector. These BACs contained the *emrB* homologue of *E. coli* from *P. aeruginosa*. The recombinant BAC, pMNA19 was retained and subsequently used for direct BAC sequencing.

Sequencing *pmrA* and *pmrB*. DNA sequencing of 3296 nucleotides (nts) and initial homology searches identified *emrAB* homologues. The first open reading frame (*orf1*), from 1413 nts to 2942 nts, encoded an *emr* orthologue which showed 49% identities with the *E.*

coli and *H. influenzae* EmrB proteins. Further sequencing downstream of *orf1* and database searches of deduced peptides revealed no significant homologies. Upstream of *orf1*, a second open reading frame (*orf2*), from 200 nts to 1402 nts, was found 10 bp from the Met initiation codon (1413 nts) of the *emrB* homologue (Fig. 1). A comparison of *orf2* with databases using BLAST and FASTA programs, revealed 44% and 42% identities to the *E. coli* EmrA and *H. influenzae* ErmA proteins, respectively. *orf1* and *orf2* were subsequently designated as *pmrB* and *pmrA*, respectively (Fig. 1). Further DNA sequence analysis revealed that all possible orfs identified were 67% G+C rich, a characteristic of the *P. aeruginosa* chromosome.

DNA sequence analysis did not identify a promoter sequence upstream of *pmrB*, suggesting that the two genes could be part of an operon. Based on known *P. aeruginosa* promoter consensus sequences (28), two possible -35 and -10 promoter sequences were found, with their corresponding possible ATG initiation codon, upstream of *pmrA*. As shown in Fig. 1, region I and II correspond to promoter sequences containing one or two mismatches to known *P. aeruginosa* promoter sequences. A strong transcriptional terminator was also found downstream (158 nts) of the *pmrB* TGA termination codon (Fig. 1). A comparison of the genomic organization of the *E. coli* multidrug efflux *emrRAB* locus with the *P. aeruginosa* *pmrAB* locus showed that the genes are organized in a similar manner (Fig. 2). Sequencing 1.0 kb upstream of *pmrA* did not reveal a possible negative regulator of the putative multidrug resistance pump, as for the EmrB efflux pump of *E. coli* (Fig. 2).

The proteins encoded by *emrA* and *emrB* belong to the membrane fusion protein (MFP) family and the major facilitator superfamily (MFS), respectively. When comparing

the amino acid sequence of the PmrA protein with other members of the MFP, the most significant identity of PmrA was observed with ErmA (42%) and EmrA (44%) proteins (TABLE 1). The highest percent identities of PmrB were observed with the EmrB proteins (49%) of *E. coli* and *H. influenzae* (TABLE 2). The multiple-sequence alignment of the highly identical MFPs showed that there are several regions having almost 100% identities with PmrA (Fig. 3). A similar alignment was prepared with EmrB of *E. coli* and *H. influenzae* (indicated as HmrB to distinguish from the EmrB protein of *E. coli*) and PmrB of *P. aeruginosa* (Fig. 4). This alignment also demonstrated high identities, with only two minor gaps at positions 353 and 440 of PmrB (Fig. 4). This indicated that the PmrA and PmrB proteins might potentially function in a similar fashion to proteins within the MFP family and MFS, respectively and more similarly to EmrA and ErmA and EmrB of *E. coli* and *H. influenzae*, respectively.

Prediction of a 14-TMS model for PmrB. The 1527 bp orf of *pmrB* would encode a 509 amino acids peptide of approximately 56 kDa (Fig. 1). The hydropathy plot of PmrB indicated a highly hydrophobic integral membrane protein with 14 potential α -helices spanning the membrane (Fig. 5A). All peaks with $\langle H \rangle \geq 1000$ are considered "certain" transmembrane segments (TMS), and all with $500 \leq \langle H \rangle < 1000$ are considered putative candidates; cut-off values were chosen as described (35). Looking at the hydrophobicity profile of PmrB, 13 of the 14 peaks (1, 2, 3, and 5 to 14) were considered certain TMS (Fig. 5A). In order to verify the validity of the fourth peak the positive-inside rule was applied to our model as proposed (35).

Initially two possible transmembrane structures were generated including the 13 certain candidates and then either excluding or including the fourth tentative segment (Fig. 5B). Each structure was then ranked according to their degree of bias, representing the difference in the number of positively charged amino acid residues (Arg and Lys) between the two sides of each structure. From the two topologies generated, one excluding and one including the putative segment, the bias in the distribution of positively charged residues were found to be -7 and 12 , respectively (Fig. 5B). According to the positive-inside rule, the second topology (including the putative segment) has been determined to be the correct model.

Based on the hydrophobicity analysis and confirmation of all transmembrane segments by the positive-inside rule, a refined model was generated showing the PmrB protein spanning the cytoplasmic membrane 14 times (Fig. 6). From the predicted topology and the multiple-sequence alignment of PmrB with other homologous proteins (Fig. 4), conserved motifs within the 14-TMS family of the MFS were identified and mapped on the two-dimensional model (Fig. 6). The conserved motifs have been shown to be characteristic for either 12- or 14-TMS or conserved in both families within the MFS (24). We noted that the motifs lie within the predicted regions: motif A between TMS 2 and 3, motif B within TMS 4, motif C at the end of TMS 5, motif D1 at the end of TMS1, motif E within TMS 7, motif F within TMS 13, and the recently identified motif H which lies within TMS 6 (Fig. 6).

Transport experiments. In order to determine whether the protein encoded by *pmrB* functions as an efflux pump, transport experiments were performed. Overexpression of PmrB

along with its MFP PmrA (pPMRAB1 and pPMRAB2) did not show any significant increase in ethidium transport when compared to *E. coli*. The relative initial rates of transport encoded by the recombinant plasmids were about twice the rate of *E. coli* cells alone or containing the pUC18 vector (TABLE 3). When comparing the extent of transport, as measured by the ratio of energized cells (+Formate) relative to resting cells (-Formate) containing pPMRAB1 and pPMRAB2, no obvious initial burst of transport from the resting state was observed. Values obtained were 6.3, 3.2, 4.5, and 2.3 for *E. coli* cells containing pPMRAB1, pPMRAB2, the vector pUC18, and *E. coli* only, respectively. This would indicate that the PmrB pump transports very little if any ethidium bromide. However, addition of 20 μ M CCCP seemed to uncouple efflux since the initial rates of inhibition were somewhat lower, than those of energized cells (TABLE 3). The low level of transport observed could be due to other multidrug transporters found in *E. coli* and could not be assigned to the expression of the cloned genes.

Transport experiments were also performed using the proflavin dye. Relative initial rates of proflavin fluorescence are given in Table 3. The relative rate of transport of overexpressed PmrB was observed to be five-fold (4.9) when compared to *E. coli* cells only. An initial burst of transport of approximately four-fold was observed, when comparing the ratio of energized cells to resting cells of PmrB (pPMRAB1 and pPMRAB2: ~ 20) with the ratio of the control (*E. coli* cells only: ~ 5). This showed that the protein encoded by *pmrB* was able to transport proflavin across the membrane. Efflux was significantly uncoupled using 100 μ M CCCP (TABLE 3). When CCCP was present in the buffer a change from 0.046 ± 0.013 to 0.069 ± 0.005 was observed during the initial rate of transport of proflavin.

However when the uncoupler was not added to the mixture, the initial rates of transport went from 0.046 ± 0.013 to 0.93 ± 0.12 for pPMRAB1. Similar results were obtained for pPMRAB2 (TABLE 3).

DISCUSSION

Random sequencing of a *P. aeruginosa* library in pTZ18R allowed the isolation of a recombinant, with a 1044 bp insert and having an identity of 43% to the *E. coli* EmrB protein. This allowed the design of specific primers and subsequent screening, using PCR, of an array of 264 BACs. Two recombinants were isolated following PCR screening, and shown to contain inserts of 80 kb and 140 kb and presumably encoding the *pmrAB* locus. The *pmr* locus was sequenced and subcloned into the pUC18 plasmid. PmrA/B proteins expressed mediated efflux of hydrophobic substrates, such as ethidium bromide and proflavin. The complete nucleotide sequence of the *pmr* locus was determined and shown to contain two orfs encoding the PmrA and PmrB proteins. A comparative genetic map (Fig. 2) of the *emrRAB* and the *pmrAB* loci showed similar organization of the genes, but no regulatory protein for the PmrA/B proteins has been identified, such as the EmrR protein, a member of the MarR family (13). If a regulatory protein of the *pmrAB* locus exists within the *P. aeruginosa* genome, genetic complementation studies with *E. coli* might identify such a protein. Furthermore, amino acid sequence analysis allowed the prediction of a putative 14 transmembrane segment model of the PmrB protein.

A comparison of the amino acid sequences of PmrA and PmrB, with proteins in databases, revealed 44% identity to EmrA and 49% identity to EmrB of *E. coli*, respectively. The EmrA and EmrB proteins have been characterized and found to belong to the MFP family and the MFS (12), respectively. PmrB would also belong to the MFS, due to the high degree of identity with proteins within that family, in contrast to proteins within the RND or SMR families. The PmrA protein showed significant identities with proteins among the MFP

family. In *P. aeruginosa* three multidrug efflux pumps (MDRs) encoded by the *mexA-mexB-oprM* (26), *mexC-mexD-oprJ* (25), and *mexE-mexF-oprN* (9) operons have been characterized. All three MDRs have been responsible in mediating intrinsic multiple antibiotic resistance.

Several export proteins of *P. aeruginosa*, such as CmlA and TetC, belong to the MFS, but the only MDRs isolated from *P. aeruginosa* (Mex) belong to the RND family (23). In this study we have isolated and characterized the first multidrug efflux pump of *P. aeruginosa* that would belong to the MFS. The PmrB would belong to the 14-TMS family export proteins of the MFS, with 14 α -helices spanning the membrane (Fig. 6); in contrast to members of the RND family, which only contained 12. The RND multidrug efflux systems identified to date displayed much wider substrate specificity than the MFS or SMR multidrug efflux proteins (23).

Within the MFS, QacA represented the first membrane transport protein shown to contain 14 transmembrane segments (TMS). It also confirmed that the MFS contains a family of proteins with 14-TMS, since cluster 1 was thought to include proteins with 12 TMS. Cluster 1 has subsequently been divided into two families, the 12-TMS and the 14-TMS (22). The membrane topology of QacA was analyzed using alkaline phosphatase and β -galactosidase fusions, which indicated that the protein contains 14-TMS (22). A new strategy for predicting the topology of bacterial inner membrane proteins was proposed (35) on the basis of hydrophobicity analysis, generation of a set of possible topologies and ranking these according to the positive-inside rule. The positive-inside rule is based on the observation that

positively charged amino acid residues (Arg and Lys) are much more abundant in cytoplasmic as compared to periplasmic regions of bacterial inner membrane proteins (35). Using the strategy involving hydropathy analysis and the positive-inside rule has provided support and confirmed the proposed model of the PmrB protein containing 14-TMS (Fig. 6). The model we propose fits within the refined phylogeny of the MFS, where family 1 consists of the 14-TMS exporters typified by QacA (22).

A closer look at the PmrB 14-TMS model and the multiple-sequence alignment (Fig. 4 and 6) revealed the presence of several prolines within TMS 4, 6, and 10. This is a rare feature among α -helices, since the relatively rigid backbone angles of the proline residue and its lack of an amide proton for donation in hydrogen-bonding patterns makes it a breaker of α -helical structures. The transmembrane protein segments are normally comprised largely of hydrophobic helix-promoting amino acids. In one study conducted by Brandl and Deber (3), it was observed that membrane-buried proline residues were found in nearly all transport proteins examined, in contrast to non-transport proteins whose membrane-buried regions were largely devoid of intramembraneous proline residues. It was therefore hypothesized that intramembraneous proline residues in transport proteins may cause conformational perturbation at only one or two sites. This should be sufficient to regulate the opening and closing of the protein transport channel. It was also noted that membrane-buried prolines are conserved in similar positions in transport proteins that have common function (3). This is observed in the multiple-sequence alignment of PmrB like proteins (Fig. 4), suggesting a similar function between the EmrB and PmrB proteins.

As has been previously mentioned, the PmrB protein is highly identical to the EmrB protein of *E. coli*, which belongs to the MFS. The EmrB protein was the first reported membrane translocase in Gram-negative species and found to belong to the MFS, since previously that family, only included multidrug resistance proteins of Gram-positive bacteria (12). In this study we have identified another membrane translocase from a Gram-negative bacteria, the PmrB protein of *P. aeruginosa*, which should be classified within the 14-TMS family of the MFS.

There are several consensus sequences found in most members of the 14-TMS of the MFS suggesting that these regions are essential for the function of these transporters (24). The model presented in Fig. 6 identifies the location and sequences of these consensus motifs within the PmrB peptide. Motif A and B overlap with related conserved motifs identified in a group of homologous sugar transporters. Motif A, found in a cytoplasmic, hydrophilic loop with its high degree of conservation among other types of transporters suggested that it may play a role in the opening and closing of the transport channel by a reversible conformational change mechanism. Within motif B found in TMS 4, an absolute conservation of the Arg (position 109 in Fig. 4 and 6) suggests that it may be involved in proton transfer. Unlike motif A and B, motif C is conserved only among export proteins and is not found in sugar importers. This suggested that motif C may be involved in linking proton translocation to export rather than import of a substrate (24).

Analysis of the sequence and prediction of a 14-TMS model strongly supports the claim that the PmrB protein could potentially function as a membrane transporter, like other

members of the MFS. The *emr* locus protected the cell from a number of drugs, only when present on a multi-copy plasmid (12), and cloning of *tehAB* into a high-copy plasmid and expression behind a strong promoter gave resistance to tellurite (34, 36). In *E. coli* the EmrB protein is known to function as an efflux pump, like many of the proteins belonging to the MFS. The efflux mechanism has been elucidated for several proteins by monitoring ethidium bromide transport (11, 18, 19, 34, 38). In this study, we also utilized a proflavin fluorescence efflux assay (34). The observed change in fluorescence is an indication of the fluorophore being transported from a more concentrated environment within the cell to a more dilute environment outside the cell. The efflux causing the dilution of the fluorophore results in a change in the quenching state of the fluorophore therefore a change in fluorescence is observed (34). When cells are exposed to Na formate ethidium fluorescence decreases when transported outside the cells in contrast to proflavin whose fluorescence increases upon efflux.

The transport experiments performed in this study showed low levels of ethidium transport in contrast to proflavin efflux that was five times over the controls (TABLE 3). Both of these fluorophores are hydrophobic substrates, similar to the drugs transported by the *E. coli* EmrB protein. It has been shown that the EmrB protein confers low levels of resistance to ethidium bromide (12), similar to the low levels of ethidium transport observed with the highly homologous (49%) PmrB protein. Similar transport experiments were used to show evidence for an efflux system such as NorA and QacC of *S. aureus* (11, 19), EmrE of *E. coli* (37), Bmr of *B. subtilis* (18) and TehA of *E. coli* (34). Fluorescence probes have been used to monitor the function of the subunit proteins of the MexA-MexB-OprM drug

extrusion machinery in *P. aeruginosa* (20). The application of a novel technique has been recently described to study the generation of unmarked chromosomal mutations for the study of efflux systems (31).

We have shown that the *pmrAB* locus codes for two proteins, which mediate efflux across the bacterial membrane. These experiments allowed us to show a possible biological function for the PmrB protein, that of an efflux pump. Ethidium and proflavin transport are uncoupled by CCCP (TABLE 3), implying that PmrB is capable of utilizing the membrane energetics, such as the proton-motive force like the QacA and EmrB proteins among the MFS. A greater concentration of CCCP, than the one used with the ethidium transport experiments, was required to inhibit proflavin fluorescence changes. This is probably due to the increased sensitivity of the proflavin assay (>200 fold) due to the difference in quantum yield between fluorescent and quenched forms (34). The PmrB protein would belong to the 14-TMS family of the MFS conferring resistance to hydrophobic substrates similarly to the EmrB protein of *E. coli*. It is also the only multidrug efflux pump of the MFS to be identified in *P. aeruginosa* and the second from a Gram-negative bacteria, within that family. The isolation of this new MDR from *P. aeruginosa* might be able to explain resistance to new antibiotics or drugs to which the mechanism of resistance has not been elucidated yet.

REFERENCES

1. Ahmed, M., L. Lyass, P. N. Markham, S. S. Taylor, N. Vazquez-Laslop, and A. A. Neyfakh. 1995. Two highly similar multidrug transporters of *Bacillus subtilis* whose expression is differentially regulated. *J. Bacteriol.* 177:3904-3910.
2. Bolhuis, H., G. Poelarends, H. W. Vanveen, B. Poolman, A. J. M. Driessen, and W. N. Konings. 1995. The lactococcal *lmrP* gene encodes a proton motive force-dependent drug transporter. *J. Biol. Chem.* 270:26092-26098.
3. Brandl, C. J., and C. M. Deber. 1986. Hypothesis about the function of membrane-buried proline residues in transport proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:917-921.
4. Dewar, K., L. Sabbagh, G. Cardinal, F. Veilleux, F. Sanschagrín, B. Birren, and R. C. Levesque. 1998. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 bacterial artificial chromosomes: Strategies for mapping, screening and sequencing 100 kb loci of the 5.9 Mb genome. *Microbial. Comp. Gen.* (in press).
5. Griffith, J. K., M. E. Baker, D. A. Rouch, M. G. P. Page, R. A. Skurray, I. T. Paulsen, K. F. Chater, S. A. Baldwin, and P. J. F. Henderson. 1992. Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 4:684-695.

6. Hagman, K. E., W. Pan, B. G. Spratt, J. T. Balthazar, R. C. Judd, and W. M. Shafer. 1995. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the *mtrRCDE* efflux system. *Microbiology* 141:611-622.
7. Hongo, E., M. Morimyo, K. Mita, I. Machida, H. Hama-Inaba, H. Tsuji, S. Ichimura, and Y. Noda. 1994. The methyl viologen-resistance-encoding gene *smvA* of *Salmonella typhimurium*. *Gene* 148:173-174.
8. Kaatz, G. W., S. M. Seo, and C. A. Ruble. 1993. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:1086-1094.
9. Köhler, T., M. Michéa-Hamzhepour, U. Henze, N. Gotoh, L. K. Curty, and J.-C. Pechère. 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 23:345-354.
10. Levy, S. B. 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:695-703.
11. Littlejohn, T.G., I. T. Paulsen, M. T. Gillespie, J. M. Tennent, M. Midgley, I. G. Jones, A. S. Purewal, and R. A. Skurray. 1992. Substrate specificity and energetics of antiseptics and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 95:259-266.

12. Lomovskaya, O., and K. Lewis. 1992. *emr*, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8938-8942.
13. Lomovskaya, O., K. Lewis, and A. Matin. 1995. EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB. *J. Bacteriol.* 177:2328-2334.
14. Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, and J. E. Hearst. 1993. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175:6299-6313.
15. Marger, M. D., and M. H. Saier, Jr. 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* 18:13-20.
16. Midgley, M. 1986. The phosphonium ion efflux system of *Escherichia coli*: Relationship to the ethidium efflux system and energetics studies. *J. Gen. Microbiol.* 132:3187-3193.
17. Neal, R. J., and K. F. Chater. 1987. Nucleotide sequence analysis reveals similarities between proteins determining methylenomycin A resistance in *Streptomyces* and tetracycline resistance in eubacteria. *Gene* 58:229-241.
18. Neyfakh, A. A., V. E. Bidnenko, and L. B., Chen. 1991. Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4781-4785.

19. Neyfakh, A. A., C. M. Borsch, and G. W. Kaatz. 1993. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:128-129.
20. Ocaktan, A., H. Yoneyama, and T. Nakae. 1997. Use of fluorescence probes to monitor function of the subunit proteins of the MexA-MexB-OprM drug extrusion machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 272: 21964-21969.
21. Ohki, R., and M. Murata. 1991. *bmr3*, a third multidrug transporter gene of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 179:1423-1427.
22. Paulsen, I. T., M. H. Brown, T. G. Littlejohn, B. A. Mitchell, and R. A. Skurray. 1996. Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: Membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3630-3635.
23. Paulsen, I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* 60:575-608.
24. Paulsen, I. T., and R. A. Skurray. 1993. Topology, structure and evolution of two families of proteins involved in antibiotic and antiseptic resistance in eukaryotes and prokaryotes-an analysis. *Gene* 124:1-11.

25. Poole, K., N. Gotoh, H. Tsujimoto, Q. Zhao, A. Wada, T. Yamasaki, S. Neshat, J.-I. Yamagishi, X.-Z. Li, and T. Nishino. 1996. Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 21:713-724.
26. Poole, K., K. Krebs, C. McNally, and S. Neshat. 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.* 175:7363-7372.
27. Poole, K., K. Tetro, Q. Zhao, S. Neshat, D. E. Heinrichs, and N. Bianco. 1996. Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2021-2028.
28. Ronald, S., M. A. Farinha, B. J. Allan, and A. M. Kropinski. 1992. Cloning and Physical Mapping of Transcriptional regulatory (Sigma) Factors from *Pseudomonas aeruginosa*, p. 251. In E. Galli, S. Silver and B. Witholt (ed.), *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*. 1992. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

29. Rouch, D. A., D. S. Cram, D. DiBerardino, T. G. Littlejohn, and R. A. Skurray. 1990. Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline- and sugar-transport proteins. *Mol. Microbiol.* 4:2051-2062.
30. Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
31. Schweizer, H. P. 1998. Intrinsic resistance to inhibitors to fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is due to efflux: development of a novel technique for generation of unmarked chromosomal mutations for the study of efflux systems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:394-398.
32. Takiff, H. T., M. Cimino, M. C. Musso, T. Weisbrod, R. Martinez, M. B. Delgado, L. Salazar, B. R. Bloom, and W. R. Jacobs, Jr. 1996. Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:362-366.
33. Tennent, J. M., B. R. Lyon, M. Midgley, I. G. Jones, A. S. Purewal, and R. A. Skurray. 1989. Physical and biochemical characterization of the *qacA* gene encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* 135:1-10.

34. Turner, R. J., D. E. Taylor, and J. H. Weiner. 1997. Expression of *Escherichia coli* TehA gives resistance to antiseptics and disinfectants similar to that conferred by multidrug resistance efflux pumps. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:440-444.
35. von Heijn, G. 1992. Membrane protein structure prediction: Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J. Mol. Biol.* 225: 487-494.
36. Walter, E. G., J. H. Weiner, and D. E. Taylor. 1991. Nucleotide sequence and overexpression of the tellurite-resistance determinant from the IncIII plasmid pHH1508a. *Gene* 101:1-7.
37. Yamane, K., Y. Akiyama, K. Ito, and S. Mizushima. 1990. A positively charged region is a determinant of the orientation of cytoplasmic membrane proteins in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 265: 21166-21171.
38. Yerushalmi, H., M. Lebendiker, and S. Schuldiner. 1995. EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H⁺ and is soluble in organic solvents. *J. Biol. Chem.* 270:6856-6863.

TABLE 1. Percent identities between members of the Membrane Fusion Protein family

	HmrA ^a	EmrA ^b	PmrA ^c	EnvC ^d	NolF ^e
HmrA ^a	—	46	42	17	15
EmrA ^b		—	44	15	12
PmrA ^c			—	17	14
EnvC ^d				—	19
NolF ^e					—

^a MFP of EmrB in *H. influenzae* (identified as HmrA to distinguish from EmrA of *E. coli*), an EmrA homologue of *E. coli* (PR: B64101).

^b MFP of EmrB in *E. coli* (PR: JC1344).

^c MFP of PmrB in *P. aeruginosa*, an EmrA homologue of *E. coli* (This work; GB: AF047693).

^d MFP of EnvD in *E. coli* (GB: X57948).

^e MFP of NolGHI in *Rhizobium meliloti* (GB: 58632).

MFP, membrane fusion protein.

Accession number: GB, GenBank; PR, PIR, protein identification ressource.

TABLE 2. Percent identities between 14-TMS family multidrug export proteins of the Major Facilitator Superfamily

	HmrB ^a	EmrB ^b	PmrB ^c	QacA ^d	SmvA ^e	Atr1 ^f
HmrB ^a	—	67	49	17	21	17
EmrB ^b		—	49	18	22	19
PmrB ^c			—	19	19	17
QacA ^d				—	31	16
SmvA ^e					—	15
Atr1 ^f						—

^a EmrB (identified as HmrB to distinguish from EmrB of *E. coli*) of *H. influenzae*, an EmrB homologue of *E. coli* (PR: A64101).

^b MDR found in *E. coli* (PR: JC1345).

^c *P. aeruginosa* EmrB homologue of *E. coli* (This work; GB: AF047693).

^d MDR found in *Staphylococcus aureus* (GB: X56628).

^e MDR found in *Salmonella typhimurium* (SW: P37594).

^f MDR found in *Saccharomyces cerevisiae* (GB: Z49210).

MDR, multidrug resistance efflux pump.

Accession numbers: as for Table 1; SW, SwissProt.

TABLE 3. Initial rates of transport as determined by changes in ethidium bromide and proflavin fluorescence

Plasmid	Gene(s)	Rate (Δ fluorescence intensity/min)		Rate (Δ fluorescence intensity/s)					
		Ethidium transport		Proflavin transport					
		+ Formate	+ 20 μ M CCCP	- Formate	Relative ^a	+ Formate	+ 100 μ M CCCP	- Formate	Relative ^a
pPMRAB1	<i>pmrAB</i>	-1.20 \pm 0.23	-0.37 \pm 0.05	-0.19 \pm 0.04	2.3	0.93 \pm 0.12	0.069 \pm 0.005	0.046 \pm 0.013	4.9
pPMRAB2	<i>pmrAB</i>	-0.82 \pm 0.13	-0.62 \pm 0.09	-0.26 \pm 0.08	1.6	0.94 \pm 0.12	0.084 \pm 0.007	0.050 \pm 0.010	4.9
<i>E. coli</i>									
pUC18	-	-1.00 \pm 0.05	-0.34 \pm 0.03	-0.22 \pm 0.04	1.9	0.17 \pm 0.02	0.059 \pm 0.004	0.027 \pm 0.006	0.9
DH5 α	-	-0.52 \pm 0.09	-0.45 \pm 0.13	-0.23 \pm 0.03	1.0	0.19 \pm 0.04	0.077 \pm 0.004	0.037 \pm 0.007	1.0

^a Ratio + Formate of the recombinant relative to DH5 α .

FIGURE LEGENDS

Fig 1. Nucleotide sequences of genes *pmrA* and *pmrB*. The 5' end, of *pmrA* and *pmrB* initiation ATG and termination codons are indicated in bold. Two possible promoters (I, II) of *pmrA* and a transcriptional terminator are underlined.

Fig 2. Comparative genetic maps of the regions encoding the multidrug efflux loci *emrRAB* and *pmrAB*. Genes are represented as arrowed lines: (i) major facilitator superfamily (MFS), thick black; (ii) membrane fusion protein (MFP) family, thick striped; (iii) regulatory, thin black.

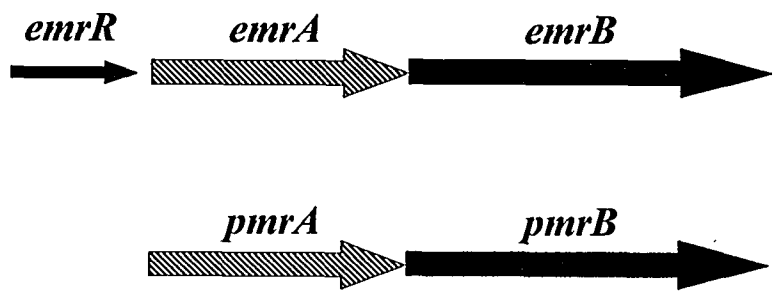
Fig 3. Multiple-sequence alignment of *H. influenzae* ErmA (identified as HmrA to distinguish from EmrA of *E. coli*), *E. coli* EmrA, and *P. aeruginosa* PmrA, members of the membrane fusion protein family (MFP). The black areas represent identical amino acids and the grey areas represent similar amino acids.

Fig 4. Multiple-sequence alignment of *H. influenzae* EmrB (identified as HmrB to distinguish from EmrB of *E. coli*), *E. coli* EmrB, and *P. aeruginosa* PmrB, members of the 14-TMS family of the MFS. The black areas represent identical amino acids and the grey areas represent similar amino acids. Highly conserved motifs are displayed below the alignment.

Fig 5. A) Hydrophobicity profile for the PmrB protein of *P. aeruginosa*. The upper and lower cutoffs are marked ($500 \leq H < 1000$). i represents in, o represents out on the hydropathy

plot. B) Two possible topologies for the PmrB protein based on the hydrophobicity plot. The putative transmembrane segment is shown in black. The number of Arg + Lys amino acids are shown above each polar segment.

Fig 6. Hypothetical two-dimensional model of the 14-TMS, *P. aeruginosa* multidrug resistance protein, PmrB inserted into the cytoplasmic membrane. Amino acids indicated represent conserved motifs A to F and H. Positions of the entry points into the cytoplasmic membrane are also indicated.



500bp
[]

HmrA 1 ~MTQIETENPSIKKSVSNKTRKKGLSIFILLLLIIGIACALYWFFFLKDF
 EmrA 1 ~MSANETQTPOQFVKKKSKRRLLELLITLLEIIIAVAIGIYWFVLRSHE
 PmrA 1 MNEEPTMTTANSEIPAGNPKRKRWLLILLAMIVLATLASVAWEFFYGRWH

HmrA 50 EETEDAYVGGNOVMVSSQVAGNVAKINADNMDKVFHAGDILVELDDTNAKI
 EmrA 50 EETDDAYVAGNQMQIMSQVSGSVTKVWADNDFVKEGGDLVTLDPDARQ
 PmrA 51 EDTDDAYINGNVVOITPOIVGTVVSIGADGDLVEKQQLVREDFPSADTI

HmrA 100 SFECAKSNLANAVROVEQLGFTVQOLOSAVHANEISLAQAQGNLAREVOL
 EmrA 100 AFEKAKTALASSVRCIHOIMINSKOLQANIEVOKTALAOACS DYNRRVPEL
 PmrA 101 ALORAEANLAHTVROVRCIFSNVDGYRAEVATRKKVALAKAEADYKREKNI

HmrA 150 EKMGAIDKESBOHAKAEVELAKANLNASKNQLAANQALLRNVPFREQPOI
 EmrA 150 GNANLIGRELOHARDAVTSACQALDVAIQOYNANOAMILGTRLEDOPAV
 PmrA 151 ADDGAIHQEELAHARDALDSAKASLTSSEQOLNTRRALVDDTQITSHEDV

HmrA 200 QNAINSLKQAWLNLEORTKIRSPIDGYVARRNVQVGOAVSVGCALMAVVSN
 EmrA 200 QQAATEVVRNAWLALERTRIISPMTGYVSRRAVQEGCAQISPTTELMAVVEA
 PmrA 201 KAAEAOLROAYLDDARSTIVAPVTGYVAKRSVOVGORVQFGNALMAVVEP

HmrA 250 EQMWLEANFKETQLTNNMRIGQPVKIHFEDLYGKNKEFDGVINGIEMGTGNA
 EmrA 250 TNMWVDANFKETQIANMRIGQPVTITTDIYGDDVKYTKGVVGLDMGTGSA
 PmrA 251 DOIWIDANFKETQLKHMRIGOPVEIRSDLYGSDVRYSGTVDSLGVGTGSA

HmrA 300 FSLLPSONATGNWIKVVQRPVRIKLDPOEFTETPLRIGLSATAKVRISD
 EmrA 300 FSLLPSONATGNWIKVVQRLPVRIELEDQKQLEQVPLRIGLSTLVSNTTN
 PmrA 301 FSLLPSONATGNWIKIVORVPVRIHIDPOELQKHEMIRIGLSMDVKVDLHD

HmrA 350 SSGAMIREKTEPKTLFSTDTLKYDES AVENLIESIIQONSH~~~~~
 EmrA 350 RDGQVLANKVRSTPVAVSTAREISLAFVNLKIDIVKANAG~~~~~
 PmrA 351 QSGPALAQPPREALFSTDVYQQQLASADKLIBERLIBANLAE DHGKTAQR

HmrB 1 MGNSAKKFPPIQGGALLLLTLALSLATFMQVLDSTIANVAIPTIAGDLGA
EmrB 1 ~~~~MQQKPLPGALVIMTIALSLATFMQVLDSTIANVAIPTIAGNLGS
PmrB 1 ~~~~MSESSSFSPPSLVMAITIGLSLATFMQVLDSTIANVALPTISGNLGV
Motif D1

HmrB 51 SFSQCTWVITSEFGVANAIPIPTGWLAKRVEGEVRLFLVSWLFFVSSWLC
EmrB 47 SLSQCTWVITSEFGVANAIPIPTGWLAKRVGEVKLFLWSTIAFAFASWAC
PmrB 47 SSEQGTWVITSEFAVSNAILPLTGWLARRVGEVRLFAAALFVLSFLC
Motif A

HmrB 101 GIADSLLEALIIFFRVIQGA VAGPVIPLSQSLLLNYPPEKRGMALAFWSMT
EmrB 97 GVSSSLNMLIFFRVIQGI VAGPLIPLSQSLLLNYPPAKRSIALALWSMT
PmrB 97 GIAQSMPSLVGFRALQGEVAGPLVPIITOTLLLSIYPPAKRGMALALLAMV
Motif B

HmrB 151 IVVAPIRGPILGGWISDNIHWGWIFFINVPIGLSVVLISWIKILGSRSEFI
EmrB 147 VIVAPICGPILGGYISDNYHWGWIFFINVPIGVAVVIMTLQTLRGRETIRT
PmrB 147 TVVAPIAGPILGGWITDDYSNHWIFFINVPVGLFAAFVYVYQOLKARPVVFI
Motif C Motif H

HmrB 201 VHQPIDKVGVLVLLVVGVCLOQLMLDQGREQDWFNSNEIITLAVVAVVCHI
EmrB 197 ERRRIDAVGLALLVIGIGSLQIMLDRGKELDWESSQEIITLTVVAVVAIC
PmrB 197 KKAEMDYVGLLALVVGVGALQIVLDKGNLDLDWFSNFIYGGALIAAATAA
Motif E

HmrB 251 ALVWELTDDNPVVDISLFHSRNFVSGCLCTSLAFLIYLGSVVLIPLLIQ
EmrB 247 FLIVWELTDDNPVDLSLFKSRNETIGCLCISLAYMLYFGAIVLLPOLLQ
PmrB 247 FFIWEFTNRHPIVNLRLEFAHRNFAAGTALAVLGYAAFFGINLLLPQWLC

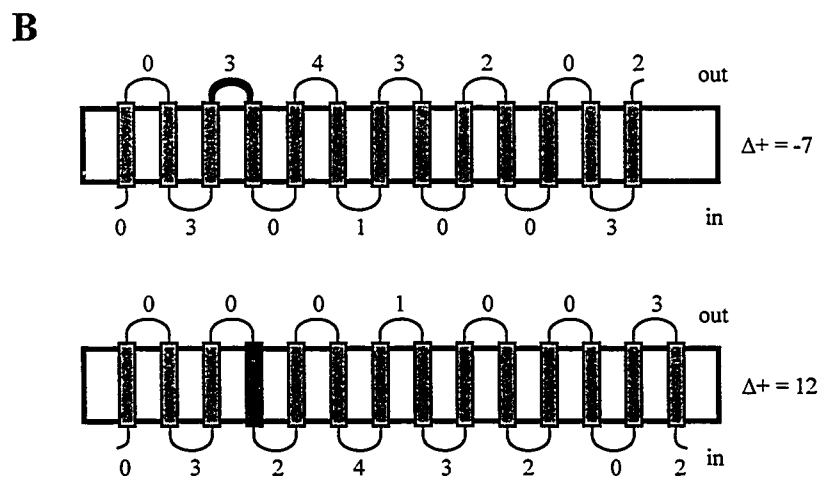
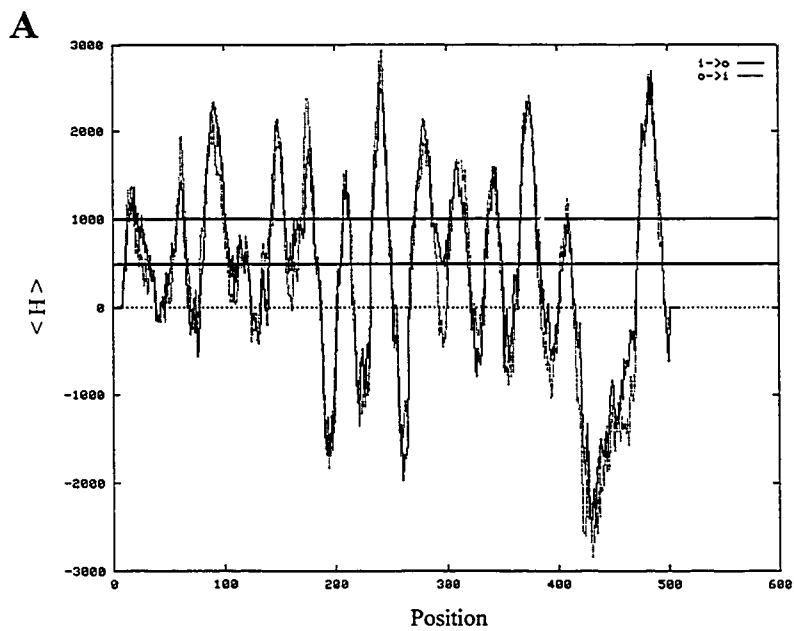
HmrB 301 QVREHYTATWAGLAASPVGLSPILLSPIIGRFYKIDMRILVTISFIVYAI
EmrB 297 EVYGYTATWAGLASAPVGIIPVILSPIIARFAHKLDMPRLVTFSEFIMYAV
PmrB 297 TOMGYTATWAGLAAAPIGILPVFLSPLVGRYANHFDLRMLAGLSELAMAI

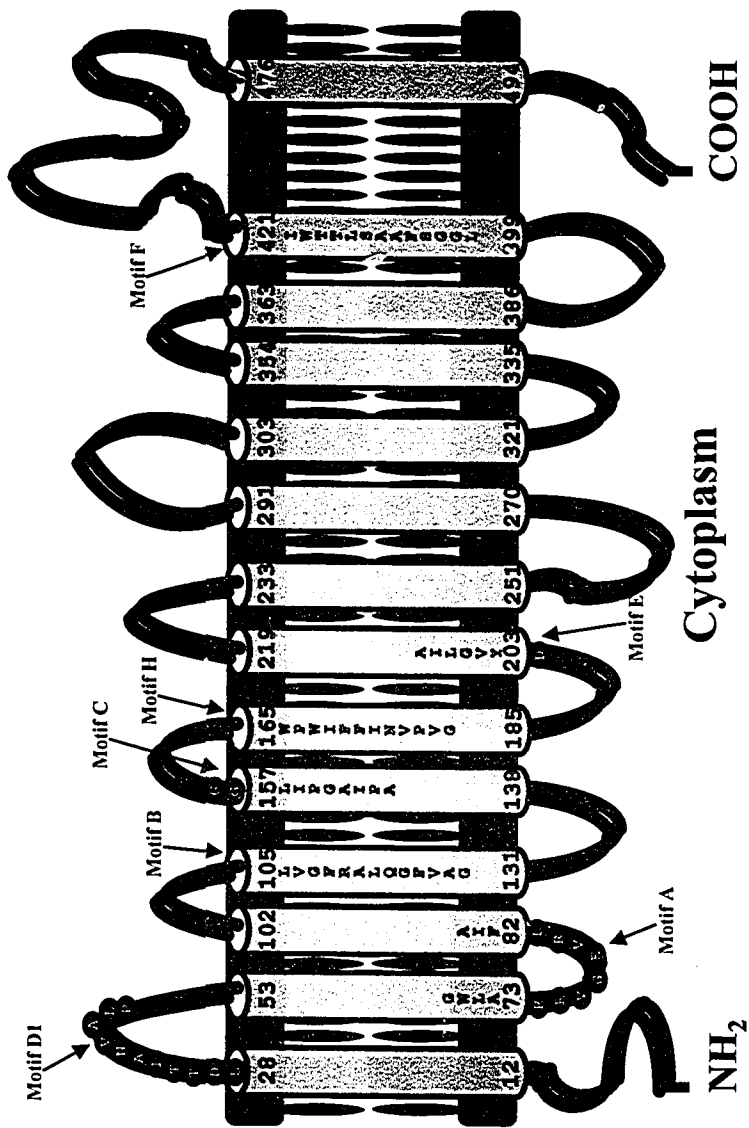
HmrB 351 TFYWRAYTFEFSMTFVDVALPOLVOGLAVSCFFMPLTTITLSGLPAHKMA
EmrB 347 CFYWRAYTFEFGMDFGASAWPQFIQGFVAVACFFMPLTTITLSGLPPERIA
PmrB 347 TCEMRA.NETTEVDYQHIAIVOLIMGLGVAFFMPLLSITLSDLPDDQIA
Motif F

HmrB 401 SASSLEFLRTRLAGSWGTSLTTEMMYNREAVHHTQLTEHINPYNPISQSF
EmrB 397 AASSLSNFRTRLAGSIGTSITTEMMYNRESMHHAQLTESVNPFPNPAQAM
PmrB 396 DSGSLATELRTLGGSPASLTTWVHRRATOHHAVALSDNESLYDE...AT

HmrB 451 YHQMNOEGLSDTQTSAYLAQQOITSQGFIIIGANEIWFWSAMGFLGLLIVIV
EmrB 447 YSOLLEGLGMTQOCASGWIAOOITNOGLIISANEIWFMSAGIFLVLGLVW
PmrB 443 HETLADLGGNTQANARLLDRMVQSOAYMMSITDYETMLGWLFLALLVIV

HmrB 501 FAKPPFGTQH~~~~~
EmrB 497 FAKPAFGAGGGGGGAH~
PmrB 493 LARPPFGAKPCAASGH





CHAPITRE 3

CONCLUSIONS

Nous avons isolé et caractérisé les gènes codant pour un système d'efflux chez *Pseudomonas aeruginosa*. Le transporteur semble avoir une affinité pour les substrats hydrophobes, tel le bromure d'éthidium et la proflavine. Ceci a été déterminé par un essai de transport de substrats à travers la membrane bactérienne.

Une stratégie rapide de criblage d'une banque de chromosomes bactériens artificiels (BACs) de 264 clones ayant des inserts >80 kb de *P. aeruginosa* a été développée. Ceci nous a permis l'identification de plusieurs gènes impliqués dans la pathogénie et la résistance chez *P. aeruginosa* (Dewar *et al.*, en impression). Une série de réactions PCR ont été faites avec des amorces spécifiques à un gène en particulier. La PCR a été utilisée avec l'ADN provenant de plusieurs recombinants dans un même tube ou avec l'ADN de clones individuels. Par cette méthode de criblage, deux BACs recombinants de 140 kb et 80 kb contenant le locus *pmrAB* chez *P. aeruginosa* ont été isolés. De plus, les BACs nous ont permis de compléter le séquençage du gène *pmrB* directement à partir de l'ADN des BACs recombinants isolés.

Les protéines PmrA et PmrB chez *P. aeruginosa*, démontrent des identités en acides aminés de 44% et 49% avec les protéines EmrA et EmrB chez *E. coli*. Ces protéines appartiennent à la famille des protéines de fusion membranaire (MFP) et à la superfamille des pompes majeures (MFS) (Lomovskaya et Lewis, 1992). La protéine PmrB chez *P. aeruginosa* appartient à la famille des MFSs puisque des études de comparaison des acides aminés démontrent des identités significatives (49%) avec les peptides de cette famille, contrairement aux protéines des familles RNDs et SMRs. De plus, PmrA contient plusieurs régions conservées ayant des identités de 100% avec la protéine EmrA chez *E. coli* et de la famille des MFPs.

La localisation des régions transmembranaires de la protéine PmrB a été prédite via le profil d'hydrophobicité et l'application des charges positives internes (positive-inside rule) (von Heijn, 1992). La revue de la littérature a démontrée que l'analyse faite sur 24 protéines dont les structures transmembranaires ont déjà été déterminées expérimentalement par l'application du positive-inside rule que 23 des 24 protéines étudiées ont été correctement localisées (von Heijn, 1992). La même approche a été employée pour la construction d'un modèle structural de la protéine PmrB basé sur 14-TMS.

Une étude approfondie de la séquence de la protéine PmrB a révélé plusieurs motifs conservés parmi les protéines à 14-TMS de la famille des MFSs. Ceci suggère que ces régions pourraient avoir un rôle essentiel chez les transporteurs MFSs. De plus, ces observations suggèrent que le modèle de la protéine PmrB, peut effectivement appartenir à la famille ayant 14-TMS chez les MFSs (Paulsen *et al.*, 1996).

Nous avons constaté aussi la présence de plusieurs prolines dans les régions transmembranaires 4, 6 et 10 du modèle proposé pour la protéine PmrB. La présence d'un tel acide aminé est rare dans des hélices α puisque les prolines ont un squelette rigide et n'ont pas un proton amide permettant de former des ponts hydrogènes stabilisant les hélices (Brandl et Deber, 1986). Une étude a démontré la présence de prolines dans les hélices α chez les protéines agissant comme transporteurs transmembranaires, contrairement aux protéines non-transporteurs transmembranaires (Brandl et Deber, 1986). Brandl et Deber (1986) suggèrent que cet acide aminé joue un rôle dans l'ouverture et la fermeture des pompes à efflux chez ces transporteurs. Cette hypothèse suggère une fonction probable, dont celle d'un transporteur transmembranaire, pour la protéine PmrB chez *P. aeruginosa*.

Pour confirmer la fonction biologique de la protéine PmrB, des études de transport ont été faites avec le bromure d'éthidium et la proflavine. Nos expériences ont démontré un faible niveau d'efflux du bromure d'éthidium, contrairement à la proflavine ou les niveaux d'efflux étaient cinq fois plus élevés que chez les cellules bactériennes ne contenant pas ces protéines. Ces deux substrats sont hydrophobes et semblables aux drogues transportées par EmrB chez *E. coli*. Une étude a démontré que EmrB confère un faible niveau de résistance au

bromure d'éthidium (Lomovskaya et Lewis, 1992), résultat tout à fait comparable au faible niveau de transport observé avec PmrB chez *P. aeruginosa*. En plus, la pompe à efflux PmrB a été inhibée en présence du carbonyle cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP), suggérant que la protéine est capable d'utiliser l'énergie de la force motrice proton-dépendante, comme les protéines QacA (Paulsen *et al.*, 1996) et EmrB, de la famille des MFSs.

Chez *P. aeruginosa* les seuls MDRs connus à ce jour appartiennent à la famille RND (Paulsen *et al.*, 1996; Poole *et al.*, 1996; Köhler *et al.*, 1997). Nous avons démontré que le locus *pmrAB* code pour deux protéines impliquées dans le transport transmembranaire chez *P. aeruginosa*. De plus, la protéine PmrB appartiendrait à la famille des 14-TMS des protéines MFSs. Ce système d'efflux isolé représente le seul MDR de la famille des MFSs à avoir été isolé chez *P. aeruginosa*. L'identification de ce nouveau MDR pourra peut être expliquer la résistance aux nouveaux antibiotiques dont le mécanisme de résistance n'est toujours pas connu et permettre le développement de molécules inhibitrices des pompes à efflux chez les bactéries.

RÉFÉRENCES

- Ahmed, M., L. Lyass, P. N. Markham, S. S. Taylor, N. Vazquez-Laslop, and A. A. Neyfakh. 1995. Two highly similar multidrug transporters of *Bacillus subtilis* whose expression is differentially regulated. *J. Bacteriol.* 177:3904-3910.
- Aldema, M. L., L. M. McMurry, A. R. Walmsley, and S. B. Levy. 1996. Purification of the Tn10-specified tetracycline efflux antiporter TetA in a native state as a polyhistidine fusion protein. *Mol. Microbiol.* 19:187-195.
- Allikmets, R., B. Gerrard, C. Stewart, M. White, and M. Dean. 1993. Identification of P-glycoprotein/multidrug resistance gene from model organisms. *Leukemia* 7(Suppl. 2):S13-S17.
- Allard, J. D., and K. P. Bertrand. 1992. Membrane topology of the pBR322 tetracycline resistance protein. TetA-PhoA gene fusions and implications for the mechanism of TetA membrane insertion. *J. Biol. Chem.* 267:17809-17819.
- Alton, N. K., and D. Vapnek. 1979. Nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance transposon Tn9. *Nature* 282:864-869.
- Ambudkar, S. V., V. Anantharam, and P. C. Maloney. 1990. UhpT, the sugar phosphate antiporter of *Escherichia coli*, functions as a monomer. *J. Biol. Chem.* 265:12287-12292.
- Angus, B. L., A. M. Carey, D. A. Caron, A. M. B. Kropinski, and R. E. W. Hancock. 1982. Outer membrane permeability in *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of a wild-type with an antibiotic supersusceptible mutant. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21:299-309.
- Aquilla, H., T. Link, and M. Klingenberg. 1987. Solute carriers involved in energy transfer of mitochondria from a homologous protein family. *FEBS Lett.* 212:1-9.
- Baev, N., G. Endre, G. Petrovics, Z. Banfalvi, and A. Kondorosi. 1991. Six nodulation genes of *ned* box locus 4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: *nedM* codes for D-glucosamine synthetase. *Mol. Gen. Genet.* 228:113-124.
- Becker, J. M., L. K. Henry, W. D. Jiang, and Y. Koltin. 1995. Reduced virulence of *Candida albicans* mutants affected in multidrug resistance. *Infect. Immun.* 63:4515-4518.
- Bissonnette, L., S. Champetier, J. P. Buisson, and P. H. Roy. 1991. Characterization of the nonenzymatic chloramphenicol resistance (*cmlA*) gene of the In4 integron of Tn1696: similarity of the product to transmembrane transport protein. *J. Bacteriol.* 173:4493-4502.
- Blanc, V., K. Slah-Bey, M. Folcher, and C. J. Thompson. 1995. Molecular characterization and transcriptional analysis of a multidrug resistance gene cloned from the pristinamycin-producing organism, *Streptomyces pristinaespiralis*. *Mol. Microbiol.* 17:989-999.

- Bolhuis, H., G. Poelarends, H. W. Vanveen, B. Poolman, A. J. M. Driessen, and W. N. Konings.** 1995. The lactococcal *lmrP* gene encodes a proton motive force-dependent drug transporter. *J. Biol. Chem.* **270**:26092-26098.
- Bolhuis, H., H. W. van Veen, B. Poolman, A. J. M. Driessen, and W. N. Konings.** 1997. Mechanisms of multidrug transporters. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**:55-84.
- Brandl, C. J., and C. M. Deber.** 1986. Hypothesis about the function of membrane-buried proline residues in transport proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**:917-921.
- Calamia, J., and C. Manoil.** 1990. *Lac* permease of *Escherichia coli*: topology and sequence elements promoting membrane insertion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:4937-4941.
- Castillo, G., H. J. Shen, and S. B. Horwitz.** 1995. A homologue of the mammalian multidrug resistance gene (*mdr*) is functionally expressed in the intestine of *Xenopus laevis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1262**:113-123.
- Chevereau, M., P. J. Daniels, J. Davies, and F. LeGoffic.** 1974. Aminoglycoside resistance in bacteria mediated by gentamicin acetyltransferase II, an enzyme modifying the 2'-amino group of aminoglycoside antibiotics. *Biochemistry* **13**:598-603.
- Cohen, S. P., H. Hachler, and S. B. Levy.** 1993. Genetic and functional analysis of the multiple antibiotic resistance (*mar*) locus in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:1484-1492.
- Cole, S. T.** 1987. Nucleotide sequence and comparative analysis of the *frd* operon encoding the fumarate reductase of *Proteus vulgaris*: extensive sequence divergence of the membrane anchors and absence of an *frd*-linked *ampC* cephalosporinase gene. *Eur. J. Biochem.* **167**:481-488.
- Davies, J.** 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **364**:375-382.
- Dewar, K., L. Sabbagh, G. Cardinal, F. Veilleux, F. Sanschagrín, B. Birren, and R. C. Levesque.** 1998. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 bacterial artificial chromosomes: Strategies for mapping, screening and sequencing 100 kb loci of the 5.9 Mb genome. *Microbial. Comp. Gen.* (in press).
- Dinh, T., I. T. Paulsen, and M. H. Saier, Jr.** 1994. A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **176**:3825-3831.
- Dong, Q., and M. Mergeay.** 1994. *Czr/cnr* efflux : a three-component chemiosmotic antiport pathway with a 12-transmembrane-helix protein. *Mol. Microbiol.* **14**:185-187.

Dudler, R., and C. Hertig. 1992. Structure of an *mdr*-like gene from *Arabidopsis thaliana*. Evolutionary implications. *J. Biol. Chem.* 267:5882-5888.

Endicott, J. A., and V. Ling. 1989. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu. Rev. Biochem.* 58:137-171.

Foote, S. J., J. K. Thompson, A. F. Cowman, and D. J. Kemp. 1989. Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*. *Cell* 57:921-930.

Gottesman, M. M., and I. Pastan. 1993. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annu. Rev. Biochem.* 62:385-427.

Gould, G. W., and G. I. Bell. 1990. Facilitative glucose transporters: an expanding family. *Trends Biochem. Sci.* 15:18-23.

Greener, T., D. Govzensky, and A. Zamir. 1993. A novel multicopy suppressor of *groEL* mutation includes two nested open reading frames transcribed from different promoters. *EMBO J.* 12:889-896.

Griffith, J. K., M. E. Baker, D. A. Rouch, M. G. P. Page, R. A. Skurray, I. T. Paulsen, K. F. Chater, S. A. Baldwin, and P. J. F. Henderson. 1992. Membrane transport proteins: implications of sequence comparisons. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 4:684-695.

Grinius, L., G. Dreguniene, E. B. Goldberg, C. H. Liao, and S. J. Projan. 1992. A staphylococcal multidrug resistance gene product is a member of a new protein family. *Plasmid* 27:119-129.

Grinius, L. L., and E. B. Goldberg. 1994. Bacterial multidrug resistance is due to a single membrane protein which functions as a drug pump. *J. Biol. Chem.* 269:29998-30004.

Hagman, K. E., W. Pan, B. G. Spratt, J. T. Balthazar, R. C. Judd, and W. M. Shafer. 1995. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the *mirRCDE* efflux system. *Microbiology* 141:611-622.

Henze, U. U., and B. Berger-Bachi. 1995. *Staphylococcus aureus* penicillin-binding protein 4 and intrinsic beta-lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:2415-2422.

Hickman, R. K., L. M. McMurry, and S. B. Levy. 1990. Overproduction and purification of the *Tn10*-specified inner membrane tetracycline resistance protein Tet using gene fusions to B-galactosidase. *Mol. Microbiol.* 4:1241-1251.

Higgins, C. F. 1995. The ABC of channel regulation. *Cell* 82:693-696.

- Hongo, E., M. Morimyo, K. Mita, I. Machida, H. Hama-Inaba, H. Tsuji, S. Hresko, R. C., M. Kruse, M. Strube, and M. Mueckler. 1994. Topology of the Glut 1 glucose transporter deduced from glycosylation scanning mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **269**:20482-20488.
- Hongo, E., M. Morimyo, K. Mita, I. Machida, H. Hama-Inaba, H. Tsuji, S. Ichimura, and Y. Noda. 1994. The methyl viologen-resistance-encoding gene *smvA* of *Salmonella typhimurium*. *Gene* **148**:173-174.
- Kaatz, G. W., S. M. Seo, and C. A. Ruble. 1993. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**:1086-1094.
- Kaback, H. R. 1992. The lactose permease of *Escherichia coli*: a paradigm for membrane transport proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1101**:210-213.
- Kaback, H. R., S. Frillingos, H. Jung, K. Jung, G. G. Privé, M. L. Ujwal, C. Weitzman, J. Wu, and K. Zen. 1994. The lactose permease meets Frankenstein. *J. Exp. Biol.* **196**:183-195.
- Kagan, B. L., T. Ganz, and R. I. Lehrer. 1994. Defensins: a family of antimicrobial and cytotoxic peptides. *Toxicology* **87**:131-149.
- Kandror, O., L. Busconi, M. Sherman, and A. Goldberg. 1994. Rapid degradation of abnormal protein in *Escherichia coli* involves chaperones GroEL and GroES. *J. Biol. Chem.* **269**:23575-23582.
- Köhler, T., M. Michéa-Hamzehpour, U. Henze, N. Gotoh, L. K. Curty, and J.-C. Pechère. 1997. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **23**:345-354.
- Leelaporn, A., I. T. Paulsen, J. M. Tennent, T. G. Littlejohn, and R. A. Skurray. 1994. Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci. *J. Med. Microbiol.* **40**:214-220.
- Levy, S. B. 1992. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:695-703.
- Lewis, K. 1994. Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme. *Trends Biochem. Sci.* **19**:119-123.
- Li, X.-Z., D. M. Livermore, and H. Nikaido. 1994. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: Resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**:1732-1741.

- Li, X.-Z., D. Ma, D. M. Livermore, and H. Nikaido. 1994. Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: active efflux as a contributing factor to β -lactam resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:1742-1752.
- Li, X.-Z., H. Nikaido, and K. Poole. 1995. Role of MexA-MexB OprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1948-1953.
- Li, X.-Z., L. Zhang, R. Srikumar, and K. Poole. 1998. β -lactamase inhibitors are substrates for the multidrug efflux pumps of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:399-403.
- Liesegang, H., K. Lemke, R. A. Siddiqui, and H. G. Schlegel. 1993. Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. *J. Bacteriol.* 175:767-778.
- Littlejohn, T.G., I. T. Paulsen, M. T. Gillespie, J. M. Tennent, M. Midgley, I. G. Jones, A. S. Purewal, and R. A. Skurray. 1992. Substrate specificity and energetics of antiseptics and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 95:259-266.
- Littlejohn, T. G., D. DiBerardino, L. J. Messerotti, S. J. Spiers, and R. A. Skurray. 1991. Structure and evolution of a family of genes encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *Gene* 101:59-66.
- Lloyd, A. D., and R. J. Kadner. 1990. Topology of the *Escherichia coli* UhpT sugar-phosphate transporter analyzed by using *TnphoA* fusions. *J. Bacteriol.* 172:1688-1693.
- Lomovskaya, O., and K. Lewis. 1992. *emr*, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:8938-8942.
- Lomovskaya, O., K. Lewis, and A. Martin. 1995. EmrR is a negative regulator of the *Escherichia coli* multidrug resistance pump EmrAB. *J. Bacteriol.* 177:2328-2334.
- Lyon, B. R., and R. A. Skurray. 1987. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiol. Rev.* 51:88-134.
- Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, and J. E. Hearst. 1993. Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175:6299-6313.
- Ma, D., D. N. Cook, M. Alberti, N. G. Pon, H. Nikaido, and J. E. Hearst. 1995. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 16:45-55.
- Ma, D., D. N. Cook, J. E. Hearst, and H. Nikaido. 1994. Efflux pumps and drug resistance in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* 2:489-493.

- Maiden, M. C. J., E. O. Davis, S. A. Baldwin, D. C. M. Moore, and P. J. F. Henderson. 1987. Mammalian and bacterial sugar transport proteins are homologous. *Nature* 325:641-643.
- Maloney, P. C. 1994. Bacterial transporters. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 6:571-582.
- Marger, M. D., and M. H. Saier, Jr. 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* 18:13-20.
- Midgley, M. 1986. The phosphonium ion efflux system of *Escherichia coli*: Relationship to the ethidium efflux system and energetics studies. *J. Gen. Microbiol.* 132:3187-3193.
- Morimyo, M., E. Hongo, H. Hama-Inaba, and I. Machida. 1992. Cloning and characterization of the *mvrC* gene of *Escherichia coli* K-12 which confers resistance against methyl viologen toxicity. *Nucl. Acids Res.* 20:3159-3165.
- Naroditskaya, V., M. J. Schlosser, N. Y. Fang, and K. Lewis. 1993. An *E. coli* gene *emrS* is involved in adaptation to low energy shock. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196:803-809.
- Neal, R. J., and K. F. Chater. 1987. Nucleotide sequence analysis reveals similarities between proteins determining methylenomycin A resistance in *Streptomyces* and tetracycline resistance in eubacteria. *Gene* 58:229-241.
- Newman, M. J., D. L. Foster, T. H. Wilson, and H. R. Kaback. 1981. Purification and reconstruction of functional lactose carrier from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 256:11804-11808.
- Neyfakh, A. A. 1997. Natural functions of bacterial multidrug transporters. *Trends Microbiol.* 5:309-313.
- Neyfakh, A. A., V. E. Bidnenko, and L. B., Chen. 1991. Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4781-4785.
- Neyfakh, A. A., C. M. Borsch, and G. W. Kaatz. 1993. Fluoroquinolone resistance protein NorA of *Staphylococcus aureus* is a multidrug efflux transporter. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:128-129.
- Nies, D. 1995. The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 177:2707-2712.
- Nies, D. H., A. Nies, L. Chu, and S. Silver. 1989. Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7351-7355.

Nikaido, H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets : permeability barriers and active efflux. *Science* 264:382-388.

Nikaido, H. 1996. Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 178:5853-5859.

Nikaido, H., and M. H. Saier, Jr. 1992. Transport proteins in bacteria: common themes in their design. *Science* 258:936-942.

Nishi, K., M. Yoshida, M. Nishimura, M. Nishikawa, M. Nishiyama, S. Horinouchi, and T. Beppu. 1992. A leptomycin B resistance gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a protein similar to the mammalian P-glycoproteins. *Mol. Microbiol.* 6:761-769.

Ocaktan, A., H. Yoneyama, and T. Nakae. 1997. Use of fluorescence probes to monitor function of the subunit proteins of the MexA-MexB-OprM drug extrusion machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 272: 21964-21969.

Obki, R., and M. Murata. 1991. *bmr3*, a third multidrug transporter gene of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 179:1423-1427.

Pan, W., and B. G. Spratt. 1994. Regulation of the permeability of the gonococcal cell envelope by *mtr* system. *Mol. Microbiol.* 11:769-775.

Paulsen, I. T., M. H. Brown, T. G. Littlejohn, B. A. Mitchell, and R. A. Skurray. 1996. Molecular characterization of the multidrug resistance proteins QacA and QacB: membrane topology and identification of residues involved in specificity for divalent cations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3630-3635.

Paulsen, I. T., R. A. Skurray, R. Tam, M. H. Saier, Jr., R. J. Turner, J. H. Weiner, E. B. Goldberg, and L. L. Grinius. 1996. The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol. Microbiol.* 19:1167-1175.

Paulsen, I. T., M. H. Brown, and R. A. Skurray. 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* 60:575-608.

Paulsen, I. T., M. H. Brown, S. J. Dunstan, and R. A. Skurray. 1995. Molecular characterization of the staphylococcal multidrug resistance export protein QacC. *J. Bacteriol.* 177:2827-2833.

Paulsen, I. T., T. G. Littlejohn, P. Rådström, L. Sundström, O. Sköld, G. Swedberg, and R. A. Skurray. 1993. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother.* 37:761-768.

Paulsen, I. T., J. H. Park, P. S. Choi, and M. H. Saier. 1997. A family of Gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 156:1-8.

Paulsen, I. T., and R. A. Skurray. 1993. Topology, structure and evolution of two families of proteins involved in antibiotic and antiseptic resistance in eukaryotes and prokaryotes-an analysis. *Gene* 124:1-11.

Pawagi, A. B., J. Wang, M. Silverman, R. Reithmeier, and C. M. Deber. 1994. Transmembrane aromatic amino acid distribution in P-glycoprotein-a functional role in broad substrate specificity. *J. Mol. Biol.* 235:554-564.

Peden, K. W. 1983. Revised sequence of the tetracycline-resistance gene of pBR322. *Gene* 22:277-280.

Poole, K. 1994. Bacterial multidrug resistance—emphasis on efflux mechanisms and *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 34:453-456.

Poole, K., N. Gotoh, H. Tsujimoto, Q. Zhao, A. Wada, T. Yamasaki, S. Neshat, J.-I. Yamagishi, X.-Z. Li, and T. Nishino. 1996. Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 21:713-724.

Poole, K., D. E. Heinrichs, and S. Neshat. 1993. Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. *Mol. Microbiol.* 10:5259-544.

Poole, K., K. Krebes, C. McNally, and S. Neshat. 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol.* 175:7363-7372.

Poole, K., K. Tetro, Q. Zhao, S. Neshat, D. E. Heinrichs, and N. Bianco. 1996. Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:2021-2028.

Purewal, A. S. 1991. Nucleotide sequence of the ethidium efflux gene from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 82:229-232.

Rasmussen, B. A., and K. Bush. 1997. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41:223-232.

Ronald, S., M. A. Farinha, B. J. Allan, and A. M. Kropinski. 1992. Cloning and physical mapping of transcriptional regulatory (σ) factors from *Pseudomonas aeruginosa*, p. 251. In E. Galli, S. Silver and B. Witholt (ed.), *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*. 1992. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- Rouch, D. A., D. S. Cram, D. DiBerardino, T. G. Littlejohn, and R. A. Skurray. 1990. Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline- and sugar-transport proteins. *Mol. Microbiol.* 4:2051-2062.
- Saier, M. H., Jr., R. Tam, A. Reizer, and J. Reizer. 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* 11:841-847.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Samuelson, J. C., A. Burke, and J. M. Courval. 1992. Susceptibility of an emetine-resistant mutant of *Entamoeba histolytica* to multiple drugs and to channel blockers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2392-2397.
- Sarkadi, B., M. Muller, L. Homolya, Z. Hollo, J. Sperodi, U. A. Germann, M. M. Gottesman, E. M. Price, and R. C. Boucher. 1994. Interaction of bioactive hydrophobic peptides with the human multidrug transporter. *FASEB J.* 8:766-770.
- Schmidt, T., and H. G. Schlegel. 1994. Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the *ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J. Bacteriol.* 176:7045-7054.
- Schweizer, H. P. 1998. Intrinsic resistance to inhibitors to fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is due to efflux: Application of a novel technique for generation of unmarked chromosomal mutations for the study of efflux systems. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:394-398.
- Someya, Y., Y. Moriyama, M. Futai, T. Sawai, and A. Yamaguchi. 1995. Reconstitution of the metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* in proteoliposomes including F₀F₁-ATPase. *FEBS Lett.* 374:72-76.
- Speer, B. S., N. B. Shoemaker, and A. A. Salyers. 1992. Bacterial resistance to tetracycline: Mechanism, transfer, and clinical significance. *Clin. Microbiol. Rev.* 56:395-411.
- Spratt, B. G. 1994. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 264:388-393.
- Stokes, H. W., and R. M. Hall. 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* 3:1669-1683.
- Takata, R., S. Osawa, K. Tanaka, H. Teraoka, and M. Tamaki. 1970. Genetic studies of the ribosomal proteins in *Escherichia coli*; Mapping of erythromycin resistance mutations which lead to alteration of a 50s ribosomal protein component. *Mol. Gen. Genet.* 109:123-130.

- Takiff, H. T., M. Cimino, M. C. Musso, T. Weisbrod, R. Martinez, M. B. Delgado, L. Salazar, B. R. Bloom, and W. R. Jacobs, Jr. 1996. Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:362-366.
- Taylor, D. E., Y. Hou, R. J. Turner, and J. H. Weiner. 1994. Location of a potassium tellurite resistance operon (*tehA*te*hB*) within the terminus of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 176:2740-2742.
- Tennent, J. M., B. R. Lyon, M. Midgley, I. G. Jones, A. S. Purewal, and R. A. Skurray. 1989. Physical and biochemical characterization of the *qacA* gene encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol. 135:1-10.
- Travis, J. 1994. Reviving the antibiotic miracle? Science 264:360-362.
- Turner, R. J., D. E. Taylor, and J. H. Weiner. 1997. Expression of *Escherichia coli* TehA gives resistance to antiseptics and disinfectants similar to that conferred by multidrug resistance efflux pumps. Antimicrob. Agents Chemother. 41:440-444.
- van Veen, H. W., K. Venema, H. Bolhuis, I. Oussenko, J. Kok, B. Poolman, A. J. Driessen, and W. N. Konings. 1996. Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:10668-10672.
- Varadhachary, A., and P. C. Maloney. 1991. Reconstitution of the phosphoglycerate transport protein of *Salmonella typhimurium*. J. Biol. Chem. 266:130-135.
- von Heijn, G. 1992. Membrane protein structure prediction: Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. J. Mol. Biol. 225: 487-494.
- Walter, E. G., J. H. Weiner, and D. E. Taylor. 1991. Nucleotide sequence and overexpression of the tellurite-resistance determinant from the IncIII plasmid pHH1508a. Gene 101:1-7.
- Wandersman, C., and P. Delepelaire. 1990. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4776-4780.
- Wu, C. T., M. Budding, M. S. Griffin, and J. M. Croop. 1991. Isolation and characterization of *Drosophila* multidrug resistance gene homologs. Mol. Cell. Biol. 11:3940-3948.
- Yamaguchi, A., K. Adachi, T. Akasaka, N. Ono, and T. Sawai. 1991. Metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* encoded by a transposon, Tn10. Histidine 257 plays an essential role in H⁺ translocation. J. Biol. Chem. 266:6045-6051.

Yamaguchi, A., N. Ono, T. Akasaka, T. Noumi, and T. Sawai. 1990. Metal-tetracycline/H⁺ antiporter of *Escherichia coli* encoded by a transposon, Tn10. The role of the conserved dipeptide Ser⁶⁵-Asp⁶⁶, in tetracycline transport. *J. Biol. Chem.* **256**:15525-15530.

Yamane, K., Y. Akiyama, K. Ito, and S. Mizushima. 1990. A positively charged region is a determinant of the orientation of cytoplasmic membrane proteins in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **265**: 21166-21171.

Yerushalmi, H., M. Lebendiker, and S. Schuldiner. 1995. EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H⁺ and is soluble in organic solvents. *J. Biol. Chem.* **270**:6856-6863.

Yoshimura, F., and H. Nikaido. 1982. Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes. *J. Bacteriol.* **152**:636-642.

ANNEXES

ANNEXE A

PSEUDOMONAS AERUGINOSA PAO1 BACTERIAL ARTIFICIAL
CHROMOSOMES: STRATEGIES FOR MAPPING, SCREENING AND
SEQUENCING 100 KB LOCI OF THE 5.9 MB GENOME

KEN DEWAR*¹, LAURENT SABBAGH¹, GUY CARDINAL¹, FRANÇOIS
VEILLEUX,¹ FRANÇOIS SANSCHAGRIN¹, BRUCE BIRREN² and ROGER C.
LEVESQUE**¹

1, Microbiologie Moléculaire et Génie des Protéines, Sciences de la Vie et de la Santé,
Faculté de Médecine, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada. G1K 7P4;

*2, Whitehead Institute, Center for Genome Research, 320 Charles St., Cambridge, MA
02141.

*Present address and 2,

**Corresponding author.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic bacterial pathogen frequently found in nosocomial infections and is a major cause of morbidity and mortality in patients with cystic fibrosis. To facilitate molecular studies of this organism, we have generated a bacterial artificial chromosome (BAC) library. Genomic DNA was isolated from the prototype strain PAO1, partially digested with *Hind*III, size selected after pulsed field gel electrophoresis, and used to construct BAC library using the pBeloBAC11 vector. DNAs from approximately 850 clones, representing more than 9.5-fold physical coverage of the 5.9 Mb PAO1 genome, were analyzed after *Spe*I and *Hind*III digestions and agarose gel electrophoresis. The BAC library had clones with insert fragments ranging from 20 to more than 290 kb. A subset of 264 BACs having inserts >80 kb, representing >4 genome equivalents, were re-arrayed into 96-well plates, and a clone pooling and PCR screening strategy was developed. The PCR library screening enabled the identification and recovery of BACs containing genes implicated in cell division and in cell wall biosynthesis, as well as a series of known genes mapping to different regions of the PAO1 chromosome. A physical and genetic map was constructed for the 98 kb pMOC5 BAC clone, which spans the entire *fts-mur* locus; chromosome walking from each end of the pMOC5 clone placed it within a contig spanning 243 kb. The BAC library and screening resources now allow a PCR-based screening of a *P. aeruginosa* genomic library for any gene of interest. The restriction fragment analysis of overlapping clones indicated that BAC clones stably maintain and propagate *Pseudomonas* DNA, providing evidence that the PAO1 BAC library is an appropriate reagent for genome sequencing.

INTRODUCTION

The current map of the *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1 chromosome lists the location of over 350 marker loci, including virulence and metabolic genes. The map has been built from data obtained from conjugation and transduction studies, and has been integrated with physical maps using a combination of cosmid clone analysis, macrorestriction site mapping, and pulsed field gel electrophoresis methods (Holloway et al., 1994; Römmling et al., 1989; Ratnaningsih et al., 1990; Römmling and Tümmler, 1991). Complete macrorestriction maps have been determined for the 38 *SpeI*, 15 *DpnI*, 6 *SwaI*, and 5 *PacI* sites, yielding an average resolution of 93 kb, and allowing a correlation between physical and genetic distances (Römmling and Tümmler, 1992).

In 545 *P. aeruginosa* strains, collected mainly from cystic fibrosis patients, macrorestriction fragment length diversity was sampled using probes of known map location on the PAO1 chromosome. A gradient of high to low linkage disequilibrium, from the origin of replication to the auxotroph-poor region was discovered, indicating that the recombination rate varies with chromosomal location (Römmling et al., 1995). Further, the effective rates of horizontal transfer and recombination for regions encoding housekeeping genes were lower than in regions encoding other gene products (Römmling et al., 1995).

Comparative genome mapping of the strain PAO1 and strain C, which is a major class in cystic fibrosis patients and aquatic habitats, positioned 48 *SpeI*, 8 *PacI*, 5 *SwaI*, and 4 *i-Ceu-I* sites onto the 6.5 Mb strain C chromosome (Schmidt et al., 1996). Comparison of the PAO1 and C physical and genetic maps revealed conservation of gene order between the two strains, and that the 600 kb difference between the two strains was accounted for by

insertions concentrated in three regions: two congruent with the ends of the biosynthetic gene rich region, and the third located in the proposed region of the replication terminus. In addition, the arrangement of *rnn* operons around the origin of replication was shown to be conserved in PAO1, C, and nine other strains (Schmidt et al., 1996).

The high level of conservation of gene order within *P. aeruginosa* strains indicates that more detailed mapping of PAO1 would also be representative for other strains of the species. As a first step in our *P. aeruginosa* bacterial genomics project, we developed a procedure allowing the rapid mapping of the PAO1 genome without linkage analysis (Liao et al., 1996). After DNA preparation, restriction enzyme digestion with *SpeI* and *DraI*, separation of the fragments by pulsed field gel electrophoresis, and Southern hybridization, we were able to physically map a collection of 40 markers, including 32 previously unmapped genes. Database analysis was used to design and synthesize DNA probes for the mapping of the *aro-2*, *dapB*, *envA*, *mexA*, *groEL*, *oprH*, *oprM*, *oprP*, *ponA*, *rpoB*, and *rpoH* PAO1 homologues. A PCR approach was used to clone and map the putative *yhhF*, *sucC*, *cypH*, *pbpB*, *murE*, *pbpC*, *soxR*, *fisA*, *fisZ*, and *envV* genes. Random sequencing of a PAO1 phagemid library, combined with database analysis, allowed the subsequent mapping of *acoA*, *catR*, *hemD*, *pheS*, *proS*, *oprD*, *pyo*, and *rpsB* gene homologues. A recent GenBank search of the more than 550 reports for *P. aeruginosa* revealed less than 30% have been mapped, indicating that there is excellent potential for further detailed mapping of the *P. aeruginosa* chromosome.

In a second phase of our *P. aeruginosa* genomics project, we have constructed a clone resource that can serve for fine detail mapping, as well as genomic sequencing. We have

constructed a bacterial artificial chromosome (BAC) library of approximately 850 clones, representing an estimated 9.5 X coverage of the PAO1 genome. A 264 clone subset, representing 4 X coverage, has been arrayed and pooled for PCR screening. Clones from several loci, including the *fts-mur* locus mapped in the 360 kb *SpeI* E fragment, have been identified and used to show that the BAC cloning system maintains the integrity of the *Pseudomonas* DNA inserts. Finally, we show an effective method for the mapping of any BAC of interest and show how it can be applied in a coordinated genome sequencing strategy.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains and Plasmids

The bacterial strain *P. aeruginosa* PAO1293, the prototype strain for preparation of genomic DNA for pulsed field gel electrophoresis is a derivative of PAO1, constructed using the transducing phage E79tv-2 and carries a mutation for chloramphenicol resistance (kindly provided by Dr. Bruce W. Holloway, Monash University, Australia), was used for the preparation of high molecular weight genomic DNA and BAC library construction. *E. coli* strain DH10B (Grant et al., 1990) was used as the recipient of recombinant BAC molecules following electroporation. The cloning vector, shown in Fig. 1, was pBeloBAC11 (kindly provided by Dr. Hiroaki Shizuya, California Institute of Technology, USA). DH10B transformants were selected as white versus blue colonies after growth on Tryptic Soy Agar (Difco) or LB agar plates supplemented with chloramphenicol (12.5 µg/ml), X-gal (50 µg/ml), and IPTG (1 mM).

BAC Library Construction

P. aeruginosa strain PAO1 DNA was prepared in agarose blocks following procedures in Birren and Lai (1993). The DNA was partially digested with *Hind*III and electrophoresed in preparative gels of 1% SeaPlaque (FMC Bioproducts), 1X TAE, at 6 V/cm for 20h at 14° C with a reorientation angle of 120° and a switch time of 10 s, using a CHEF-Mapper system (Bio-Rad). Without ethidium bromide staining, 5 mm slices across the separation range of 100 to 400 Kb were excised from the gel. Agarose sections of each slice,

containing approximately 1 µg of DNA were treated with agarase (Epicentre Technologies) and mixed with 25 ng pBeloBAC11 DNA that had been digested with *Hind*III and dephosphorylated with HK phosphatase (Epicentre Technologies). DNA to vector ligations were then performed following Sambrook et al. (1989). Ligation mixes were equilibrated with 0.5X TE by drop dialysis, then used to transform *E. coli* DH10B cells by electroporation (Sheng et al., 1995). Individual PAO1 BAC clones were selected as white colonies after growth on LB containing chloramphenicol, X-gal, and IPTG. Clones were grown in LB amended with chloramphenicol and 10% glycerol, then frozen at -80° C for long term storage. Clone DNAs were isolated by alkaline lysis (Sambrook et al., 1989), then analyzed after *Hind*III and *Spe*I digestion by field inversion agarose gel electrophoresis using a FIGE- Mapper apparatus (Bio-Rad).

DNA Sequencing and Oligo Synthesis

Sequencing gels were run on a 373 DNA Sequencer (Applied Biosystems) following sequencing reactions performed with ABI Prism DyeDeoxy kits with *Taq* FS (Perkin-Elmer). BAC clone preparations for sequencing were done using Qiagen Maxikits (Qiagen). Clones were grown to saturation in 100 ml LB containing chloramphenicol, then treated using a modified cell lysis solution (1 mg/ml lysozyme, 7.5 mM EDTA, 1% SDS) during the Qiagen BAC DNA protocol. BAC DNAs were eluted with five 1 ml aliquots of QF buffer at 65 °C, then DNA concentration was measured at OD260. Depending on the BAC insert size (<20 kb, 20-100 kb, >100 kb), 0.5, 1.5, or 3 µg of BAC DNA and 5, 10, or 15 pmoles of primer were used per sequencing reaction, respectively. Sequencing and PCR primers were synthesized on a Oligo1000 DNA synthesizer (Beckman) or Model 394 DNA/RNA

synthesizer (Applied Biosystems), then purified using the EasyPrep System Oligo Prep Kit (Pharmacia). The primers synthesized to amplify the 383 bp *ftsQ-ftsA* fragment were 5'-TTGCCGCTCTGCACGCTTGCC-3' and 5'-GCCCCGCTTGCATGGTCCACA-3'. The pBeloBAC11 *lacZ* primers used to amplify the 207 bp PCR product used as an internal control in library screening were 5'-GTTTCCCAGTCACGACG-3' and 5'-GAATTGAGCGGATAAC-3'.

Electrophoretograms were visualized on a Macintosh computer using the softwares Factura, Gene Navigator and AutoAssembler (ABI). DNA sequence analysis was done on a Sun Sparcs 1000C workstation with the Genetics Computer Group software packages (Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc.). Comparisons of sequences with the GenBank, European Molecular Biology Laboratory, and National Biomedical Research Foundation databases were done using FASTA and BLAST programs.

Library Pooling and PCR Screening

For library pooling, the 264 clones having >80 Kb inserts were grown to saturation in individual 1.5 ml cultures, and 100 µl aliquots were withdrawn for each pool. Pooled cultures were centrifuged for 2 min, after which the supernatants were discarded and the cells resuspended in 100 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8), 0.1 mM EDTA. Cells were lysed by incubation at 100 °C for 10 min, microfuged 2 min, then 10 µl was withdrawn from each pool for each PCR reaction. PCR was performed in 100 µl reactions in 1.5 mM MgCl₂, 1X PCR buffer (Gibco BRL) 5 pmoles of each primer, 200 µM dNTPs (Boehringer Mannheim) and 5 units *Taq* DNA polymerase (Gibco BRL). Amplifications were conducted in a programmable thermal cycler (Perkin-Elmer-Cetus) with an initial template denaturation at

94 °C for 7 min, then 25 cycles of 1 min denaturation at 95 °C, 1 min annealing at 50 °C, and 1 min extension at 72 °C. For each PCR reaction, 15 µl was electrophoresed in agarose gels, then visualized after ethidium bromide staining.

RESULTS

Construction of a PAO1 BAC Library

Following standard high molecular weight DNA techniques (Birren and Lai, 1993), PAO1 genomic DNA was isolated, partially digested with *Hind*III, and ligated into the pBeloBAC11 cloning vector (Fig. 1). The pBeloBAC11 map shown in Fig. 1 was assembled from the known vector sequences (GenBank accession number cvu51113), and shows the relevant vector characteristics and restriction enzyme sites. Fig. 1 also shows the positions of the two primer sites used in the PCPB as an internal control. After ligation of PAO1 genomic DNA into the pBeloBAC11 *Hind*III cloning site, recombinant molecules were transformed into *E. coli* DH10B via electroporation (Sheng et al., 1995). A collection of approximately 850 clones were picked after ligations with three different size fractions of PAO1 DNA. DNAs were prepared from all clones, digested with *Hind*III and *Spe*I, then analyzed after field inversion gel electrophoresis. Fig. 2 shows a sample of 23 PAO1 BAC clones after *Hind*III digestion and CHEF electrophoresis. Lanes 5 to 27 show that each PAO1 clone DNA has the 7.5 kb pBeloBAC11 vector fragment, as well as PAO1 insert fragments of various sizes. The sum of *Hind*III fragments for each clone indicated that DNA inserts of up to at least 140 kb were routinely present in the PAO1 BAC library. Comparing PAO1 BAC insert DNAs to PAO1 genomic DNA completely digested with *Hind*III (Fig. 2, lane 4) showed a similar size range of *Hind*III fragments, and indicated that even the largest PAO1 *Hind*III genomic fragments had been successfully cloned and were present in the PAO1 BAC library. Having insert size information for every clone allowed the library to be subdivided and categorized by insert size class. A set of 264 clones with inserts of 80 kb or greater was

selected and re-arrayed into 96-well microtiter plates. Theoretically, this collection of clones represented a more than 4-fold physical coverage of the PAO1 genome. Using the Poisson calculation $P = e^{-c}$, screening this subset would give at least a 98% chance of finding at least one BAC clone spanning any locus of interest.

Library Pooling and PCR Screening

To enable a rapid and efficient library screening procedure, all 264 >80 kb PAO1 BAC clones were recultured and pooled as shown in Fig. 3. The highest level was composed of eleven pools of 24 BAC clones each. For each first level pool, the 24 clones were reorganized into 4 second level pools of 6 BACs each. Every pool also contained an aliquot of a non-recombinant (vector only) culture to serve as a positive control for PCR. Using this pooling scheme, the eleven first level pools could be screened by PCR, after which only the sets of second level pools corresponding to first level positives would be screened. At the third level, the individual BACs for each positive second level pool would be screened to identify the correct clones.

The PCR library screening method was tested using primers flanking the *ftsQ-ftsA* region (Fig. 4). In the initial round of screening, two of the eleven first level pools allowed the amplification of the correctly sized product (Fig. 4, Panel A). Subsequent testing of the two sets of second level pools gave three positive reactions (Fig. 4, Panel B). PCR testing was then performed on the 18 individual BACs within the three second level pools, and three BAC clones were identified (Fig. 4, Panel C). The inclusion of non-recombinant vector DNA in every screening reaction was used to confirm that the PCR reactions worked

properly. The additional positive and negative controls confirmed that the appropriate fragment was being amplified.

The PAO1 BAC library was subsequently PCR screened to identify BACs spanning several loci of interest (Table 1). Using primer pairs designed to screen for *bvg*, *emrB*, *phaC*, *piVX*, *pilA*, and *lgtD* homologues, a range of 1 to 8 BACs were recovered for each screen. PCR primers were also designed from each end of a BAC (pMOC5) spanning *ftsQ-ftsA*, and used to screen the PAO1 BAC library. The results of the nine library screens summarized in Table 1 show a total of 31 BAC clones isolated, giving an average of 3.4 BACs/screen.

Comparisons of Overlapping Clones and Chromosome Walking

PCR screening of the PAO1 BAC library with the *ftsQ-ftsA* primer pair led to the recovery of 3 BAC clones, including the clone pMOC5. In a subsequent library screen with a primer pair derived from the 5' end of the pMOC5 insert, pMOC5 and two other clones identified in the *ftsQ-ftsA* screen were re-recovered, as well as two new overlapping clones. Library screening with a 3' end pMOC5 primer pair also led to the re-recovery of pMOC5, but also identified two more overlapping clones. The results obtained with the seven clones in the extended *ftsQ-ftsA* region are presented in Fig. 5. *Hind*III digestions of the clone DNAs (Panel A) showed that each clone had the appropriate 7.5 kb vector fragment, as well as many similarly sized fragments shared between various members of the group of clones. Every fragment present in the pMOC5 clone (Lane 3) was present in at least one other clone, indicating that the library redundancy was high enough that pMOC5 was completely overlapped by other clones. PCR analysis of the clone DNAs with the pMOC5 end primer pairs (Panel B)

reconfirmed the overlap relationships between pMOC5 and the other six clones. Southern hybridizations of the PCR amplified pMOC5 end fragments to the gel shown in Panel A showed that the pMOC5 3' end (shown as "R" in Panel C) was present within a 13 kb *HindIII* fragment, and that the pMOC5 5' end (shown as "U") was present in a 1.5 kb fragment. The *HindIII* restriction fragment patterns and PCR/Southern overlap information were used to construct a physical map of the 243 kb region surrounding the *ftsQ-ftsA* loci (Panel D). All restriction fragments of all clones were accounted for in the map, and the portion of the map corresponding to the 98 kb pMOC5 clone was in complete agreement with a pMOC5 physical map constructed independently by the sequence analysis of junction sites (see below).

Physical Mapping of pMOC5 by Junction Site Sequencing

As a result of PCR screening, the 98 kb pMOC5 BAC was identified as containing the *ftsQ*, *ftsA*, and *ftsZ* loci. The pMOC5 *HindIII* restriction fingerprint contained 9 fragments sized at 1.5, 2.0, 3.0, 3.1, 12, 13, 17, 20, and 26 kb, that totalled 98 kb for the clone (Fig. 5). An aliquot of 250 ng of pMOC5 DNA was digested to completion with *HindIII* and diluted to approximately 20 ng/ul, then religated and used to transform *E. coli* DH10B. Recombinant white colonies were screened after DNA purification, *HindIII* digestion, and gel analysis to recover the set of subclones containing single *HindIII* insert fragments. A full set of nine subclones (Fig. 6), each containing a different pMOC5 *HindIII* fragment, were recovered and end sequenced using forward and reverse primers flanking the *HindIII* cloning site in pBeloBAC11. The end sequences were trimmed of vector and those of poor quality, then compared to existing databases using BLAST. The presence of *HindIII* sites within the

coding sequences of known genes allowed the ordering and assembly of the pMOC5 *Hind*III fragments. For example, one end of the 1.5 kb fragment and an end of the 20 kb fragment had sequences matching portions of a ribonucleotide transport ATP-binding (*mkl*) protein ortholog. Using this approach, junction sequences were identified and a *Hind*III map of pMOC5 was assembled (Fig. 7). Direct sequencing of pMOC5 DNA with primers derived from subclone end sequences was subsequently performed to confirm the assembly of the map. After using PCR to position the PAO1 cell division and cell wall biosynthesis genes on the 20 kb pMOC5 *Hind*III fragment, the pMOC5 map showed that the entire clone flanks the locus by at least 26 kb on one side and 42 kb on the other (Fig. 7).

DISCUSSION

Large insert DNA clone libraries are important for the construction of physical maps across large regions, for map-based cloning, and for the screening and recovery of clones spanning loci of interest. The cloning and stable maintenance of 100-300 kb fragments of human DNA in *E. coli* has been shown possible using the single copy vectors BAC (Shizuya et al., 1992) and PAC (Iannou et al., 1994). Using vectors based on the *E. coli* F factor (Kim et al., 1992; Shizuya et al., 1992), it has been shown that human genomic DNA fragments are maintained with a high degree of structural stability, even after hundreds of generations of serial growth. BACs have been used to build a human chromosome 2 library (Wang et al., 1994), to build paths of contiguous clones across portions of human chromosome 22q (Kim et al., 1996), and to clone and map a 630 kb human extrachromosomal structure (Wang et al., 1996). BACs have also been used to construct large insert DNA clone libraries for other animal and plant species (Woo et al., 1994; Wang et al., 1995; Choi et al., 1995). The high cloning efficiency, easy manipulation of clones and clone libraries, and low frequency of chimerism and rearrangement have made BACs a favoured resource for physical genome analysis, including genome sequencing. Given the inherent advantages of large insert size and clone stability, the BAC cloning system has also begun to be used in bacterial genomics projects (Diaz-Perez et al., 1997).

Compared to phagemid, lambda, or cosmid libraries, we reasoned that the BAC system would more faithfully represent the 5.9 Mb 67% G+C rich *P. aeruginosa* chromosome. Genes controlling cell division and cell wall biosynthesis have been difficult to maintain in *E. coli* hosts, as they can affect host cell growth and organization. Single copy BACs,

however, might allow a better representation of the PAO1 genome, especially for regions giving lethal or sub-lethal phenotypes. In addition, the development of a PAO1 large insert DNA clone resource would be invaluable in chromosome mapping, and could serve as a future reagent for genome sequencing and for functional genomics.

In cloning three size fractions of PAO1 genomic DNA, we obtained and sized almost 850 independent clones. Compared to complete *Hind*III digests of PAO1 genomic DNA, we observed BACs containing the appropriate size range of fragments. The observation of even the largest PAO1 *Hind*III fragments in clones of the PAO1 BAC library (Fig. 2) presented evidence that the complete genome could be contained within the library. Based on the measurements of insert sizes, the entire PAO1 BAC library represents a 9-fold coverage of the PAO1 genome. We selected a subset of 264 >80 kb insert BACs, representing 4 X genome coverage, and used these clones to develop a hierarchical series of clone pools that could be screened by PCR. The PCR screening approach employed a simple pooling scheme where pools of approximately 0.36 X genome equivalents were screened at the first level, after which the clones from the negative pools were excluded from subsequent screening. Using the *ftsQ-ftsA* screen as an example, over 80% of the library was eliminated after the first eleven PCR reactions. During nine successive PCR screenings of the PAO1 BAC library (Table 1), a total of 31 clones were independently recovered. Compared to the predicted 4 X coverage, the average recovery of 3.4 clones/screen indicated that the PCR screening approach was recovering most, if not all, the positive clones within the library. Finally, the use of BAC clone cultures as the PCR template, rather than purified BAC DNAs, resulted in an extremely convenient and powerful library screening technique.

After screening for *ftsQ-ftsA* and walking from the ends of a *ftsQ-ftsA* BAC clone (pMOC5), we were able to construct a seven clone contig spanning approximately 243 kb (Fig. 5). The ability to recover multiple independent clones per screen and the resolving power of field inversion gel electrophoresis allowed us to show that every *HindIII* fragment in pMOC5 was also present in independent clones. Being able to account for every *HindIII* fragment in overlapping clones, and confirming the physical map by an independent means (Fig. 7), has provided strong evidence that the BAC cloning system is able to stably maintain and propagate *Pseudomonas* DNA inserts.

Finally, most of the 5.9 Mb genome sequences (83%) are available as raw data at two web sites, <http://www.pseudomonas.com> (from PathoGenesis Corporation, Seattle) and at <http://www.cmcbl.uq.edu.au/aeruginosa>. At the 6th International *Pseudomonas* Meeting in Madrid, Spain, it has been decided to form a volunteer committee, to assist in *P. aeruginosa* genomic analysis and development of useful genetic tools. The initial committee shall be composed of Dr. Rick Garber, Pathogenesis Corp., Seattle, WA, Dr. John Mattick, University of Queensland, Brisbane, Australia, Dr. Roger C. Levesque, Laval University, Quebec City, Canada; Dr. Dennis Ohman, University of Tennessee, Tennessee; Dr. Bob Hancock, University of British Columbia, Vancouver, Canada, and Dr. Burkhardt TÜMMLER, Hannover, Germany. This volunteer committee will establish a central facility for genomic analysis that will serve to integrate the information developed by the *Pseudomonas* community and to ensure that it is rapidly introduced into a publicly accessible web site. The volunteer committee will co-opt other volunteers from the *Pseudomonas* community to assist in these efforts.

ACKNOWLEDGMENTS

We express our gratitude to R. W. Hancock, UBC, Vancouver, BC for his constant encouragement, support and suggestions for this project; B. Dougherty, TIGR, for helpful comments on BAC mapping and sequencing and J. Mattick and M. Hobbs, AGFR, Univ. Queensland, Australia, for their support and collaboration. This work was funded by a grant to R.C.L. from the Centers of Excellence via the Canadian Bacterial Diseases Network. R.C.L. is a Research Scholar of Exceptional Merit from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec.

REFERENCES

BIRREN, B., and LAI, E. (1993). *Pulsed Field Gel Electrophoresis. A Practical Guide*. 253 pp. (Academic Press, N. Y.).

CHOI, S., CREELMAN, R. A., MULLET, J. E., and WING, R. A. (1995). Construction and characterization of bacterial artificial chromosome library of *Arabidopsis thaliana*. *Weeds World 2*: 17-20, and *Plant Mol. Biol. Rep.* **13**, 124-128.

DIAZ-PEREZ, S., ALATRISTE-MONDRAGON, F., HERNANDEZ, R., BIRREN, B., and GUNSALUS, R.P. (1997). Bacterial artificial chromosome (BAC) library as a tool for physical mapping of the archeon *Methanosarcina thermophila* TM-1. *Microb. & Comp. Gen.* **2**, 275-286.

GRANT, S. G. N., JESSEE, J., BLOOM, F. R., and HANAHAN, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4645-4649.

HOLLOWAY, B. W., RÖMLING, U., and TÜMMLER, B. (1994). Genomic mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Microbiology* **140**, 2907-2929.

IOANNU, P.A., AMEMIYA, C.T., GARNES, J., KROISEL, P.M., SHIZUYA, H., CHEN, C., BATZER, M.A., and DE JONG, P.J. (1994). A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nature Genetics* **6**, 84-89.

KIM, U.-J., SHIZUYA, H., DE JONG, P.J., BIRREN, B., and SIMON, M. I. (1992). Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in an F factor based vector. *Nucleic Acids Res.* **20**, 1083-1085.

KIM, U.-J., SHIZUYA, H., KANG, H.-L., CHOI, S.-S., GARRETT, C. L., SMINK, L. J., BIRREN, B., KORENBERG, J. R., DUNHAM, I., and SIMON, M. (1996). A bacterial artificial chromosome-based framework contig map of human chromosome 22q. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6297-6301.

LIAO, X., CHARLEBOIS, I., OUELLET, C., MORENCY, M.-J., DEWAR, K., LIGHTFOOT, J., FOSTER, J., SIEHNEL, R., SCHWEIZER, H., LAM, J., HANCOCK, R. W., and LEVESQUE, R. C. (1996). Physical mapping of 32 genetic markers on the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 chromosome. *Microbiology* **142**, 79-86.

RATNANINGSIH, E., DHARMSTHITI, S., KRISHNAPILLAI, V., MORGAN, A., SINCLAIR, M., and HOLLOWAY, B.H. (1990). A combined physical and genetic map of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Journal of General Microbiology* **136**, 2351-2357.

RÖMLING, U., GROTHUES, D., BAUTSCH, W., and TÜMMLER, B. (1989). A physical genome map of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *EMBO J.* **8**, 4081-4089.

RÖMLING, U. and TÜMMLER, B. (1991). The impact of two dimensional pulsed-field gel electrophoresis techniques for the consistent and complete mapping of bacterial genomes: refined physical mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3199-3206.

RÖMLING, U., and TÜMMLER, B. (1992). A *PacI/SwaI* map of the *Pseudomonas aeruginosa* PAO chromosome. *Electrophoresis* **13**, 649-651.

RÖMLING, U., GREIPEL, J., and TÜMMLER, B. (1995). Gradient of genomic diversity in the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *Mol. Microbiol.* **17**, 323-332.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., and MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed.(Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York).

SCHMIDT, K.D., TÜMMLER, B., and RÖMLING, U. (1996). Comparative genome mapping of *Pseudomonas aeruginosa* PAO with *P. aeruginosa* C, which belongs to a major clone in Cystic Fibrosis patients and aquatic habitats. *J. Bacteriol.* **178**, 85-93.

SHENG, Y., MANCINO, V., and BIRREN, B. (1995). Transformation of *E. coli* with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic Acids Res.* **89**, 1990-1996.

SHIZUYA, H., BIRREN, B., KIM, U.-J., MANCINO, V., SLEPAK, T., TACHIRI, Y. and SIMON, M. (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 8794-8797.

SOUTHERN, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503-517.

WANG, M., CHEN, X.-N., SHOUSE, S., MANSON, J., WU, Q., LI, R., WRESTLER, J., NOYA, D., SUN, Z.-G., KORENBERG, J., and LAI, E. (1994). Construction and characterization of a human chromosome 2-specific BAC library. *Genomics* **24**, 527-534.

WANG, G.-L., HOLSTEN, T. E., SONG, W., WANG, H.-P., and RONALD, P. C. (1995). Construction of a rice bacterial artificial library and identification of clones linked to the Xa21 disease resistance locus. *Plant J.* **7**, 525-533.

WANG, M., SHOUSE, S., LIPES, B., KIM, U.-J., SHIZUYA, H., and LAI, E. (1996). Bacterial artificial chromosome cloning and mapping of a 630-kb human extrachromosomal structure. *Genome Res.* **6**, 612-619.

WOO, S.-S., JIANG, J., GILL, B.S., PATERSON, A.H., and WING, R.A. (1994). Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4922-4931.

Wang, G.-L., Holsten, T. E., Song, W., Wang, H.-P., and Ronald, P. C.(1995). Construction of a rice bacterial artificial library and identification of clones linked to the Xa21 disease resistance locus. *Plant J.* 7:525-533.

Table 1. Characteristics of selected BAC clones obtained by PCPB

Genes	Relevant characteristics	BACs isolated	BAC Sizes (kb)
<i>bvg</i> ortholog	virulence gene regulator	4	120, 140, 120,100
<i>ftsQ-ftsA</i>	cell division and septation	3	98, 120 190
<i>emrB</i> ortholog	multidrug resistance efflux pump	2	140, 80
<i>phaC</i>	polyester biosynthesis	1	130
<i>pilVX</i>	fimbrial biogenesis	4	150, 90, 100, 200
<i>pilA</i>	fimbrial assembly	8	130, 120, 105, 90, 80, 110, 85, 140
<i>lgtD</i> ortholog	lipopolysaccharide biosynthesis	1	120
5' of pMOC5	BAC chromosome mapping	5	98, 108, 120, 80, 190
3' of pMOC5	BAC chromosome mapping	3	98, 80, 95
		31	

Specific primer pairs were selected from sequences available in GenBank or from sequence data determined in the laboratory (available upon request). BAC sizes were estimated by the sum of *Hind*III restricted DNA fragments separated by FIGE or by pulsed field gel electrophoresis and includes the vector (Birren and Lai, 1993; Birren and Lai, 1994).

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Physical and genetic map of the bacterial artificial chromosome (BAC) vector pBeloBAC11 (GenBank accession number cvu51113). The BAC vector contains *D*, *rep* and *sopA*, *sopB* and *sopC* genes from the F plasmid, a chloramphenicol resistance (*cat* gene) selectable marker, allows β -galactosidase selection for phenotypic screening of blue versus white colonies, the *Hind*III and *Bam*HI cloning sites, T7 and SP6 sites for probe preparations and *cosN*, *loxP* and *Not*I sites to facilitate mapping. Unique restriction endonuclease sites are indicated. Primers 1 and 2 indicated in bold give a 207 bp product used as a positive PCR control.

FIG. 2. Analysis of PAO1 BAC clone DNAs digested with *Hind*III and separated by pulsed field gel electrophoresis. Lanes: 1, 49.5 kb λ DNA; 2, GIBCO-BRL 5 kb ladder; 3, Pharmacia mid-range 25 kb ladder; 4, PAO1 genomic DNA digested to completion with *Hind*III; 5 to 27, PAO1 BAC clone DNAs digested with *Hind*III.

FIG. 3. Schematic representation of the PCR-based method developed for screening the 4 X library of 264 BAC clones.

FIG. 4. Agarose (1%) gel electrophoresis of amplified products obtained from the PCR-based cloned method used for screening and showing positive BAC pools (steps 1 and 2) and individual clones (step 3) when using the *ftsQ-ftsA* primer pair. Pooled (steps 1 and 2) and individual (step 3) BACs containing the 383 bps *ftsQ-ftsA* product and the 207 bps pBeloBAC11 amplified products are indicated by arrows. A, Step 1; lanes 1, GIBCO-BRL

100 bps ladder; 2 to 12, pooled BAC DNAs; 13, positive PCR control using pMON2002 DNA encoding the *ftsQ-ftsA* region; 14, Negative PCR control without DNA;

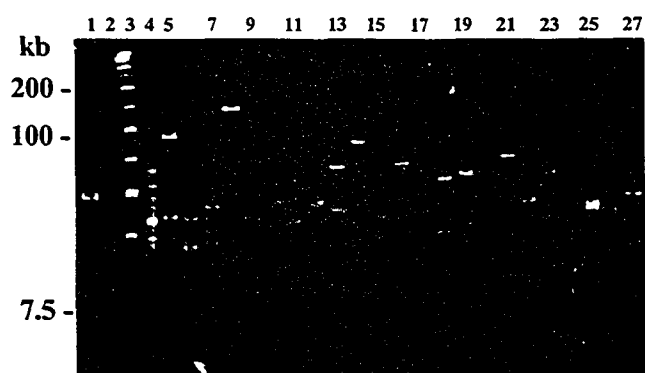
B, Step 2; lanes 1, 100 bps ladder; 2 to 9 pooled BAC DNAs; 10, Negative PCPB control without DNA; 11, positive PCPB control using pMON2002 DNA encoding the *ftsQ-ftsA* region; C. Step 3; lanes 1, 100 bps ladder; 2 to 19, individual BAC DNAs; 20, positive PCPB control using pMON2002 DNA encoding the *ftsQ-ftsA* region; 21, Negative PCR control without DNA.

Fig. 5. A) FIGE electrophoresis of BAC DNAs digested with *Hind*III identified by PCR using primer pairs selected from the nucleotide sequences at the 5' and the 3' ends of the insert in pMOC5 (Table 1). Lanes: 1, pMNA370; 2, pMNB14; 3, pMOC5; 4, pMNB4; 5, pMHF10; 6, pMOD17; 7, pMNA13; 8, pBELOBAC11; 9, λ *Hind*III DNA marker (New England Biolabs Inc.). The U symbol indicates the pMOC5 extremity containing the sequence of the universal primer in pBeloBAC11 and flanked by the 1.5 kb *Hind*III DNA fragment. The primer pair used to find overlapping BACs were: MOC5UNIV_UP (5'-CTTCCACCTTCAGCAGCAGTC-3') and MOC5UNIV_LOW (5'-TCTTCCACCACGGTAACTTG-3'). The R symbol represents the pMOC5 extremity containing the reverse primer in pBeloBAC11 and flanked by the 13 kb *Hind*III DNA fragment. The PCR was done using MOC5REV_UP (5'-CACCAACTGCTGTTCCATCAG-3') and MOC5REV_LOW (5'-TTCCCCTTCACAGGTTTTTCAC-3') primer pairs; B) Agarose gel (1%) electrophoresis of PCR products obtained using the MOC5UNIV_UP/MOC5UNIV_LOW (identified by the Univ abbreviation) and with the MOC5REV_UP/MOC5REV_LOW (identified by the Rev abbreviation) primer pairs with BAC DNAs overlapping pMOC5. Lanes: 1, pMNA370; 2, pMNB14; 3, pMOC5; 4, pMNB4; 5, pMHF10;

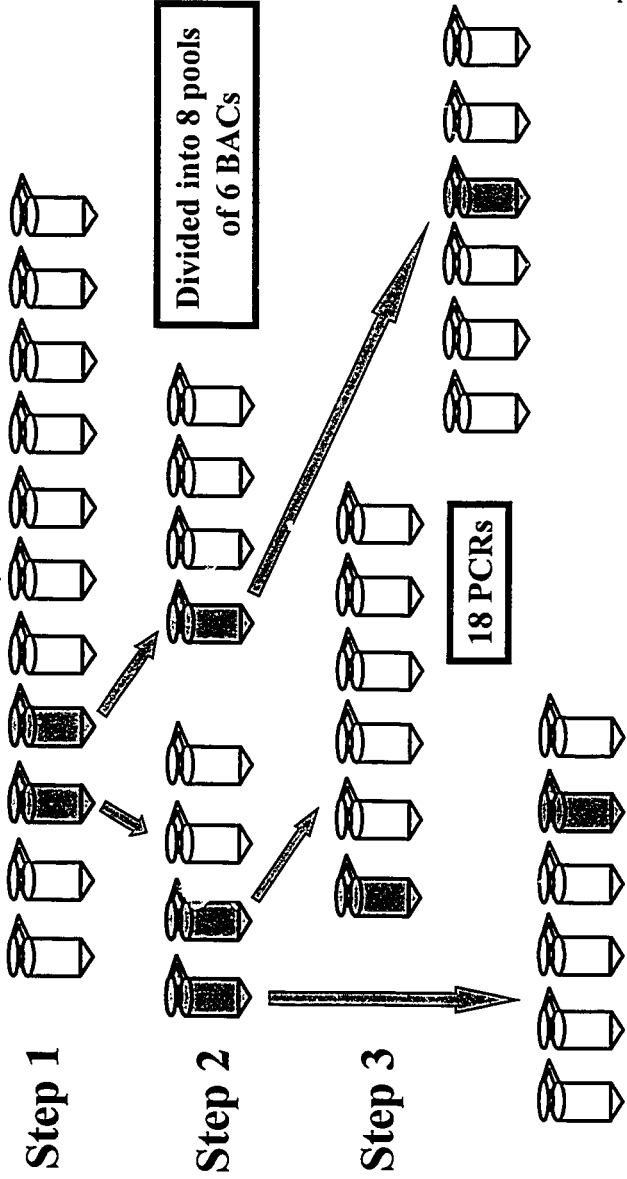
; 6, pMOD17; 7, pMNA13: the positive (+) and negative (-) controls were pMOC5 DNA and without DNA, respectively; C) Southern-type hybridization (Southern, 1975) using the gel in panel A and labeled PCR products obtained with MOC5UNIVUP/ MOC5UNIVLOW (U) and with MOC5REVUP/ MOC5REVLOW (R) primer pairs. The gel was initially hybridized with the first probe, stripped and re-hybridized using the second probe; D) Physical map of a 243 Kb region of the PAO1 chromosome obtained by a BAC walking/mapping technique. The BACs labeled 1 to 7 are the same as in panel A, *Hind*III DNA fragments are represented as open boxes with vertical lines. The shaded gray regions indicates overlapping DNA fragments mapped at both extremities of pMOC5; the slashed lines in BACs 3, 4 and 5 indicates the common 26 kb *Hind*III DNA fragment containing the *ftsQ-ftsA* locus initially identified by PCR and listed in Table 1.

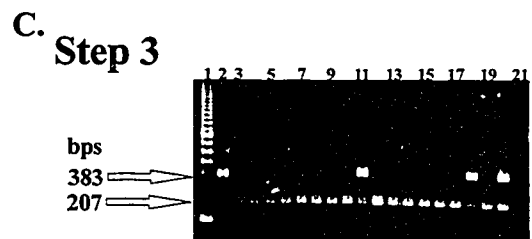
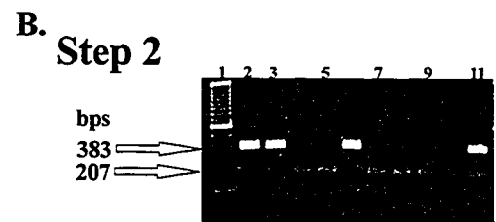
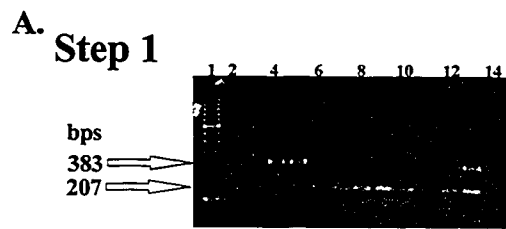
Fig. 6. Analysis of *Hind*III digested DNAs from the 98 kb pMOC5 and from subclones constructed by FIGE. Lanes: 1, GIBCO-BRL 1 kb ladder marker; 2, recombinant λ containing the 10.5 kb *Bam*HI fragment mapped in Fig. 7; 3, 5 kb ladder (BioRad); 4, pBeloBAC11; 5 and 15, pMOC5; 6 to 14, pBeloBAC11 subclones containing *Hind*III DNA fragments from pMOC5.

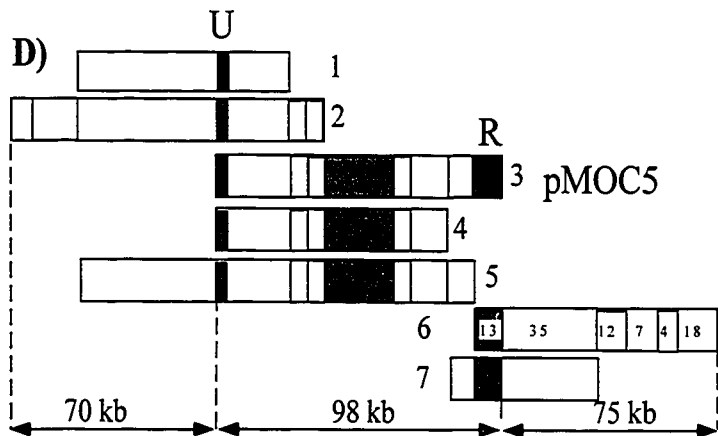
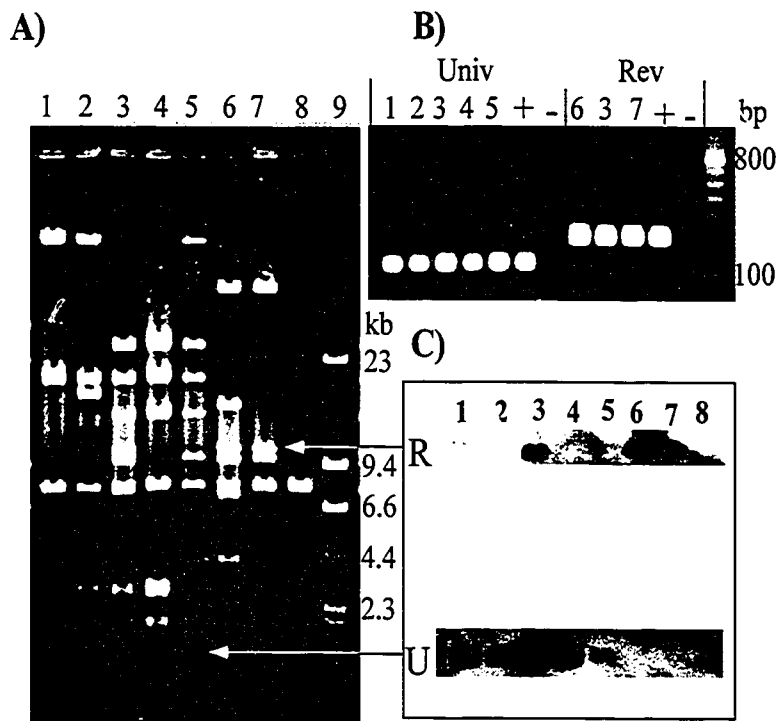
Fig. 7. Physical and genetic map of the 98 kb pMOC5 BAC DNA containing the cell division and cell-wall biosynthesis locus. The pMOC5 physical map was assembled by PCR and nucleotide sequencing of the extremities for each cloned *Hind*III DNA fragment. The asterisks indicates two *Hind*III fragments found during PCR screening and sequencing for map assembly. P values obtained by BLAST are given for gene orthologs identified at *Hind*III junctions.

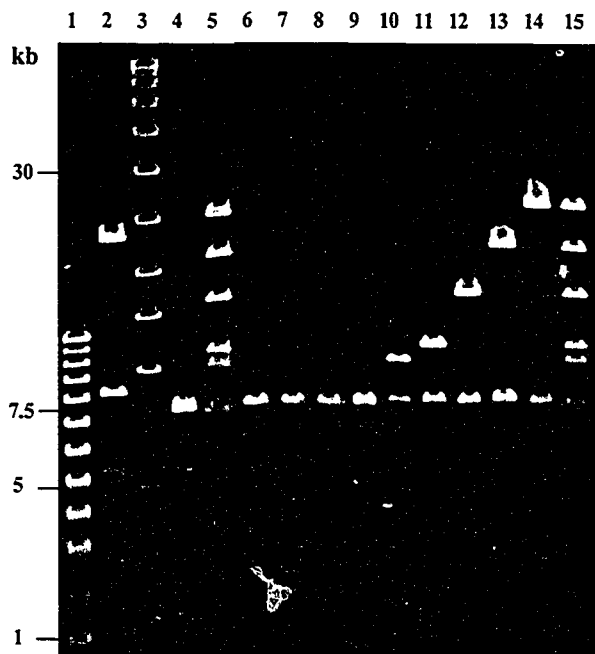


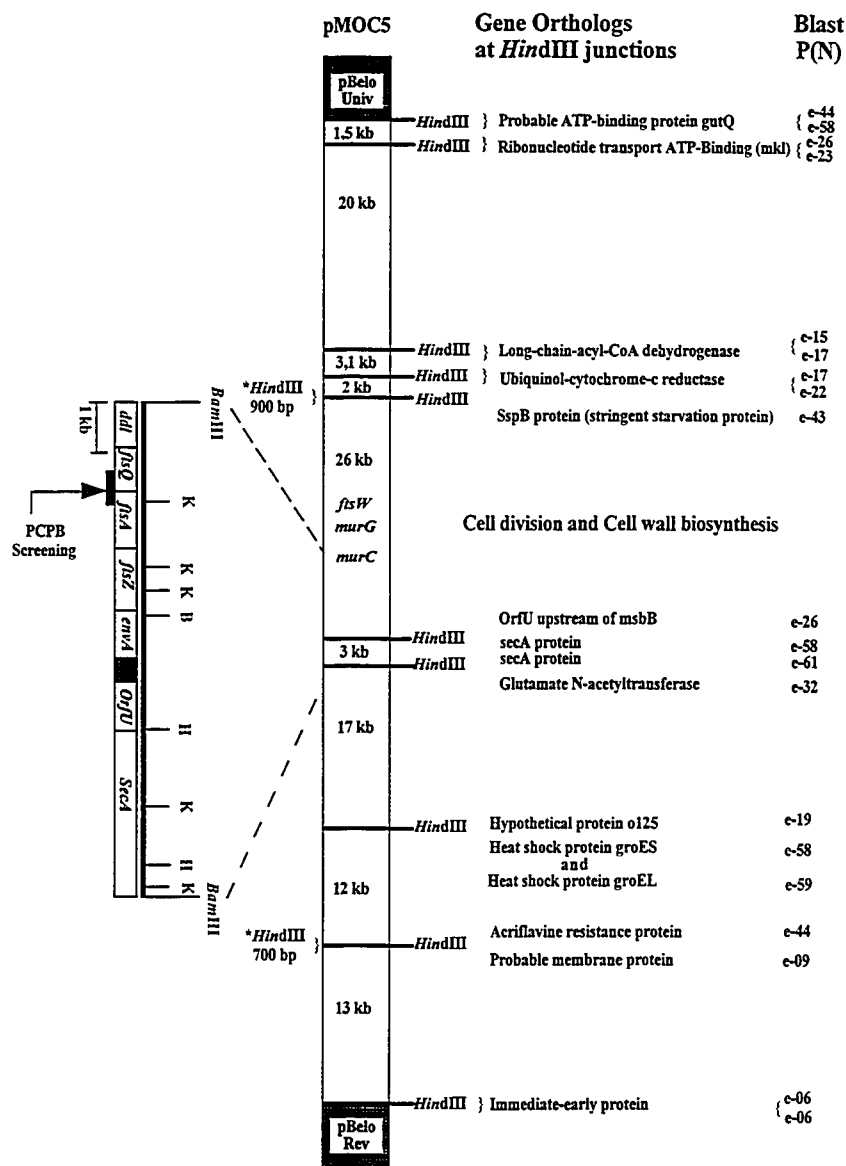
264 BACs with inserts > 80 Kb 4 genome equivalents of *P. aeruginosa* divided in 11 pools of 24 BACs











ANNEXE B

Bacterial Genomics and Characterization of the Cell Division/Cell-Wall Biosynthesis Locus Isolated from a BAC Library of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PAO1

Sanschagrin, F., Cardinal, G., Sabbagh, L. and Levesque, R. C. Microbiologie Moléculaire et Génie des Protéines, Sciences de la Vie et de la Santé, Faculté de Médecine et Pavillon Charles-Eugène Marchand, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada. G1K 7P4

Pseudomonas aeruginosa (PA) is ubiquitous in the environment and considered an opportunistic pathogen. It is also considered one of the most versatile and promising bacterium for biotechnological applications. However, little is known about PA genes and their regulation implicated in cell division and in cell-wall biosynthesis. Genomic DNA was prepared from PA strain PAO1 (5.9 Mb genome) and libraries constructed into the bacterial artificial chromosome pBeLoBAC11 (CHEF *Hind*III partials). The BAC libraries were arrayed according to sizes of DNA inserts separated by FIGE. A collection of 264 PAO1 BACs was retained for routine work (4 genome equivalents) with average inserts of >80 Kb. A rapid PCR-based method was developed and used for screening. BAC clones were selected and a 10.3 Kb region encoding the cluster of genes *secA-envA-ftsZ-ftsA-ftsQ-ddl* was sequenced from both DNA strands. In addition, the BAC library was screened for identification of linking clones containing potential *mur* gene orthologs. A contig map was constructed spanning more than 100 Kb and encoding the complete *fts-mur* locus. Physical DNA mapping and sequencing revealed a locus organization remarkably similar to those found in the genomes of *E. coli*, *B. subtilis*, *H. influenzae* and other bacterial species. Phylogenetic studies of selected proteins FtsZ and SecA and comparative genomics analysis identified features of the *fts-mur* locus unique to *P. aeruginosa*. Further studies in PA cell division/cell wall biosynthesis will be instrumental in finding therapeutic targets.

- Communication présentée à l'ASM (97th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Miami, Florida, USA) – Mai 1997

ANNEXE C

Bacterial Genomics and Sequencing of a 100 Kb Locus Encoding Cell Division/Cell-Wall Biosynthesis Genes from BACs of *Pseudomonas aeruginosa*

F. Sanschagrin, G. Cardinal, E. Thériault, L. Sabbagh and R.C. Levesque. Microbiologie Moléculaire et Génie des Protéines, Sciences de la Vie et de la Santé, Faculté de Médecine et Pavillon Charles-Eugène Marchand, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada. G1K 7P4

Pseudomonas aeruginosa (PA) is an opportunistic pathogen frequently found in nosocomial infections and is a major cause of morbidity and mortality in patients with cystic fibrosis. The current genetic map of PA chromosome lists the location of more than 450 marker loci. In addition, 2 physical maps of the 5.94 +/- 0.02 Mb large circular 67% G+C rich chromosome have been constructed by either bottom-up or top-down mapping techniques. The complete macrorestriction maps were constructed using 38 *SpeI*, 15 *DpnI*, 6 *SwaI* and 5 *PacI* sites yielding an average resolution of 93 Kb including similar distances on the physical and genetic maps. Genomic DNA was prepared from PA strain PAO1, separated by CHEF as *Hind III* partials averaging between 100 Kb to more than 400 Kb and libraries constructed into the bacterial artificial chromosome (BAC) pBELOBAC11. More than 850 BAC clones covering 9.5 times the 5.9 Mb genome were arrayed, digested with *Not I*, *Spe I* and *Hind III* and DNA sizes estimated by FIGE electrophoresis. Cloned BAC fragments indicated inserts averaging between 90 Kb to more than 290 Kb. A collection of 264 BACs were selected, arrayed for screening and which represented 4 genomic equivalents. Assuming a completely random and fully representative BAC library, we envisaged a theoretical analysis of elegant screening via a pooling strategy including a minimal number of steps and single tube assay for finding any locus or gene of interest. The pooled BAC PCR-based screening was used to isolate BACs containing genes such as *ftsA* found in cell division and *ddl* implicated in cell-wall biosynthesis. BAC clones were selected and a 10.5 Kb region encoding the cluster of genes *secA-envA-ftsZ-ftsA-ftsQ-ddl* was sequenced from both DNA strands. In addition, the BAC library was screened for identification of linking clones containing potential *mur* gene homologs. A physical and genetic map was constructed spanning more than 110 Kb and encoding the complete *fts-mur* locus in a pMOC5 BAC selected. Data obtained is a prerequisite for screening the PAO1 BAC library for any gene of interest and for random sequencing of large specific portions of the 5.9 Mb genome by laboratories participating in a consortium effort.

- Communication présentée à CBDN (8th Annual Meeting of the Canadian Bacterial Diseases Network, Montebello, Québec, Canada) – Mai 1997

ANNEXE D

Bacterial Genomics and Sequencing of a Locus Encoding Cell Division/Cell-Wall Biosynthesis Genes from a Bacterial Artificial Chromosome Library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO1

Cardinal, G., Sanschagrin, F., Sabbagh, L. and Levesque, R. C. Microbiologie Moléculaire et Génie des Protéines, Sciences de la Vie et de la Santé, Faculté de Médecine et Pavillon Charles-Eugène Marchand, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada. G1K 7P4

Pseudomonas aeruginosa (PA) is ubiquitous in the environment and an opportunistic pathogen. It is also considered one of the most versatile and promising bacterium for biotechnological applications. However, little is known about PA genes and their regulation implicated in cell division and in cell-wall biosynthesis. Genomic DNA was prepared from PA strain PAO1 (5.9 Mb genome) and libraries constructed into the bacterial artificial chromosome pBELOBAC11 (CHEF *Hind* III partials). The BAC libraries were arrayed according to sizes of DNA inserts separated by FIGE. A collection of 264 PAO1 BACs was retained for routine work (4 genome equivalents) with average inserts of >80 Kb. A rapid PCR-based method was developed and used for screening. BAC clones were selected and a 10 Kb region encoding the cluster of genes *secA-envA-fisZ-fisA-fisQ-ddl* was sequenced from both DNA strands. In addition, the BAC library was screened for identification of linking clones containing potential *mur* gene homologs. A contig map was constructed spanning more than 100 Kb and encoding the complete *fis-mur* locus. Physical DNA mapping and sequencing revealed a locus organization remarkably similar to those found in the genomes of *E. coli*, *B. subtilis*, *H. influenzae* and other bacterial species. Phylogenetic studies of selected proteins and comparative genomics analysis identified features of the *fis-mur* locus unique to *P. aeruginosa*. Further studies in PA cell division/cell wall biosynthesis will be instrumental in finding therapeutic targets for novel antimicrobials.

- Communication présentée à CSM (47th Annual Meeting of the Canadian Society of Microbiologists, Québec, Québec, Canada) – Juin 1997

ANNEXE E

Construction of Bacterial Artificial Chromosomes and development of a rapid method for isolation of defined regions and specific genes from the 5.9 Mb genome of *Pseudomonas aeruginosa*

Sabbagh, L., Cardinal, G., Sanschagrin, F. and Levesque, R. C. Microbiologie Moléculaire et Génie des Protéines, Sciences de la Vie et de la Santé, Faculté de Médecine et Pavillon Charles-Eugène Marchand, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada. G1K 7P4

P. aeruginosa is an opportunistic pathogen frequently found in nosocomial infections and is a major cause of morbidity and mortality in patients with Cystic Fibrosis. The current genetic map of the *P. aeruginosa* chromosome lists the location of more than 450 marker loci. In addition, 2 physical maps of the 5.94 +/- 0.02 Mb large circular 67% G+C rich chromosome have been constructed by either bottom-up or top-down mapping techniques. The complete macrorestriction map of the 5.94 Mb genome was constructed by using 36 *SpeI* and 15 *DpnI* sites yielding an average resolution of 110 Kb including similar distances on the physical and genetic maps. As a resource for detailed mapping and genome sequencing, libraries of bacterial artificial chromosomes (BAC) were constructed into the low copy number plasmid vector pBeloBAC11. A collection of more than 850 BAC clones covering several times the 5.9 Mb genome were digested with *NotI*, *SpeI* and *HindIII* and DNA sizes estimated by FIGE electrophoresis. Cloned BAC fragments indicated inserts averaging between 90 Kb to more than 290 Kb. A collection of 264 BACs were selected, arrayed for screening and which represented 4 genomic equivalents. Assuming a completely random and fully representative BAC library, we envisaged a theoretical analysis of elegant screening via a pooling strategy including a minimal number of steps and single tube assay for finding any locus or gene of interest. The pooled BAC PCR-based screening was used to isolate BACs containing genes involved: a *bvg* homolog implicated in regulation of virulence factors, *ftsA* found in cell division and *ddl* implicated in cell-wall biosynthesis. Using sequences which are homologous to the genes of interest, oligonucleotide primers were designed and used to completely sequence genes. The prospects of screening the *P. aeruginosa* BAC library for any gene of interest and for completely sequencing the 5.9 Mb genome is discussed.

- Communication présentée à CSM (47th Annual Meeting of the Canadian Society of Microbiologists, Québec, Québec, Canada) – Juin 1997

ANNEXE F

Isolation of a 130 Kb Locus and Characterization of the Multidrug Resistance Pump *emrB* Homologue from *Pseudomonas aeruginosa*

Sabbagh, L., Cardinal, G. and Levesque, R. C. Microbiologie Moléculaire et Génie des Protéines, Sciences de la Vie et de la Santé, Faculté de Médecine et Pavillon Charles-Eugène Marchand, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada. G1K 7P4

Many bacteria possess pumps of low specificity that can extrude structurally unrelated amphipathic toxins. This type of multidrug resistance has been termed multidrug resistance pumps (MDRs). The *emrAB* pump confers resistance to compounds such as protonophores (carbonylcyanide *m*-chlorophenylhydrazone [CCCP]) and some antibiotics (nalidixic acid and thiolactomycin). A homologue of an *E. coli* *mdr*, *emrB*, has been identified in *P. aeruginosa*. Following random sequencing of a *P. aeruginosa* library constructed into pTZ18R (*EcoRI-MboI*), two clones with inserts of 1631 bp and 1042 bp were found to contain 33% and 43% homology to the *emrB* gene of *E. coli*, respectively. Primers specific to the isolated *emrB* homologues were synthesized and used to screen a pBeloBAC11 Bacterial Artificial Chromosome library of *P. aeruginosa*, by the Pooled Cloned PCR BACs method, consisting of 264 BACs with inserts of >80 Kb representing 4 genome equivalents. Further sequencing of a 3 Kb region was performed on the isolated 130 Kb *HindIII* insert from pBeloBAC11. The *P. aeruginosa emrB* gene is 1530 nucleotides long, had a typical ribosomal binding site promoter and a terminator; the gene has 67% G+C DNA characteristic of *P. aeruginosa*. Phenotypic tests were also performed using 10-50µM nalidixic acid, 10-150µM ethidium bromide, 2-10µM tetracycline and 10-100µM CCCP and a number of other structurally unrelated chemicals to determine the level of expression of the *P. aeruginosa emrB* gene. The deduced peptide of the EmrB homologue was approximately 56 kDa showing 40% identity with the *E. coli* protein. The complete *emrB* homologue was also cloned in a pET30 vector system for overexpression of the protein. Further studies in MDRs will be essential in better understanding resistance by microbial agents to antibiotics and other unrelated toxins. This is a first step in designing new therapeutic agents capable of bypassing these efflux systems.

- Communication présentée à l'ICAAC (37th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Toronto, Ontario, Canada) – Octobre 1997

ANNEXE G

Identification de domaines homologues aux composantes régulant les gènes de virulence de *Bordetella pertussis* chez *Pseudomonas aeruginosa*

Sabbagh, L., Cardinal, G. et Levesque, R.C. Microbiologie Moléculaire et Génie des Protéines, Sciences de la Vie et de la Santé, Faculté de Médecine et Pavillon Charles-Eugène Marchand, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada. G1K 7P4

Pseudomonas aeruginosa est un pathogène opportuniste responsable de plus de 90 % du taux de mortalité chez les patients atteints de la mucoviscidose. Comme divers micro-organismes, *P. aeruginosa* produit plusieurs facteurs de virulence qui entraînent la colonisation des voies respiratoires de l'hôte. Chez *B. pertussis*, le pathogène responsable de la coqueluche, il existe un système à deux composantes qui régule l'expression des gènes de virulence. Des homologues des différents domaines des protéines BvgS et BvgA ont été isolés chez *P. aeruginosa* par la méthode du Pooled Cloned PCR BAC (PCPB) en criblant une banque de *P. aeruginosa* clonée dans le vecteur pBeloBAC11. La protéine BvgS de *B. pertussis* contient trois domaines: le transmetteur, le receveur et le C-terminal. Les homologues du domaine transmetteur et C-terminal ont été identifiés parmi la banque de *P. aeruginosa* et ont une identité de 68 % et de 33 % aux domaines de BvgS, respectivement. Les domaines isolés contiennent des acides aminés conservés, tels que His729 du domaine transmetteur et His1172 du domaine C-terminal qui sont nécessaires pendant les étapes de phosphorylation, suite à un signal extracellulaire, chez *B. pertussis*. Le gène codant la protéine homologue au domaine C-terminal de BvgS a été cloné dans un vecteur d'expression pET par lequel la protéine a été surexprimée dans *E. coli* HMS174 (λ DE3) et purifiée par histidine Tag. L'homologue à BvgA chez *P. aeruginosa* montre une identité de 66 % avec la protéine de *B. pertussis* et contient aussi des acides aminés conservés comme Asp9, Asp10, Asp54 et Lys104, qui sont impliqués dans les dernières étapes de phosphorylation, avant que la protéine se lie à l'ADN pour contrôler l'expression des gènes de virulence chez *B. pertussis*. L'étude de ces domaines isolés va nous permettre de caractériser si un contrôle transcriptionnel des gènes de virulence existe chez *P. aeruginosa*, semblable au système à deux composantes chez *B. pertussis*.

- Communication présentée à l'ACFAS (66^e Congrès de l'Association Canadienne-Française pour l'Avancement de la Science, Québec, Québec, Canada) – Mai 1998

ANNEXE H

Caractérisation d'une pompe à résistance multiple (MDR) homologue au locus *emrAB* de *E. coli* chez *Pseudomonas aeruginosa*

Sabbagh, L., Cardinal, G. et Levesque, R. C. Microbiologie Moléculaire et Génie des Protéines, Sciences de la Vie et de la Santé, Faculté de Médecine et Pavillon Charles-Eugène Marchand, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada. G1K 7P4

Plusieurs micro-organismes possèdent des pompes ayant une faible spécificité à un substrat. Ces organismes sont capables d'expulser des toxines ayant une conformation structurale différente. Ce type de résistance à plusieurs drogues a été nommé pompes à résistance multiples. La pompe EmrAB chez *E. coli* confère une résistance à des protonophores (carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone [CCCP]) et certains antibiotiques (acide nalidixique, norfloxacine et thiolactomycine). Un homologue de *emrAB* de *E. coli* a été identifié chez *P. aeruginosa*. Suite à un séquençage au hasard d'une banque de *P. aeruginosa* dans le vecteur pTZ18R, deux recombinants ayant des inserts de 1631 pbs et 1042 pbs montraient des identités de 33 % et 43 % à *emrAB* de *E. coli*, respectivement. Des amorces spécifiques au fragment montrant de l'homologie à *emrAB* isolé, ont été dessinées et utilisées pour cribler une banque de *P. aeruginosa* dans pBeloBAC11 (Bacterial Artificial Chromosome). Cette banque ayant des inserts > 80 kb a été criblée par la méthode du Pooled Cloned PCR BACs. La séquence du locus de 5.8 kb a été déterminée à partir de l'insert *Hind*III de 60 kb cloné dans pBeloBAC11. Un cadre de lecture ouvert montrant de l'homologie à *emrB* chez *P. aeruginosa* contient 1532 nucléotides. Son contenu en G+C est de 67 %, ce qui est typique du génome de *P. aeruginosa* et a une identité de 50 % avec la protéine de *E. coli*. De plus, un autre cadre de lecture ouvert montrant de l'homologie à *emrA* de *E. coli* chez *P. aeruginosa*, séquencé à partir du BAC de 60 kb, contient 1200 nucléotides et a une identité de 43 % avec la protéine de *E. coli*. Le fragment codant pour l'homologue de *emrAB* a été cloné dans un vecteur à haute copie, ce qui nous a permis de déterminer les concentrations minimales inhibitrices (CMI) avec l'acide nalidixique, le norfloxacine, le CCCP, la tétracycline et d'autres substances. Ces études nous ont permis de comparer la fonction de *emrAB* de *E. coli* avec l'homologue de *P. aeruginosa* et vont éventuellement mener à mieux comprendre la résistance chez les micro-organismes à divers antibiotiques et toxines, causée par les pompes à résistances multiple.

- Communication présentée à l'ACFAS (66^e Congrès de l'Association Canadienne-Française pour l'Avancement de la Science, Québec, Québec, Canada) – Mai 1998

ANNEXE I

Bacterial Genomics and Isolation of Homologous Components to the *Bordetella pertussis* *bvgAS* Locus in a *Pseudomonas aeruginosa* Bacterial Artificial Chromosomes (BAC) Library

Sabbagh, L., Cardinal, G. and Levesque, R. C. Microbiologie Moléculaire et Génie des Protéines, Sciences de la Vie et de la Santé, Faculté de Médecine et Pavillon Charles-Eugène Marchand, Université Laval, Ste-Foy, Québec, Canada. G1K 7P4

P. aeruginosa is a gram-negative opportunistic pathogen that causes respiratory tract infections in humans. Like many organisms, virulence factors are produced leading to the colonization of the host. *B. pertussis*, another gram-negative pathogen colonizing the respiratory tract of humans, regulates the expression of different virulence genes through the *bvgAS* locus. Homologies to the different components of the *bvgAS* locus have been identified in *P. aeruginosa*. In *B. pertussis* the BvgS protein has a transmitter, receiver and a C-terminal domain. Within a BAC library of *P. aeruginosa*, homologies to the transmitter and C-terminal domains of the BvgS protein were identified, showing 68% and 33% identities, respectively. These domains, in *B. pertussis*, are essential for the multistep phosphorelay, along with conserved amino acids which are phosphorylated by an extracellular signal. The His729 and His1172 residues of the transmitter and C-terminal domains, respectively, were identified on the isolated homologues. The gene coding for the homologous region of the C-terminal domain of BvgS was cloned in the expression vector pET30a and the protein was expressed in *E. coli* HMS174 (λ DE3) and purified to homogeneity. Within the *bvgAS* locus, *bvgA* codes for a regulatory protein containing a receiver domain with conserved amino acids required during the multistep phosphorelay. The isolated BvgA homologue showed 66% identity with the *B. pertussis* protein and the conserved amino acids Asp9, Asp10, Asp54, and Lys104. Biochemical studies, such as phosphorylation assays will allow us to determine whether these homologous domains are involved in a multistep phosphorelay. Complementation using Δ *bvgAS* mutants and analysis of pathogenicity will be essential in determining the possible function of the characterized gene. These studies should give a better understanding of a possible regulatory mechanism of secreted virulence factors from *P. aeruginosa* and possible regulation analogous to the *bvgAS* locus of *B. pertussis*.

- Communication présentée à l'ASM (98th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Atlanta, Georgia, USA) – Mai 1998