

Caractérisation génomique et phénotypique de la résistance aux antibiotiques chez *Streptococcus pneumoniae*

Thèse

Andréanne Lupien

Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire

Philosophiae doctor (Ph.D.)

Québec, Canada

© Andréanne Lupien, 2015

Résumé

Streptococcus pneumoniae est le pathogène bactérien le plus important des voies respiratoires chez les adultes et les enfants causant la pneumonie, la bronchite et l'otite de l'oreille moyenne. Cette bactérie est responsable d'une morbidité et d'une mortalité importante, entre autres, chez les jeunes enfants. La prévalence générale des souches de pneumocoques résistants et multirésistants est en hausse dans le monde compliquant la thérapie antimicrobienne vis-à-vis cette bactérie. Face à cette problématique, nous avons voulu caractériser les mécanismes de résistance à la ciprofloxacine (CIP), la tétracycline (TC) et la tigécycline (TGC) chez des mutants sélectionnés en laboratoire et des souches cliniques afin de potentiellement découvrir de nouvelles cibles diagnostiques de la résistance vis-à-vis ces molécules.

L'approche génomique utilisée dans cette thèse (séquençage de génome et transformation) a permis de faire la caractérisation génotypique et phénotypique des mutants résistants aux trois antibiotiques utilisés dans l'étude. Cette approche, en plus de préciser le rôle des mutations dans les gènes *parC* et *gyrA* dans la résistance à la CIP, a permis de déterminer que le pneumocoque peut mettre en place des mécanismes de résistance secondaires le rendant résistant à la CIP et à la TC. En effet, l'acquisition d'une mutation dans le gène spr1902 protège la bactérie contre les dérivés réactifs à l'oxygène (ROS) induit par la CIP. De plus, la surexpression de PatA/PatB ainsi que la présence de mutations dans l'opéron du transporteur PatA/PatB induit de faibles niveaux de résistance à la CIP et à la TC, en absence de *tetM* et *tetO*. Un lien a également été établi entre la résistance à la TC et la surexpression de gènes de la voie de biosynthèse de la thiamine chez des souches de *S. pneumoniae* non-sensibles à la TC. Finalement, les mécanismes de résistance à la TGC ont été décrit, pour la première fois, chez le pneumocoque (mutations dans la protéine ribosomale S3 (*rpsC*; spr0195), S10 (*rpsJ*; spr0187), l'ARNr 16S et une méthyltransférase de l'ARNr 16S hypothétique (spr1784). Ceuxi-ci causent une résistance

croisée aux TCs de première et deuxième génération. Dans cette thèse, nous avons mis en lumière de nouveaux marqueurs de la résistance aux antibiotiques chez *S. pneumoniae*.

Abstract

Streptococcus pneumoniae is a Gram-positive pathogen responsible for pneumonia, bronchitis and otitis media leading to considerable morbidity and mortality among children and adults. The prevalence of resistant and multi-resistant strains increases worldwide impairing antimicrobial treatments toward this bacterium. We characterised resistance to ciprofloxacin (CIP), tetracycline (TC) and tigecycline (TGC) in laboratory-derived resistant mutants and unsusceptible clinical isolates to further our comprehension of resistance mechanisms and potentially uncover new therapeutic and diagnostic targets toward these drugs.

The genomic approaches used in this thesis (genome sequencing and DNA transformation) allowed the phenotypic and genotypic characterisation of mutants resistant to three antibiotics. By this approach, the role of *parC* and *gyrA* mutations in CIP resistance was confirmed and even extended and it was also possible to determine that *S. pneumoniae* may select secondary mechanisms of resistance to CIP and TC besides target-site mutations. Acquisition of a mutation in spr1902 is shown to protect the bacteria against oxygen-reactive species induced by CIP. Furthermore, overexpression of the ABC transporter PatA/PatB and mutations in the coding region of this transporter confer low-level resistance to CIP and TC. A link was also established between TC resistance and overexpression of genes involved in the thiamine biosynthesis and salvage pathway in *S. pneumoniae* TC non-susceptible isolates. Finally, for the first time, the mechanisms of resistance to TGC in *S. pneumoniae* were described (mutations in ribosomal protein S3 (*rpsC*; spr0195), S10 (*rpsJ*: spr0187), 16S ribosomal RNA (rRNA) and a putative 16S rRNA methyltransferase). These confer cross-resistance to first and second generation TCs. This work highlights new markers of antibiotic resistance in *S. pneumoniae*.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	V
Table des matières	vii
Liste des tableaux	xi
Liste des figures	xiii
Liste des abréviations	XV
Remerciements	xvii
Avant-Propos	xix
Chapitre I Streptococcus pneumoniae	1
1.1 Bactériologie	1
1.2 Identification	2
1.3 Manifestations cliniques	3
1.4 Facteurs de virulence	4
1.4.1 Capsule	5
1.4.3 Paroi bactérienne	6
1.4.3 Pneumolysine	6
1.4.4 Protéines de surface	6
1.4 Traitements	8
1.5 Vaccins	9
1.5.1 Vaccin polysaccharidique (VP)	9
1.5.2 Vaccin polysaccharidique conjugué (VPC)	9
Chapitre II : La diversité du génome de Streptococcus pneumoniae	11
2.1 Acquisition d'ADN exogène	
2.1.1 Transformation	
2.1.2 Conjugaison	14
2.1.3 Transduction	15
Chapitre III : Antibiothérapie	17
3.1 Mécanismes d'action des antibiotiques	17

3.1.1 Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne	18
3.1.2 Inhibition de la transcription	19
3.1.3 Inhibition de la réplication de l'ADN	19
3.1.4 Inhibition de la synthèse protéique	19
3.1.5 Inhibition du métabolisme des folates	20
3.1.6 Nouveaux mécanismes d'action des antibiotiques; productions de dérivés à l'oxygène	réactifs 20
3.2 Mécanismes de résistance aux antibiotiques	22
3.2.5 Réduction de la perméabilité membranaire	
3.2.6 Efflux de l'antibiotique	24
3.2.1 Modification de la cible	25
3.2.2 Inactivation de l'antibiotique	25
3.2.2 Amplification de la cible	
3.3 Résistance aux antibiotiques chez S. pneumoniae	
3.3.1 Résistance aux β-lactamines	27
3.3.2 Résistance aux macrolides et aux kétolides	27
3.3.3 Résistance à la LZD	
Chapitre IV : La famille des fluoroquinolones	29
4.2 Mode d'action des fluoroquinolones	29
4.3 Mécanismes de résistance	31
4.3.1 Mutations dans l'ADN gyrase et la topoisomérase IV	31
4.3.2 Efflux	32
4.3.3 Résistance aux quinolones médiée par des plasmides	34
Chapitre V : La famille des TCs et des glycylcyclines	35
5.2 Mode d'action des TCs et des glycylcyclines	36
5.3 Mécanismes de résistance	38
5.3.1 La famille des TCs	
5.3.2 La TGC	40
Chapitre VI : Étude de la résistance aux antibiotiques par approche « omique »	43
6.1 Séquençage de génome entier	43
6.1.1 Séquençage à haut débit (NGS)	44

6 2 Étude du transcriptome	47
6.2.1 Biopuces.	47
6.2.2 Séquencage de l'ARN	49
6.3 Étude de la résistance chez le pneumocoque par des techniques de protéomique	50
6.4 Étude du métabolome chez <i>S. pneumoniae</i>	50
Chapitre VII: Problématique, hypothèses et objectifs	53
7.1 Problématique	53
7.2 Hypothèses	53
7.3 Objectifs	54
Chapitre VIII: Caractérisation génomique de la résistance à la ciprofloxacine chez un mutant dérivé d'une souche de laboratoire et d'une souche clinique de <i>Streptococcus</i>	57
8 1 Dágumá	
8.2 Article	
8.2 Afficie	
souches de <i>Streptococcus pneumoniae</i> résistantes à la tétracycline causent la résistance que démontré par séquençage de génome et séquençage de l'ARN messager	tel 97
9.1 Résumé	97
9.2 Article	99
Chapitre X: L'induction de la résistance à la tigécycline chez <i>Streptococcus pneumonia</i> révèle la sélection de mutations dans des protéines ribosomales et de l'ARN ribosomal.	ıe 151
10.1 Résumé	151
10.2 Article	152
Chapitre XI : Discussion générale	181
11.1 Les mutants résistants à la CIP, TC et TGC	181
11.1.1 Les mutants résistants à la CIP	182
11.1.2 Les mutants résistants à la TC	183
11.1.3 Les mutants résistants à la TGC	184
11.2 Mutations dans les gènes <i>parC</i> et <i>gyrA</i>	185
11.3 Glycérol-3-phosphate déshydrogénase dépendante du NADPH et la protection contre les ROS induits par la CIP chez <i>S. pneumoniae</i>	186
11.4 Le transporteur PatA/PatB et la multirésistance aux antibiotiques chez <i>S. pneumoniae</i>	187

11.4.1 La surexpression du transporteur PatA/PatB	. 188
11.4.2 Mutations dans la région codante de <i>patA</i> et <i>patB</i>	. 190
11.5 Utilisation de l'ARN-seq pour l'étude de la résistance chez le pneumocoque	. 193
11.6 Mécanismes de résistance à la TGC chez le pneumocoque	. 195
Conclusion	. 199
Bibliographie	. 201

Liste des tableaux

- Tableau 3.1
 Mécanismes d'action des principales familles d'antibiotiques
- Tableau 4.1
 Classification des pompes d'efflux causant la résistance chez les bactéries
- Tableau 5.1Classification des gènes tet et otr

Liste des figures

- Figure 1.1 Coloration de Gram d'une culture de pneumocoque
- Figure 1.2 Mode de dispersion du pneumocoque chez l'humain
- Figure 1.3 Principaux facteurs de virulence chez S. pneumoniae
- Figure 2.1 L'induction de la compétence chez S. pneumoniae
- Figure 3.1 Modèle du mode d'action des antibiotiques bactéricides
- Figure 3.2 Représentation schématique de différents types de pompes d'efflux d'antibiotiques chez les bactéries
- Figure 4.1 Structure des fluoroquinolones
- Figure 4.2 Représentation du site de clivage du complexe de la topoisomérase IV
- Figure 5.1 Structure des tétracyclines et glycylcyclines
- Figure 5.2 Sites de liaison de la tétracycline (TC) à l'ARN ribosomal 30S
- Figure 5.3 Site de liaison de la tigécycline (TGC) à l'ARN ribosomal 30S
- Figure 6.1 Principes de la technologie de séquençage 454
- Figure 6.2 La technologie Illumina
- Figure 6.3 Principe des biopuces à deux fluorochromes
- Figure 11.1 Schéma des mutations dans l'opéron *patA-patB* impliquées dans la résistance dans cette étude

Liste des abréviations

ABC	de l'anglais « ATP-binding cassette »
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messager
ARN-seq	séquençage de l'ARN
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
CIP	Ciprofloxacine
CM	Chloramphénicol
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CSP	de l'anglais « Competence-stimulating peptide »
Cy3	Cyanine 3
Cy5	Cyanine 5
DOX	Doxycycline
dTMP	Désoxythymidine monophosphate
dTTP	Désoxythymidine triphosphate
dUMP	Désoxyuridine monophosphate
GTP	Guanosine triphosphate
EM	Érythromycine
Etbr	de l'anglais « Ethidium bromide »
Н	Hélice
HMP	4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine
Ig	Immunoglobuline
KAN	Kanamycine
Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
lytA	Autolysine A
LZD	Linézolide
MFS	de l'anglais « Major facilitator superfamilly »
MI	Minocycline
MOX	Moxifloxacine
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NGS	de l'anglais « Next-generation sequencing »
oxyTC	Oxytétracycline
PCR	de l'anglais « Polymerase chain reaction »
PG	Pénicilline G
PLP	Protéine liant la pénicilline
ply	Pneumolysine
QRDR	de l'anglais « quinolone-resistance-determining region »
RND	de l'anglais « Resistance-nodulation-division »

lais « Reactive oxygen species »
lais « Recombinaison segment sequence »
lais « Small multidrug resistance family »
cline
des Tétracyclines
line
lais « TransMembrane prediction using Hidden Markov Models »
iycine
polysaccharidique
polysaccharidique conjugué
lais « Whole-genome transformation »

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche le Dr Marc Ouellette de m'avoir permis de faire mes études graduées dans son laboratoire. Sa passion pour la recherche et sa rigueur scientifique sont des qualités qui m'ont grandement inspirées durant mes études. Il a été un excellent mentor et j'aimerais sincèrement le remercier pour sa patience, son support, sa disponibilité et l'autonomie qu'il m'a laissée afin de mener à bien cette thèse.

J'aimerais également remercier mon co-directeur de recherche, le Dr Philippe Leprohon. Il a été un mentor hors pair. Sa passion pour la science transparaît par son désir de transmettre ses connaissances. J'aimerais le remercier pour sa grande disponibilité et pour les nombreuses discussions qui ont permis de faire avancer le projet.

J'aimerais remercier les membres du comité évaluateur de cette thèse, le Dr Gerard D. Wright, de l'Université McMaster, le Dr Steve Charette et le Dr Daniel Grenier pour le temps accordé à l'évaluation de cette thèse. Également j'aimerais remercier la Dre Josée N. Lavoie, directrice du programme de Biologie cellulaire et moléculaire, ainsi que Mme Chantal Joubert, Agente de gestions des études, pour le dépôt de cette thèse.

Durant mes études graduées au Centre de Recherche en Infectiologie, j'ai eu la chance de côtoyer des gens formidables. Je désire sincèrement remercier chacun des membres de l'équipe du Dr Marc Ouellette (MOU) passés et présents, et particulièrement deux personnes piliers du laboratoire, Suzanne Avoine et Gaétan Roy, pour leurs conseils et leur aide. Un gros merci également à Danielle Légaré pour ses nombreux conseils et les partys d'équipe à son chalet. Également, la réalisation de mon projet de thèse n'aurait pas été possible sans les membres présents du groupe Strep et trois anciens membres de l'équipe, Fereshteh Fani, Dewan Billal et Jie Feng qui ont su me conseiller au cours de mon parcours académique et avec qui j'ai eu beaucoup de plaisirs à travailler.

Mon passage au CRI m'a permis de rencontrer des gens extraordinaires avec qui j'ai développé de précieuses amitiés. J'aimerais spécialement remercier ma collègue et amie Hélène Gingras avec qui j'ai eu la chance de travailler sur les projets TC et TGC. L'achèvement de ses travaux aurait été très difficile sans son aide. Elle est une personne exceptionnelle à qui j'ai pu me confier aussi bien sur le plan personnel que professionnel. Également, je veux remercier mes amies Marie Plourde, Andrée Maheux, Marie-Christine Brotherton, Jessica El-Khoury et Jade-Éva Potvin qui m'ont supporté et ont su agrémenter ces dernières années.

Finalement j'aimerais remercier mes amis, Agnès, Stéphane et Isabelle, mes parents, Jean-François et Christiane, mon frère, Jean-Philippe, ainsi que tous les membres de ma famille pour leurs encouragements, leur soutien et leur amour inconditionnel.

Avant-Propos

Le manuscrit présenté au Chapitre 8, intitulé « Genomic characterisation of ciprofloxacin resistance in a laboratory derived mutant and clinical isolate of *S. pneumoniae.* » a été publié dans le journal Antimicrobial Agents and Chemotherapy. J'ai effectué les inactivations géniques, les reconstructions phénotypiques, les quantifications des ROS et rédigé le manuscrit. Dewan S. Billal a généré les mutants R6M2B, T5-R6M2B et T1-60827 et a effectué les expériences de qRT-PCR. Fereshteh Fani a produit le plasmide pFF6. Hafid Soualhine a contribué au design expérimental. George G. Zhanel a fourni la souche 60827. Philippe Leprohon a analysé les résultats de séquençage et révisé le manuscrit. Marc Ouellette a supervisé le projet.

Le manuscrit présenté au Chapitre 9 intitulé « Multiple mutations and increased RNA expression in tetracycline resistant *Streptococcus pneumoniae* as determined by genome wide DNA and mRNA sequencing. » a été soumis pour publication dans le journal Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Hélène Gingras a sélectionné les souches R6M1TC-5 and R6M2TC-4. J'ai déterminé le profil de résistance aux antibiotiques des mutants. L'analyse du séquençage des génomes des mutants TC a été effectuée par moimême avec la contribution de Philippe Leprohon. Les reconstructions génotypiques par fragments PCR ont été effectuées par moi-même (introduction des mutations) et Hélène Gingras (réversion des mutations introduites). J'ai effectué avec l'aide de Philippe Leprohon l'analyse des données obtenues par ARN-seq en utilisant l'algorithme Cufflinks. J'ai effectué l'analyse Blast2Go des gènes dont l'expression est altérée chez nos mutants. J'ai effectué les études d'accumulation de TC tritié. J'ai effectué en majorité, avec l'aide d'Hélène Gingras, les expériences de qRT-PCR pour les gènes patA, patB, spr0632, tenA, *thiD, thiE* et spr1021 ainsi que leur inactivation chez les mutants et les souches cliniques. J'ai effectué le génotypage des souches cliniques (rpsJ, tetM et tetO). Michel G. Bergeron a fourni les souches cliniques utilisées dans cette étude. Le manuscrit a été écrit par moimême et Philippe Leprohon. Marc Ouellette a supervisé le projet.

Le manuscrit présenté au Chapitre 10, intitulé « Induced tigecycline resistance in *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals mutations in ribosomal proteins and rRNA. » sera soumis sous peu pour publication. Hélène Gingras a sélectionné les souches R6M1TGC-6 et R6M2TGC-6. J'ai déterminé le profil de résistance des mutants aux antibiotiques. L'analyse du séquençage des génomes des mutants TC a été effectuée par moi-même avec la contribution de Philippe Leprohon. J'ai effectué les reconstructions génotypiques par fragments PCR. L'article a été écrit par moi-même et Philippe Leprohon. Marc Ouellette a supervisé le projet.

Introduction

Chapitre I Streptococcus pneumoniae

La bactérie pathogène *S. pneumoniae* fût isolée en 1881 par le chimiste français Louis Pasteur et le médecin américain George Sternberg. En 1926, la bactérie a été classifiée sous le nom de *Diplococcus pneumoniae* due à sa forme de diplocoque lorsqu'on l'observe au microscope. Cependant, c'est en 1974 qu'elle sera finalement classée dans le genre *Streptococcus*, en raison de sa croissance en courtes chaînettes en milieu liquide (253).

S. pneumoniae, également connu sous le nom commun de pneumocoque, fait partie de l'embranchement taxonomique des Firmicutes, de la classe des Bacilli, de l'ordre des Lactobacillales et de la famille des *Streptococcaceae* (253). Le genre *Streptococcus* regroupe plusieurs espèces pathogènes chez l'être humain, en plus de *S. pneumoniae*, dont *Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, Streptococcus suis* et *Streptococcus bovis*.

1.1 Bactériologie

S. pneumoniae est une coque à Gram positif d'environ 0,5 à 1,25 micromètre de diamètre qui possède une forme légèrement allongée (cocci de lancet) (Figure 1.1). On le retrouve le plus souvent en paires (diplocoques), toutefois il peut être observé sous forme de courtes chaînettes, la culture en milieu liquide favorisant cette organisation des cocci (253). Cette bactérie mésophile est tolérante à l'oxygène. Néanmoins, environ 20% des souches cliniques nécessiteraient des conditions d'anaérobie strictes pour leur croissance. Comme d'autres Streptococci, *S. pneumoniae* ne possède pas de catalase d'où la nécessité de le cultiver en milieu contenant une source de cette enzyme afin de neutraliser les

quantités importantes de peroxyde d'hydrogène produites par la bactérie (113). Lors de la culture sur gélose au sang, un halo verdâtre est visible autour des colonies (α -hémolytique), cependant la culture en condition d'anaérobie peut induire une hémolyse complète du sang (β -hémolytique). La bactérie ne forme pas de spores et n'est pas motile, bien que la présence de pili ait été rapportée (89, 192). La principale source d'énergie du pneumocoque provient de la fermentation du glucose en acide lactique (113). En effet, plusieurs enzymes essentielles au cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs) sont absentes chez la bactérie (113).



Figure 1.1 : Coloration de Gram d'une culture de pneumocoque en milieu contenant du sang. Les bactéries apparaissent principalement sous la forme de diplocoques de couleur mauve. Tiré de (43)

1.2 Identification

L'identification du pneumocoque est essentielle afin de le différencier des autres espèces pathogènes et commensales vivant dans sa niche écologique principale, le nasopharynx. En effet, la présence de certaines espèces bactériennes, telles les bactéries commensales du groupe des S*treptococcus viridans*, peuvent compliquer l'identification du pneumocoque.

En premier lieu, les techniques de microbiologie classiques, telle la coloration de Gram, la présence d'hémolyse sur gélose au sang, la sensibilité à l'optochine et la solubilisation par les sels biliaires sont généralement utilisées pour l'identification de S. pneumoniae (72). L'apparition d'une hémolyse de type α en condition d'aérobie, l'obtention d'une coloration de Gram positif où l'on observe des diplocoques ou des coques en chaînettes ainsi qu'un test de catalase négatif permettent de confirmer la présence d'un Streptococcus spp. dans un échantillon. Par la suite, la sensibilité en présence d'un disque contenant 5 mg d'optochine permet de discriminer si nous sommes bien en présence du pneumocoque. En effet, une zone d'inhibition d'un diamètre >14 mm confirme l'identification du pneumocoque. Toutefois, une zone d'inhibition de 9-13 mm doit être contrevérifiée par le test de solubilité en présence de sels biliaires, car des souches résistantes à l'optochine ont déjà été observées (134). Tous ces tests sont très spécifiques (portée de la spécificité 85%-95%) mais peuvent produire des résultats positifs avec d'autres bactéries du groupe des streptocoques viridans (134, 178). D'autres tests peuvent être utilisés, comme la réactivité d'antigènes antipneumococciques spécifiques à la capsule, ou réaction de Quellung (16, 172). De plus, l'amplification par PCR des gènes de l'autolysine A (lytA) et de la pneumolysine (ply) a déjà été utilisée afin d'identifier la bactérie S. pneumoniae dans un échantillon de patient ayant une pneumonie (243).

1.3 Manifestations cliniques

Le pneumocoque est une bactérie pathogène stricte de l'être humain qui se transmet d'un hôte colonisé au niveau de la muqueuse rhinopharyngée à un autre individu par l'intermédiaire d'aérosols (105). Cette première colonisation est essentielle à toutes les manifestations cliniques du pneumocoque (Figure 1.2). Il est important de noter que la colonisation du nasopharynx par le pneumocoque est fréquemment asymptomatique. En effet, jusqu'à 60% des jeunes enfants et moins de 10% des adultes sains sont porteurs de *S. pneumoniae* au niveau du nasopharynx et ceux-ci ne développeront pas de symptômes liés à cette colonisation (105). Ce taux peut varier et est affecté par plusieurs facteurs de risque dont l'âge (diminue avec l'âge chez les personnes saines), le statut socio-économique, l'exposition à la fumée de cigarette, les saisons (plus élevé lors de la saison froide) et la fréquentation d'enfants (83). Néanmoins, une dispersion du pneumocoque au niveau des voies respiratoires supérieures (infection de la muqueuse) ou de sites normalement stériles, comme le sang et le système nerveux central (infection invasive), peut entraîner des otites, des sinusites, des pneumonies, des bactériémies et des méningites (Figure 1.2). Dans des cas plus rares, *S. pneumoniae* peut causer l'arthrite septique, l'ostéomyélite, la polymyosite, la fasciite nécrosante, l'endocardite, la péricardite, un abcès du système nerveux central, la péritonite, l'infection des voies urinaires et génitales, la parotidite, l'épiglottite, la mastoïdite, l'endophtalmite et la conjonctivite, selon le site colonisé par la bactérie (253).



Figure 1.2 : Mode de dispersion du pneumocoque chez l'humain et les manifestations cliniques principales associées. Adapté de (105).

1.4 Facteurs de virulence

Afin de pouvoir coloniser un hôte, le pneumocoque utilise plusieurs facteurs de virulence essentiels à l'infection par la bactérie en empêchant l'opsonisation par les cellules présentatrices d'antigènes et en permettant l'adhésion du pneumocoque à la muqueuse.

Dans cette section, les principaux facteurs de virulence, représentés à la Figure 1.3 seront abordés.



Figure 1.3 : Principaux facteurs de virulence chez S. pneumoniae. Adapté de (130).

1.4.1 Capsule

La capsule est le principal facteur de virulence chez *S. pneumoniae* puisqu'elle empêche la phagocytose en bloquant la liaison de la région Fc des Immunoglobulines G ou la composante iC3b du complément de l'hôte (180, 268). La capsule est juxtaposée à la paroi bactérienne et est composée de polysaccharides. La charge négative de la capsule prévient la capture du pneumocoque dans le mucus du nasopharynx lors de l'infection (105). Les gènes de la capsule sont codés en un seul opéron situé entre les gènes *dexB* et *aliA* sur le génome bactérien (à l'exception des sérotypes 3 et 37) et la diversité chimique des sucres qui peuvent être synthétisés donne lieu à plus de 90 types capsulaires (sérotypes) connus à ce jour pour le pneumocoque (24).

1.4.3 Paroi bactérienne

La paroi bactérienne est composée principalement de peptidoglycane, d'acides teichoiques, d'acides lipoteichoiques, et de phosphorylcholines. La phosphorylcholine est un phospholipide hydrophobe caractéristique des bactéries colonisant les voies respiratoires supérieures telles *Haemophilus influenzae*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* et des bactéries commensales et pathogènes du genre *Neisseria* (130). Cette composante, en plus de permettre l'ancrage des protéines liant la choline, joue un rôle important dans l'inflammation (24).

1.4.3 Pneumolysine

La pneumolysine est une toxine faisant partie de la famille des cytolysines dépendantes du cholestérol. Cette protéine monomérique de 52 kDa a la capacité, une fois excrétée, de s'assembler en pore de 30-50 unités sur la membrane d'une cellule cible (247). La séquence de la pneumolysine varie très peu d'un sérotype à l'autre ce qui en fait un excellent candidat pour le développement d'un vaccin anti-pneumococcique (247).

1.4.4 Protéines de surface

S. pneumoniae produit plusieurs protéines de surface lui permettant d'interagir avec les composantes de l'hôte lors de la colonisation et de sa dissémination. Les analyses des génomes de R6, une souche non capsulée qui est dérivée de la souche D39 (sérotype 2), et de la souche TIGR4 (sérotype 4) ont permis de regrouper les protéines de surface en trois grands groupes selon leurs motifs: les lipoprotéines (42 chez R6 et 47 chez TIGR4), les protéines liant la choline (10 chez R6 et 16 chez TIGR4) et les protéines contenant un motif

LPxTG (13 chez R6 et 10 chez TIGR4) (25). Un quatrième groupe, formé de protéines non classiques est également présent.

1.4.4.1 Protéines liant la choline

La phosphorylcholine est une composante importante de la paroi bactérienne de *S. pneumoniae*, car elle permet l'ancrage de manière non covalente des protéines liant la choline (25). Le pneumocoque produit en moyenne 13 à 16 protéines liant la choline, dont quatre hydrolases dégradant la paroi bactérienne (N-acetyl-muramoyl-L-alanine amidase (LytA), β -N-acétylglucosamidase (LytB), β -N-acetylmuraminidase (LytC; lysosyme) et une phosphorylcholine estérase (Pce)) qui sont toutes importantes dans la virulence de la bactérie (25). La protéine de surface PspA, qui est retrouvée virtuellement chez tous les sérotypes cliniques et qui protège contre la réponse immunitaire innée, et la protéine de surface PspC qui est importante pour la colonisation du pneumocoque au niveau du nasopharynx de par son interaction avec l'ectodomaine des récepteurs des immunoglobulines polymériques font également parties de cette famille (25, 275).

1.4.4.2 Protéines de surface LPxTG

L'ancrage covalent au peptidoglycane de la paroi bactérienne des protéines de surface à motif LPxTG s'effectue par des sortases (*srt*). Chez TIGR4, quatre *srt* ont été répertoriées et leur rôle diffère selon les protéines de surface auxquelles elles permettent l'ancrage. Plusieurs protéines à motifs LPxTG ont été répertoriées dont les neuraminidases (NanA et NanB). Tous les pneumocoques produisent au moins une neuraminidase et une étude faite chez le chinchilla a démontré que l'absence de cette enzyme chez la bactérie diminuait sa persistance dans le nasopharynx et l'oreille moyenne (249). Également, plusieurs protéases à motifs LPxTG sont produites par le pneumocoque, telle la chaperone HtrA qui permettrait selon des études chez le rat de résister au stress oxydatif lors de la colonisation du nasopharynx. De plus, le pneumocoque peut produire jusqu'à quatre métalloprotéases à motifs LPxTG, dont IgA1, ZmpB, ZmpC et ZmpD. La protéase IgA est

produite virtuellement par tous les pneumocoques et est importante lors de l'infection des poumons et lors des cas de bactériémies (203).

1.4.4.3 Lipoprotéines

Chez le pneumocoque, les lipoprotéines présentes au niveau de la paroi sont essentielles pour le transport de substrat et l'état général de la bactérie. On retrouve dans cette famille plusieurs transporteurs de type ABC dont PsaA, une lipoprotéine importante dans l'adhérence du pneumocoque et qui constitue la partie soluble du système de transport de manganèse. De plus, on retrouve deux lipoprotéines, PiaA et PuiA faisant partie de deux systèmes d'import du fer (36). Également, la peptidyl-prolyl isomérase permet la sécrétion et l'activation des molécules de surface. De plus, PpmA, ayant une homologie avec les membres de la famille des parvulines et SlrA, un membre de la famille des cyclophilines, font partie de ce groupe (6).

1.4.4.4 Autres protéines

D'autres protéines ne possèdent pas de séquence « signal » reconnue par les complexes de sécrétion ni de domaines retrouvés chez les groupes décrits précédemment. On retrouve l'adhésine de la fibronectine PavA qui est un important déterminant de la virulence dans l'infection à pneumocoque (206). De plus, la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) lie le plasminogène et l'énolase Eno augmenterait la dégradation de la matrice extracellulaire et dissoudrait la fibrine ce qui aiderait à la transmigration du pneumocoque (25).

1.4 Traitements

Le traitement des infections aux pneumocoques repose principalement sur l'administration d'antibiotiques. Les principaux antibiotiques utilisés sont les β-lactamines,

les macrolides et les fluoroquinolones. Également, la vancomycine (VA), les tétracyclines (TCs) et la linézolide (LZD) peuvent être utilisées pour traiter les infections aux pneumocoques ne répondant pas aux antibiotiques de première ligne. Le mode d'action de ces antibiotiques sera traité plus en détail à la section 3.1.

1.5 Vaccins

La vaccination est un moyen simple et efficace de prophylaxie contre un grand nombre de sérotypes infectieux du pneumocoque qui sont potentiellement porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques. Deux formulations vaccinales sont disponibles, soit le vaccin polysaccharidique Pneumovax® et le vaccin conjugué polysaccharidique Prevnar®.

1.5.1 Vaccin polysaccharidique (VP)

Ce vaccin contient des antigènes polysaccharidiques purifiés dérivés de la capsule de 23 sérotypes (1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F et 33F). Les sérotypes contenus dans la formulation vaccinale procureraient environ 90% de protection contre les isolats provenant du sang et 85% de protection contre les isolats de pneumocoques colonisant des sites stériles (217). La vaccination avec le Pneumovax 23® induit une réponse immunitaire indépendante des cellules T généralement faible et inconsistante chez les enfants de moins de deux ans et les patients immunosupprimés. Le VP est recommandé chez les enfants ayant plus de deux ans ainsi que les adultes sains. Le VP aurait un effet protecteur chez les groupes à risque, entre autres, chez les patients âgés ayant des maladies respiratoires obstructives chroniques, les patients aspléniques ou les patients à risque de contracter une infection à pneumocoque (43).

1.5.2 Vaccin polysaccharidique conjugué (VPC)

Le VPC Prevnar® consiste en des polysaccharides de capsule conjugués à la protéine diphtérique CRM197 en suspension dans une solution contenant de l'aluminium sous forme de phosphate, à titre d'adjuvant, ce qui induit une réponse immunitaire dépendante des cellules T (4). Toutefois, l'immunogénicité de la liaison des polysaccharides à l'adjuvant fait en sorte que le nombre de sérotypes couverts par le vaccin est limité. Aujourd'hui, des valences de 4-13 sérotypes sont disponibles couvrant, dans le cas du Prevnar-7, 85% des sérotypes causant des infections aux pneumocoques aux États-Unis, 60-70% en Europe et 55% en Asie (194). Ce vaccin est, entre autres, recommandé pour les enfants de moins de deux ans (43).

Chapitre II: La diversité du génome de *Streptococcus* pneumoniae

La bactérie S. pneumoniae a joué un rôle critique dans la démonstration que l'ADN est le matériel génétique héréditaire. En effet, en 1944, Avery, MacLeod, et McCarthy ont démontré que l'ADN était l'élément transformé identifié par Griffith quelques années plus tôt (17, 92). Depuis ce jour, le pneumocoque a été un organisme modèle afin d'étudier la transformation chez les bactéries dû à son système de compétence inductible qui lui permet d'acquérir de l'ADN de son environnement et de l'intégrer par recombinaison dans son génome. Cette caractéristique du pneumocoque lui apporte ainsi une certaine plasticité génomique caractéristique des bactéries naturellement compétentes (63, 120). En effet, l'analyse comparative des génomes des souches TIGR4 (2 161 kb) et de R6 (2 039 kb) a permis de confirmer que 10% de leur contenu génomique diffère (38, 246). L'analyse de soixante-douze isolats invasifs et non invasifs de pneumocoques (23 de sérotype 6A, 29 de sérotype 6B et 20 sérotype 14) par la méthode d'hybridation de génomes sur puce à ADN a permis de déterminer que l'équivalent de 1553 gènes (73% du génome de TIGR4 présent sur la puce) correspondrait au génome de base du pneumocoque, suggérant qu'environ 27% du génome serait variable parmi les isolats (185). Une étude comparative similaire, mais utilisant dans ce cas le pyroséquençage 454 chez huit isolats cliniques combinés aux résultats de séquences de neuf autres souches a permis de déterminer que 21 à 32% du génome de chaque souche serait variable (109). Ces observations sur la très grande diversité du génome du pneumocoque entre les souches supportent en effet l'hypothèse de la distribution du génome qui stipule que pour une bactérie, la totalité des gènes disponibles existe sous forme de « supragénome » et que chacun des membres de la population qui sont naturellement transformables contribue à la sélection des gènes disponibles. Chez le pneumocoque, le supragénome serait estimé à plus de 5000 groupes orthologues, dont environ 3000 seraient retrouvés à une fréquence $\geq 0,1\%$ dans la population de S. pneumoniae (109).

2.1 Acquisition d'ADN exogène

Chez les bactéries, l'acquisition d'ADN exogène se fait principalement par transferts horizontaux impliquant la transformation, la conjugaison et la transduction. Ces mécanismes seront plus amplement détaillés dans cette section.

2.1.1 Transformation

La transformation est l'intégration d'un fragment d'ADN étranger dans une cellule, ce qui peut entraîner une modification héréditaire du phénotype de l'organisme receveur. Cette section abordera le mécanisme de transformation chez *S. pneumoniae*.

Le pneumocoque, comme plusieurs autres bactéries telles *H. influenzae, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis* et *Bacillus subtilis* ont la possibilité de devenir naturellement compétent à la transformation. Cet état requiert un consortium de gènes présent dans le génome bactérien. Contrairement à la transformation artificielle, la transformation naturelle permet d'acquérir de grandes quantités d'ADN pouvant correspondre à 10% de la taille du génome dans le cas du pneumocoque (253).

L'induction de la compétence est faite par un mécanisme dit à deux composantes (176). Cet état temporaire utilise un mécanisme de communication cellule-cellule hautement régulé dépendant d'un peptide de stimulation de la compétence (CSP : « competence-stimulating peptide») (Voir Figure 2.1). Le CSP est synthétisé sous forme de précurseur, ComC, qui est clivé par ComA, une protéine de la famille des transporteurs ABC, qui avec ComB, sécrète le CSP mature dans l'espace extracellulaire. Il existe deux isoformes de CSP chez le pneumocoque, soit le CSP-1 et le CSP-2 qui diffèrent de huit acides aminés (121). Environ la moitié des souches cliniques possèdent une séquence *comC* codant pour la variante 1 du CSP (121). L'accumulation de CSP à l'extérieur de la cellule permet sa liaison avec son récepteur ComD, une histidine kinase qui s'autophosphoryle et

active le régulateur transcriptionnel ComE. L'activation de ComE aura pour effet d'augmenter la transcription des opérons *comAB* et *comCDE* par la reconnaissance d'une séquence répétée (« com-box ») en amont de ceux-ci. Cette même séquence est également présente en amont des deux copies du gène *comX* et du gène *comW*. Un autre système à deux composantes, CiaH-CiaR, peut empêcher le développement de la compétence en réprimant l'expression de l'opéron *comCDE* (96). L'utilisation de CSP synthétique a le même effet sur l'activation de la compétence, ce qui permet l'induction de la compétence dans des conditions de laboratoire. Les gènes *comAB*, *comCDE*, *comX*, *comW* sont considérés comme des gènes précoces de la compétence.



Figure 2.1 : L'induction de la compétence chez *S. pneumoniae* est régulée par un système de détection du quorum dépendant du peptide de compétence CSP. La sécrétion de CSP dans l'espace extracellulaire et la liaison à son récepteur ComD causera l'activation de ComE, puis ultimement ComX, permettant l'expression des gènes tardifs requis pour la translocation de l'ADN exogène dans la bactérie et l'intégration du fragment d'ADN dans le génome. Adapté de (56).

ComX est un facteur sigma alternatif qui est responsable, avec l'ARN polymérase, de la transcription des gènes tardifs (158). La quasi-totalité des gènes codant pour les protéines constituant le translocasome, un complexe protéique qui permet l'entrée de l'ADN dans la cellule, contiennent un motif « com-box » reconnu par ComX (176). Plusieurs de ces protéines jouent un rôle dans le transport de l'ADN (*cglABCDEFG*) à l'intérieur de la bactérie, alors que d'autres permettent la préparation de l'ADN avant son internalisation. À partir d'un ADN double brin, l'activité 5'-3' endonucléase de EndA clive l'un des brins d'ADN causant l'entrée d'un ADN simple brin (171). La liaison de la protéine SsB protège l'ADN simple brin de la dégradation par les nucléases intracellulaires. L'homologie de la séquence internalisée avec une région de l'ADN génomique bactérien permettra la formation d'une synapse de recombinaison et l'intégration du fragment grâce à la recombinase RecA (164).

La compétence joue un rôle crucial dans la plasticité du génome du pneumocoque. En plus de permettre l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques, elle joue un rôle important dans la virulence de la bactérie, soit en facilitant l'acquisition d'îlots de pathogénicité (122) ou en permettant d'échapper au vaccin anti-pneumococcique par le changement de sérotype de la capsule (122).

2.1.2 Conjugaison

Chez le pneumocoque, l'acquisition par transformation d'éléments conjugatifs, tels les plasmides et les transposons peut causer la résistance aux agents antimicrobiens. Cette section traitera des plasmides et des transposons conjugatifs reconnus pour causer la résistance aux antibiotiques chez *S. pneumoniae*.

Chez le pneumocoque, la présence naturelle de plasmide est rare. À ce jour, seulement des plasmides dits cryptiques, dont pDP1, ont été retrouvés. Ces plasmides codant seulement des gènes importants pour leur propre réplication seraient présents chez environ 4% des isolats cliniques de pneumocoques (228). Cependant, *S. pneumoniae* a la

capacité d'acquérir des plasmides conjugatifs « R » normalement retrouvés chez les autres streptococci (234), ce qui a permis d'utiliser des dérivés de ces plasmides pour des études fonctionnelles (239). Une multitude de plasmides réplicatifs et non-réplicatifs sont disponibles afin de respectivement exprimer ou inactiver des gènes chez le pneumocoque (98, 144). Ces plasmides peuvent contenir des gènes de résistance à l'érythromycine (EM), la tétracycline (TC), le chloramphénicol (CM), la kanamycine (KAN) et la spectinomycine ce qui permet la sélection de ceux-ci chez le pneumocoque (98). Dans les études présentées dans cette thèse, nous avons utilisé une série de plasmides nommés pFF. Ceux-ci ont la capacité de se répliquer chez *Escherichia coli,* mais pas chez *S. pneumoniae* en raison de l'absence d'origine de réplication. Les marqueurs de résistance CM (pFF3), KAN (pFF6) et EM (pFF4) sont sous le contrôle du promoteur du gène *amiC*. Ces plasmides, en plus d'être de petite taille, permettent d'obtenir un nombre élevé de copies chez *E. coli* et ils contiennent un site EamII05I qui permet un clonage TA.

Les transposons conjugatifs de la famille Tn916/Tn1545 sont les principaux éléments mobiles responsables de la multirésistance clinique chez *S. pneumoniae* (48, 49). Les transposons de cette famille peuvent contenir des gènes de résistance aux TCs, aux macrolides, aux lincosamides, aux streptogramines, à la KAN et au mercure. Tn916 diffère de Tn1545 par l'insertion du gène *ermB*, causant le phénotype de résistance MLS (résistance aux macrolides-lincosamides et streptogramine) et *aphA* responsable de la résistance à la KAN (48, 49). Plusieurs autres éléments dérivés de Tn916 (Tn3872), Tn2010, Tn2017 et Tn5253) et de Tn1545 (Tn6002 et Tn6003) ont été répertoriés et chacun peut causer la résistance chez *S. pneumoniae*.

2.1.3 Transduction

L'échange de matériel génétique par transduction est médié par les bactériophages, qui peuvent être classés en deux groupes distincts soit les phages lytiques ou tempérés. Les phages lytiques détournent le cycle cellulaire de la bactérie afin de produire de nouvelles particules virales infectieuses, alors que les phages tempérés ont une phase lysogénique où ils s'intègrent au génome de la bactérie pour former un prophage. Il est intéressant de noter que chez le pneumocoque environ 70% des souches contiendraient des prophages ou des vestiges de ceux-ci (210). Chez le pneumocoque, certains prophages peuvent être induits par la présence de fluoroquinolones (CIP et lévofloxacine (LVX)) (156). La fréquence des prophages fonctionnels et inductibles à la CIP serait plus élevée chez les souches sensibles en comparaison aux souches résistantes, ce qui affecterait le développement de la résistance à cet antibiotique chez la bactérie (156). Deux phages lytiques ont été isolés et séquencés chez *S. pneumoniae*, soit Cp-1, un phage de la famille des *Podoviridae*, et Dp-1, un *Siphoviridae* (84). Les phages lytiques contribueraient chez le pneumocoque à l'expansion du réservoir d'ADN exogène disponible par leur incorporation dans le génome de *S. pneumoniae*. (157, 210).
Chapitre III : Antibiothérapie

La découverte du premier antibiotique (la pénicilline (PG)) par Sir Alexander Flemming, en 1928, et sa production dans les années 1940 a révolutionné le traitement des infections causées par les bactéries. Un antibiotique (du grec anti : « contre », et bios : « la vie ») est une molécule naturelle ou synthétique qui détruit ou bloque la croissance des bactéries. Dans le premier cas, on qualifie l'antibiotique de bactéricide et dans le second cas on dira plutôt que l'antibiotique est bactériostatique. La majorité des antibiotiques sont produits par les bactéries du genre *Streptomyces* et ont pour but premier d'éliminer les bactéries concurrentes dans leur biotope (207). Plusieurs molécules aujourd'hui sur le marché sont des molécules de synthèse, dérivées ou non d'antibiotiques naturels.

3.1 Mécanismes d'action des antibiotiques

Les antibiotiques agissent de manière spécifique sur les bactéries en bloquant une étape essentielle de leur développement. On peut classer ces molécules selon les mécanismes qu'elles inhibent. Cinq mécanismes sont majoritairement ciblés, soit l'inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne, de la transcription, de la réplication de l'ADN, de la traduction et finalement le métabolisme des folates.

Tableau 3.1 1 Mécanismes d'action des principales familles d'antibiotiques utilisées chez l'Humain

Mécanismes d'action	Familles d'antibiotiques		
Inhibition de la synthèse de la	Pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes,		
paroi bactérienne	daptomycines, monobactames, glycopeptides		
Inhibition de la transcription	Rifampicine		
Inhibition de la réplication de	Fluoroquinolones		
l'ADN			
Inhibition de la synthèse	Tétracyclines aminoglycosides strentogramines		
protéique	lincosamides, macrolides, kétolides, oxazolidinones		
Inhibition du métabolisme	Sulfonamides, triméthoprime		
des folates			

3.1.1 Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne

Le peptidoglycane est une composante de base de la paroi bactérienne qui protège la bactérie contre la pression osmotique. Cette composante est unique aux bactéries ce qui en fait une cible de choix pour le traitement antibactérien. Il est composé de polymères de sucres liés de manière covalente par de courtes chaînes peptidiques formant ainsi un réseau de N-acétyl-glucosamine et d'acide N-acétylmuramique (254). Les protéines liant la pénicilline (PLPs) sont des transpeptidases responsables de l'étape finale de la synthèse du peptidoglycane (254). Les molécules contenant un noyau β -lactame (la PG, les céphalosporines et les monobactames) se lient aux PLPs et bloquent l'étape cruciale de transpeptidation qui permet d'établir les liens peptiques entre les couches de peptidoglycane. Les glycopeptides agissent également sur la paroi bactérienne en séquestrant la queue pentapeptidyl (D-Ala-D-Ala) libre sur les unités d'acide N-acétylmuramique, ce qui rend impossible l'assemblage du peptidoglycane (260).

3.1.2 Inhibition de la transcription

Un seul antibiotique de cette classe est utilisé cliniquement dans le traitement des infections à *Mycobacterium tuberculosis*; il s'agit de la rifampicine (rifampine). Cette drogue agit en tant qu'inhibiteur de l'ARN polymérase. Elle lie la sous-unité β de l'ARN polymérase bactérien à un site allostérique, ce qui bloque l'élongation de la chaine d'ARN (260).

3.1.3 Inhibition de la réplication de l'ADN

Les quinolones (fluoroquinolones) constituent une importante famille d'antibiotiques qui agit en inhibant la réplication de l'ADN. Cette famille bloque l'action des enzymes ADN gyrase et ADN topoisomérase IV (104). Les fluoroquinolones feront l'objet du chapitre IV de cette thèse.

3.1.4 Inhibition de la synthèse protéique

La composition du ribosome bactérien diffère de celle des cellules eucaryotes, ce qui en fait une excellente cible pour les antibiotiques. En effet, le ribosome bactérien (coefficient de sédimentation : 70 svedbergs (S)) est constitué d'une grande sous-unité 50S (60S cellules eucaryotes) et d'une petite sous-unité 30S (40S cellules eucaryotes), chacune composée d'ARNr et de protéines ribosomales. La plupart des antibiotiques qui inhibent la synthèse protéique se lient à l'une ou l'autre des sous-unités du ribosome. Ainsi, les aminoglycosides et les TCs fixent la petite sous-unité du ribosome (30S). Les TCs inhibent l'élongation de la chaîne polypeptidique alors que les aminoglycosides agissent en induisant des erreurs dans le décodage des codons effectués par le ribosome ce qui entraîne l'accumulation d'erreurs dans les protéines synthétisées. L'accumulation de protéines aberrantes est responsable de la létalité induite par les aminoglycosides. Les composés phénicols (CM), les macrolides, les lincosamides et les streptogramines se lient à la grande sous-unité 50S et bloquent la formation du lien peptidique (CM) ainsi que l'élongation de la chaîne polypeptidique (macrolides, lincosamides et streptogramines). Les oxazolidinones, quant à eux, empêchent la formation du complexe d'initiation sur le 70S (260).

3.1.5 Inhibition du métabolisme des folates

Le métabolisme des folates permet la conversion du dUMP en dTMP, molécule essentielle à la synthèse du dTTP utilisé lors de la synthèse d'ADN. Cette étape de conversion nécessite le métabolite terminal de la voie de biosynthèse des folates, l'acide tétrahydrofolique (26). Chez les bactéries, l'obtention de ce métabolite utilise une voie de synthèse *de novo* ayant comme substrat primaire le GTP et le *para*-aminobenzoate. Les sulfonamides empêchent la synthèse du dihydroptéorate, un intermédiaire de la voie de synthèse *de novo*, en inhibant l'activité de la dihydroptéorate synthase, alors que la thriméthoprime inhibe la synthèse du tétrahydrofolate en inhibant l'activité de la dihydrofolate réductase (260).

3.1.6 Nouveaux mécanismes d'action des antibiotiques; productions de dérivés réactifs à l'oxygène

La classification du mode d'action des antibiotiques repose principalement sur la cible affectée (Voir section 3.1) et la conséquence phénotypique sur la croissance. Les antibiotiques peuvent être désignés comme bactéricides s'ils tuent plus de 99,9% des bactéries, alors que les antibiotiques bactériostatiques causent une inhibition de la croissance. En 2007, un modèle fut proposé quant aux mécanismes expliquant le caractère létal des antibiotiques bactéricides, celui-ci impliquant la production de dérivés réactifs à l'oxygène (ROS) causant la mort cellulaire aussi bien chez les bactéries à Gram positif que Gram négatif (141). Selon ce modèle, peu importe la cible de l'antibiotique bactéricide (β-lactamines : PLPs, fluoroquinolones : ADN gyrase et aminoglycoside : ribosome) la mort cellulaire résulterait de la production de radicaux libres impliquant l'activation du cycle de Krebs, une déplétion transitoire en NADH, une déstabilisation des groupements fer-soufre

et la stimulation de la réaction de Fenton. Récemment, cette hypothèse a été vigoureusement contestée et des éclaircissements seront nécessaires afin de mieux comprendre le rôle des ROS dans le mode d'action des antibiotiques bactéricides (135, 154). Néanmoins, des études subséquentes semblent démontrer que la létalité des antibiotiques bactéricides nécessite leurs mécanismes primaires drogue-spécifiques, en plus de la production de ROS (68).

La production de ROS survient également chez *S. pneumoniae* suite à l'exposition à certains antibiotiques bactéricides (PG, CIP et KAN). En effet, une diminution potentielle de la quantité de fer intracellulaire subséquente à la sélection d'une mutation non-sens dans un importeur de fer fut impliquée dans la diminution de ROS induite par ces drogues (74).



Figure 3.1 Modèle du mode d'action des antibiotiques bactéricides tel que renouvelé par (140).

3.2 Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Chaque année aux États-Unis au moins deux millions de personnes sont infectées par des bactéries résistantes aux antibiotiques et environ 23 000 personnes en décèdent

(43). Le fardeau associé à la résistance aux antibiotiques augmente depuis plusieurs années et une accélération a pu être observée dans les dix dernières années (103). En effet, l'usage généralisé, voire abusif de certains antibiotiques, y compris en traitement préventif, curatif, en complément alimentaire ou encore comme pesticide a introduit une pression de sélection qui a conduit au développement de populations de micro-organismes antibiorésistants et à une baisse générale de l'efficacité thérapeutique. Également, l'absence de nouvelles molécules thérapeutiques depuis plus de dix ans n'a fait qu'augmenter le fardeau causé par la résistance, rendant dans certains cas le traitement des infections complexes, par exemple dans le cas de souches multi-résistantes d'*Acinetobacter baumannii*, d'Enterobacteriaceae résistants aux carbapénèmes, de *Neisseria* résistants résistants à la ceftriaxone et d'*Enterococcus* résisants à la vancomycine (173, 237, 244).

Chez les bactéries, la résistance à un antibiotique peut être innée (« naturelle ») ou acquise. En effet, la plupart des bactéries du genre *Streptomyces* produisant des antibiotiques sont résistantes aux molécules qu'elles produisent. Cependant, l'acquisition de gènes de résistance par transformation, conjugaison et transduction peut induire la résistance à un antibiotique chez la bactérie qui a acquis cet élément d'ADN exogène. Les mécanismes de résistance chez les bactéries peuvent être classés en cinq types qui sont décrits dans les prochaines sous-sections.

3.2.5 Réduction de la perméabilité membranaire

Afin d'être efficace, un antibiotique doit pouvoir s'accumuler en quantité suffisante pour avoir l'effet escompté. Ainsi, tout mécanisme visant à diminuer l'entrée de l'antibiotique dans la bactérie causera la résistance envers cette molécule. Chez les bactéries à Gram négatif, l'entrée des antibiotiques tels les β -lactamines (273), le CM et les fluoroquinolones (181) nécessite la présence de porines dans la membrane externe. Un changement dans le nombre de copies de porines, de la taille ou de la sélectivité de celles-ci peut causer un changement de la perméabilité membranaire envers l'antibiotique (101, 182).

3.2.6 Efflux de l'antibiotique

La concentration intracellulaire de l'antibiotique peut également être diminuée par l'efflux de celui-ci à l'extérieur de la cellule. L'augmentation de l'efflux actif des antibiotiques est préoccupante, car certains transporteurs peuvent produire la résistance à plusieurs antibiotiques, rendant les souches multi-résistantes (11, 106, 151, 204). Également, l'efflux combiné avec d'autres mécanismes peut conduire à des niveaux de résistance élevés chez des souches cliniques, compromettant l'antibiothérapie (151). Pour fonctionner, les pompes d'efflux utilisent l'énergie fournie par dissipation d'un gradient de protons (familles MFS, RND et SMR) ou d'ions sodium (famille MATE) ou encore par l'hydrolyse d'ATP (famille ABC). Des exemples types reliés à chacune des cinq familles de pompe d'efflux causant la résistance sont illustrés à la Figure 3.2.

Chez le pneumocoque, l'efflux est un mécanisme de résistance aux fluoroquinolones et aux macrolides (151). La résistance aux fluoroquinolones et aux macrolides, incluant les kétolides, peut être causée par des pompes de types MFS comme PmrA (fluoroquinolones), ainsi que MefA et MefE (macrolides) (128, 138, 151, 267). La résistance à la bacitracine (23) et aux fluoroquinolones (70, 86, 163, 220) peut également être médiée par des pompes de type ABC chez *S. pneumoniae*.



Figure 3.2 Représentation schématique de différents types de pompes d'efflux d'antibiotiques chez les bactéries. Les pompes NorA (MFS) de *Staphylococcus aureus*, EmrE (SMR) d'*E. coli*, NorM (MATE) de *Vibrio parahaemolyticus*, AcrAB-TolC (RND) d'*E. coli* et LmrA (ABC) de *Lactococcus lactis* expulsent leurs substrats (Ab) par l'utilisation d'énergie provenant d'un gradient d'ions (proton (H+) ou sodium (Na+)) ou d'ATP. Adapté de (143).

3.2.1 Modification de la cible

Une troisième stratégie afin de contrer l'effet d'un antibiotique est la modification de la cible de celui-ci. En effet, la présence de mutations peut modifier le site actif de la cible de l'antibiotique et ainsi empêcher sa liaison. La résistance aux β -lactamines est le résultat de mutations au niveau des PLPs (100). De plus, la résistance aux fluoroquinolones est médiée par l'acquisition de mutations dans les gènes codant pour l'ADN gyrase et la topoisomérase IV, qui sont les cibles des fluoroquinolones (71). Également, une modification chimique de la cible peut causer la résistance en empêchant l'antibiotique de s'y lier. Par exemple, la méthylation de l'ARNr 23S au site de liaison des macrolides par une ARN méthyltransférase peut causer la résistance à cette famille (260).

3.2.2 Inactivation de l'antibiotique

Une autre stratégie consiste en la destruction de la drogue. Certaines souches bactériennes peuvent acquérir des gènes codant pour des enzymes dégradant le noyau β -lactame des pénicillines et des céphalosporines (200). Également, d'autres classes d'antibiotiques comme les aminoglycosides peuvent être neutralisées par des adénylyl-transférases, des phosphoryl-transférase ou des acétyl-transférases, ce qui réduit leur affinité pour leurs cibles (227).

3.2.2 Amplification de la cible

En réponse à la présence d'un antibiotique, l'amplification génique constitue une réponse adaptative observée chez les bactéries et les cellules eucaryotes. Chez *S. agalactiae*, la résistance aux sulfonamides et au triméthoprime est médiée par l'amplification génique d'une région de 13,5 kb contenant les gènes *folCEPBK* impliqués dans le métabolisme des folates (34). Récemment, l'amplification génique d'une région de 9,2 kb contenant les gènes *patA* et *patB* a été répertoriée chez une souche clinique de *S. pneumoniae* résistante aux fluoroquinolones (21).

3.3 Résistance aux antibiotiques chez S. pneumoniae

En 2005, l'OMS a évalué que près de 1,6 million de personnes décèdent chaque année suite à une infection au pneumocoque, la majorité étant des enfants vivant dans des pays sous-développés (0,7 à 1 million) (1). Bien que la vaccination ait diminué la prévalence des infections causées par *S. pneumoniae*, la résistance à la PG, aux macrolides, aux TCs et au CM serait attribuée à certains clones de pneumocoques (PG : 6A, 6B, 9V, 14,19A, 19F et 23F; Multi-résistance : 6B, 19A, 19F et 23F) (169, 202). Dans cette partie du texte, la résistance aux β -lactamines, aux macrolides, à la VA et à la LZD sera abordée. Les fluoroquinolones, ainsi que les TCs feront l'objet des chapitres IV et V, respectivement.

3.3.1 Résistance aux β-lactamines

Aux États-Unis, plus de 25% des souches seraient insensibles à la PG, mais ce pourcentage pourrait atteindre jusqu'à 60 et même 80% en Amérique latine et dans quelques pays d'Asie (13). Chez les souches cliniques de pneumocoque, la résistance résulte principalement de l'acquisition de versions mutées des PLPs suite à des transferts intra- ou inter-espèces (214). Plusieurs mutations dans une PLP peuvent être nécessaires afin de causer une diminution de l'affinité de la β-lactamine. Également, des mutations au niveau de plus d'une PLP peuvent être nécessaires afin que la souche acquière une résistance élevée à l'antibiotique (91, 212). L'acquisition de haut niveau de résistance à la PG chez des souches cliniques serait due à des mutations au niveau des PLP1a, PLP2b et PLP2x, alors que la résistance aux céphalosporines nécessiterait des mutations dans les PLP1a et PLP2x (51). Plusieurs mécanismes n'impliquant pas les PLPs ont également été décrits chez le pneumocoque (73, 99, 233).

3.3.2 Résistance aux macrolides et aux kétolides

Aux États-Unis, environ 31% des souches de *S. pneumoniae* seraient résistantes aux macrolides (13). Les molécules les plus utilisées de cette famille en Amérique du Nord sont l'EM, la clarythromycine, l'azithromycine et la télithromycine, une kétolide structurellement similaire à l'EM et à la clarythromycine (64). La résistance aux macrolides est principalement causée par l'altération de la cible et par efflux. L'expression du gène *ermB* codant pour une méthylase ribosomale confère une haute résistance aux macrolides (Concentration minimale inhibitrice (CMI) $\geq 64 \ \mu g/mL$), aux lincosamides et à la streptogramine B par méthylation de la position 2058 de l'ARNr 23S. Également, l'efflux causé par MefE et MefA confère un bas niveau de résistance aux macrolides (CMI 1-32 $\mu g/mL$) uniquement. La présence de mutations au niveau des protéines L4 and L22, toutes deux importantes dans l'assemblage précoce de la sous-unité 50S du ribosome, pourrait contribuer à la résistance aux macrolides, ainsi qu'aux kétolides (64).

3.3.3 Résistance à la LZD

La résistance à la LZD chez les bactéries à Gram positif résulte le plus souvent de l'acquisition de mutations dans l'ARNr 23S (208). Bien que la résistance clinique à la LZD n'ait pas été rapportée pour le moment chez le pneumocoque, des souches ayant une sensibilité diminuée (MIC 4 μ g/mL) suite à une délétion dans le gène codant pour la protéine ribosomale L4 ont été décrites (269). L'étude de souches sélectionnées en laboratoire a démontré que la résistance à la LZD implique également des mutations dans une méthyltransférase de l'ARNr 23S et des mutations causant la surexpression du transporteur ABC PatA/PatB (77).

Chapitre IV : La famille des fluoroquinolones

Les fluoroquinolones sont des dérivés synthétiques de l'acide nalidixique ayant un noyau 4-quinolone (Figure 4.1). Cette famille d'antibiotiques comporte aujourd'hui quatre générations dont les diverses modifications ont permis d'augmenter leur spectre d'activité. Les quinolones de troisième (exemples : LVX, sparfloxacine, témafloxacine, MOX et gatifloxacine) et quatrième (exemples : clinafloxacine, trovafloxacine) générations sont utilisées pour traiter les pneumonies acquises en communauté (125), dont *S. pneumoniae* est un important agent étiologique.



Figure 4.1 : Structure des fluoroquinolones. Adapté de (66).

4.2 Mode d'action des fluoroquinolones

Les quinolones inhibent la synthèse de l'ADN en ciblant deux topoisomérases de type II, l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Les deux enzymes permettent la concaténation d'ADN double brin en superenroulement positif ou négatif en créant une cassure double brin au site de réarrangement. Malgré la similarité de structure entre les deux enzymes, celles-ci ont des fonctions cellulaires différentes. L'ADN gyrase est un tétramère de type A2B2 codé par les gènes *gyrA* et *gyrB* et est une enzyme exclusive aux bactéries. Elle utilise l'ATP afin d'introduire des supertours négatifs dans l'ADN, élément essentiel à la condensation du chromosome et à l'initiation de la transcription (150, 262). La topoisomérase IV a deux fonctions dans la cellule. L'une d'elle consiste en la déconcaténation des deux chromosomes filles, permettant ainsi leur ségrégation. La seconde fonction consiste en la relaxation des supertours positifs. La topoisomérase IV est également un tétramère de type A2B2 codé par les gènes *parC* et *parE*. Les sous-unités ParC et ParE partagent environ 35 % d'identité avec les sous-unités GyrA et GyrB (71).

L'action inhibitrice des quinolones sur les topoisomérases de type II se produit via la formation d'un complexe topoisomérase-ADN en présence de deux molécules d'antibiotique tel que proposé par le modèle crystalographique obtenu pour la topoisomérase IV en présence de MOX et d'ADN (Figure 4.2) (148).



Figure 4.2 : Représentation du site de clivage du complexe de la topoisomérase IV. La moxifloxacine est représentée en rouge. L'ADN est représenté en vert. Le site actif tyrosine (Tyr118) est représenté en orange. Les résidus Ser-70 et Asp83 sont représentés en jaune. Adapté de (148).

4.3 Mécanismes de résistance

La prévalence mondiale de la résistance aux fluoroquinolone est inférieure à 1 %, toutefois celle-ci est beaucoup plus élevée dans certaines régions telles que Hong Kong (14%), le Sri Lanka (9.5%), les Philippines (9.1%) et la Corée (6.5%) (177, 235). Au Canada, l'utilisation de la CIP a causé une augmentation de la prévalence des souches résistantes de 1% en 1997 à 4,2% en 2005 (5). Cependant, la résistance à la CIP semble s'être stabilisée dû, entre autres, au remplacement de la CIP par des fluoroquinolones respiratoires de nouvelles générations (193).

4.3.1 Mutations dans l'ADN gyrase et la topoisomérase IV

La résistance aux fluoroquinolones est, entre autres, provoquée par l'apparition successive de mutations au niveau des cibles des fluoroquinolones, l'ADN gyrase et l'ADN topoisomérase IV. Chez S. pneumoniae, plusieurs fluoroquinolones (CIP, LVX, norfloxacine, et perfloxacine) sélectionnent préférentiellement des changements au niveau du gène *parC*, alors que d'autres molécules comme la sparfloxacine et la MOX acquièrent plutôt des changements au niveau de gyrA (37, 190). Des expériences in vitro chez S. pneumoniae exposé à la CIP ont démontré que les mutations parC apparaissent avant les mutations gyrA, ce qui supporte l'hypothèse que ParC est la cible primaire de la CIP chez cette bactérie (118, 179, 189). Cette situation est différente chez les bactéries à Gram négatif pour lesquelles gyrA est la cible primaire des fluoroquinolones (272). Chez S. pneumoniae, la présence de mutations uniquement au niveau de parC est souvent associée à un faible niveau de résistance aux fluoroquinolones, alors que l'acquisition de hauts niveaux de résistance nécessite des mutations dans parC et dans gyrA (118, 240). Les mutations sont le plus souvent retrouvées dans des régions conservées nommées QRDRs (« Quinolones-resistance-determining-regions »), représentées par les acides aminés entre la position 67 et 106 de GyrA chez E. coli (224). Des mutations dans les régions QRDRs de gyrB et parE peuvent aussi diminuer la sensibilité aux fluoroquinolones, mais leur prévalence est faible comparativement aux mutations dans parC et gyrA (126). Ces mutations apparaissent généralement de façon spontanée, telles que décrites pour la LVX et la CIP chez le pneumocoque (82). Néanmoins, la recombinaison d'allèles mutés codants pour les topoisomérases a déjà été décrite comme mécanisme d'acquisition de mutations (255). L'analyse génétique de souches de pneumocoques résistantes aux fluoroquinolones a démontré que la présence de mutations dans les régions QRDR de *parC*, à la position 79 et 83, et de *gyrA*, à la position 81 et 85, sont responsables majoritairement de la résistance aux fluoroquinolones (20, 28, 40). Cependant, bien que les mutations soient généralement présentes au niveau des régions QRDRs, l'apparition des mutations semble hétérogène puisque des mutations à l'extérieur de cette région peuvent réduire la sensibilité aux fluoroquinolones chez *S. pneumoniae* (127, 263).

4.3.2 Efflux

Plusieurs bactéries à Gram négatif sont protégées de l'action des fluoroquinolones par des pompes de type MFS et RND exprimées de façon constitutive. Chez *Pseudomonas aeruginosa* et *A. baumannii*, les pompes de type RND MexAB-OprM et AdeABC sont responsables de la résistance multiple aux drogues (205, 266). Toutefois, chez plusieurs bactéries, la surexpression de pompes de type RND, MFS et MATE est nécessaire au phénotype de résistance aux fluoroquinolones (Tableau 4.1).

Chez le pneumocoque, la résistance aux fluoroquinolones peut être médiée par l'expression de deux pompes d'efflux, soit la pompe de type MFS PmrA et le transporteur ABC PatA/PatB. La pompe PmrA a été le premier mécanisme d'efflux décrit chez le pneumocoque et a été identifié en raison de son degré d'identité en acides aminés à la pompe NorA de *S. aureus* et Bmr de *B. subtilis* (24%) (90). Sa surexpression peut causer une augmentation de la CMI à la norfloxacine, la CIP et au colorant bromure d'éthidium (EtBr). En général, la surexpression de PmrA est retrouvée chez des souches résistantes contenant des mutations dans les régions QRDRs et son rôle dans la résistance aux fluoroquinolones pourrait être limité (18, 201)

Le transporteur ABC PatA/PatB fut révélé lors de la caractérisation de treize systèmes de transport de la famille des ABC chez *S. pneumoniae* TIGR4 (220). Les sousunités PatA (SP2075;TIGR4 Spr1887; R6) et PatB (SP2073;TIGR4 Spr1885;R6) possèdent chacune un domaine transmembranaire et un domaine liant l'ATP et s'assemblent en un hétérodimère afin de constituer le transporteur ABC PatA/PatB (31). Ce transporteur est homologue au transporteur LmrCD de *L. lactis* (248) et est capable d'induire la résistance à plusieurs agents, dont l'Etbr et les fluoroquinolones. La surexpression du transporteur PatA/PatB est associée à la résistance clinique du pneumocoque aux fluoroquinolones (86). En effet, l'expression du transporteur semble être modulée par la présence de concentrations sous-inhibitrices de CIP et de norfloxacine, deux fluoroquinolones considérées comme de bons substrats de ce transporteur. L'expression de *patA* est également modulée par la présence de la LVX, de MOX et de gemifloxacine, trois fluoroquinolones hydrophobes qui ne sont pas de bons substrats du transporteur, et également par la mitomycine C laissant présager que la surexpression du transporteur PatA/PatB serait le résultat d'une réponse générale au stress chez *S. pneumoniae* (18, 70).

Tableau 4.1 : Classification des pompes o	d'efflux causant	: la résistance aux	x fluoroquinolones
chez les bactéries. Adapté de (71)			

Microorganism	Popmes d'efflux				
	RND	MFS	MATE	ABC	SMR
Escherichia coli	AcrAB, AcrEF	MdfA	YdhE		
Salmonella enterica	AcrAB, AcrEF				
Klebsiella	AcrAB	KmrA,			
pneumoniae		KdeA			
Pseudomonas	MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-		PmpM		
aeruginosa	OprN, MexXY, MexVW, MexHI-				
	OpmD, MexPQ-OpmD				
Stenotrophomonas	SmeDEF, SmeABC				
maltophilia					
Acinetobacter	AdeABC, AdeIJK		AbeM		
baumannii					
Campylobacter jejuni	CmeABC, CmeDEF				
Staphylococcus		NorA, NorB,	MepA		
aureus		NorC, SdrM			
Streptococcus		PmrA		PatA,	
pneumoniae				PatB	

4.3.3 Résistance aux quinolones médiée par des plasmides

La résistance aux quinolones médiée par les plasmides fut originellement décrite chez une souche clinique de *Klebsiella pneumoniae* de l'Alabama (165). Les déterminants les plus caractérisés de ce groupe sont sans contredit les gènes *qnr*. Ces gènes codent pour des protéines pentapeptidiques répétées qui diminuent la sensibilité aux quinolones en protégeant le complexe formé de l'ADN gyrase ou de la topoisomérase IV avec l'ADN de l'effet inhibiteur des quinolones. Deux autres mécanismes codés par des plasmides ont également été décrits, soit une version mutée du gène aac(6')-lb-cr codant pour une aminoglycoside transférase permettant l'inactivation de la CIP par l'acétylation de cette dernière ainsi que l'efflux médié par les gènes oqxAB et qepA, découvert tous les deux chez des souches d'*E. coli* (241).

Chapitre V : La famille des TCs et des glycylcyclines

À la fin des années 1940, la découverte de la chlortétracycline et l'oxytétracycline (oxyTC), synthétisées naturellement par *Streptomyces aureofaciens* et *Steptomyces rimosus*, a ouvert la voie à une nouvelle famille d'antibiotiques, les TCs. Aujourd'hui, d'autres TCs naturellement synthétisées par des bactéries du genre *Streptomyces* (TC, démethyltétracycline) ont été découvertes, mais des produits de synthèse dérivés des TCs naturelles (méthacycline, doxycycline (DOX) et minocycline(MI)) sont également disponibles. Plus récemment, des dérivés synthétiques de la MI, les glycylcyclines, ont été introduits sur le marché.

Les TCs sont des agents antimicrobiens à large spectre ayant une bonne activité contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, les bactéries atypiques (chlamydia, mycoplasmes et rickettsies) ainsi que certains parasites protozoaires. Cette famille d'antibiotiques fut largement utilisée pour le traitement des infections bactériennes et également en prophylaxie contre le *Plasmodium falciparum* résistant à la melfoquine (57). Toutefois, bien que les TCs aient un rôle important en médecine humaine et vétérinaire, l'utilisation abusive de celles-ci en clinique et en agriculture a sélectionné un niveau de résistance élevé chez plusieurs espèces bactériennes (219).



Figure 5.1 : Structure des TCs et glycylcyclines Adapté de (123).

5.2 Mode d'action des TCs et des glycylcyclines

Les TCs et les glycylcyclines sont des antibiotiques généralement bactériostatiques (à l'exception de la tigécycline (TGC)) chez *S. pneumoniae* (199) qui agissent en bloquant l'entrée de l'aminoacyl-ARNt au site A de l'ARNr 70S lors de la traduction (62). Cette inhibition s'effectue par l'interaction de l'antibiotique à des sites précis sur l'ARNr 30S. Aucune protéine ribosomale ne semble impliquée dans la liaison des TCs et glycylcyclines au ribosome. Selon le modèle d'interaction de *Brodersen et al.* (35), la TC interagit principalement avec deux sites sur la sous-unité 30S. Le premier, appelé site primaire, est localisé près du site accepteur de l'aminoacyl-ARNt (le site A). La TC interagit principalement avec les bases 1054 et 1196 de l'hélice (H) 34 ainsi qu'avec la guanine 966 de H31 (Figure 5.2). Un ion magnésium divalent, essentiel à la liaison de la TC avec le ribosome, interagit avec les guanines 1197 et 1198. Le second site (site secondaire) est localisé près de H44 et entre le domaine central de H27 et le haut du domaine H11, où la TC interagit principalement avec les nucléotides U244, C893 et A892 (Figure 5.2).



Figure 5.2 : Sites de liaison (A) primaire et (B) secondaire de la TC avec l'ARNr 30S. Adapté de (35).

La TGC partage le même site d'interaction primaire que la TC, toutefois, la liaison de la partie 9-tert-butylaminoacétamido de la TGC avec la base C1054 en plus de la liaison d'un deuxième ion magnésium avec C966 seraient responsables de l'augmentation de l'affinité de la TGC pour le ribosome (Figure 5.3). En effet, la TGC a jusqu'à vingt fois plus d'affinité pour le ribosome comparativement à la TC (186). Aucun site d'interaction secondaire avec le ribosome n'a été observé dans le cas de la TGC (119).



Figure 5.3. Schéma de la liaison de la TGC (A) avec l'ARNr 16s (B) Comparaison de la liaison de la TC et la TGC à l'ARNr 16s. Adapté de (119).

5.3 Mécanismes de résistance

5.3.1 La famille des TCs

Chez les bactéries, la résistance aux TCs est principalement causée par l'acquisition de gène *tet* (« tetracycline resistance »). Toutefois, chez certaines espèces, l'acquisition de mutations chromosomiques peut également diminuer la sensibilité aux TCs.

5.3.1.1 Gènes tet et otr

Les protéines Tet et Otr sont des déterminants de la résistance à la TC et à l'oxyTC qui sont principalement acquis par conjugaison de plasmides et de transposons conjugatifs. À ce jour, plus de quarante-cinq gènes *tet* et *otr* ont été répertoriés (Tableau 5.1). La classification des gènes *tet* et *otr* dépend principalement de l'homologie de séquences entre

les gènes faisant partie d'une même classe : un gène doit avoir au moins 80% d'homologie pour être répertorié dans une classe connue. Trois mécanismes ont été répertoriés à ce jour, soit l'efflux, la protection ribosomale et l'inactivation enzymatique de la TC. Toutefois, les deux premiers mécanismes sembleraient avoir davantage d'implications cliniques. En effet, seulement trois gènes *tet* causeraient l'inactivation de la TC. Le gène *tet*(X), isolé de *Bacteroides*, ne semble avoir d'effet que chez ce dernier (238). Également, les gènes *tet*(37) codant pour une oxydoréductase dépendante du NADPH et *tet*(34) codant potentiellement pour une xanthine-guanine phosphoribosyl transférase n'ont pour le moment pas été observés chez des bactéries pathogènes. Dans le cas du déterminant *tet*(U), isolé chez *Enterococcus* et *Staphylococcus*, la fonction reste à être confirmée.

Vingt-neuf gènes *tet* et *otr* codent pour des protéines d'efflux de la famille MFS à douze ou quatorze domaines transmembranaires conduisant ainsi à une diminution de la concentration intracellulaire de TC. La plupart de ces protéines d'efflux confèrent la résistance à la TC uniquement (exception de *tet*(B)). À l'inverse, les mécanismes de protection du ribosome peuvent causer la résistance à la TC, DOX et MI. Douze gènes *tet* et *otr* codent pour des protéines de protection du ribosome. Ces protéines Tet ont une homologie avec le facteur d'élongation de la traduction EF-Tu, particulièrement au niveau de sa région amino-terminale, qui permet le rapatriement de l'aminoacyl-ARNt au site A. La présence de protéines de protection du ribosome (comme TetM) cause la résistance en déplaçant la TC de son site de liaison ce qui donne accès au facteur EF-Tu lié à l'aminoacyl-ARNt au site A du ribosome (65).

La distribution des gènes *tet* varie grandement selon les genres bactériens. Chez les Enterobacteriaceae, les gènes *tet*(A) et *tet*(E) seraient les principaux responsables de la résistance aux TCs. Chez *S. aureus*, les gènes *tet*(K) et *tet*(M) sont généralement rencontrés, alors que chez *S. pneumoniae*, les gènes *tet*(M) et *tet*(O) sont pour le moment les seuls gènes *tet* à être impliqués dans la résistance aux TCs (79).

Efflux (29)	Protection du ribosome (12)	Inactivation	Inconnu
		enzymatique	
		(3)	
tet(A), tet(B), tet(C), tet(D),	tet(M), tet(O), tet(S), tet(W),	tet(X)	<i>tet</i> (U)
<i>tet</i> (E)	<i>tet</i> (32), <i>tet</i> (Q), <i>tet</i> (T), <i>tet</i> (36)	<i>tet</i> (37)	
tet(G), tet(H), tet(J), tet(V),	otr(A), tetB(P), tet	<i>tet</i> (34)	
<i>tet</i> (Y)	<i>tet</i> (44)		
<i>tet</i> (Z), <i>tet</i> (30), <i>tet</i> (31), <i>tet</i> (33)			
<i>tet</i> (35)			
<i>tet</i> (39), <i>tet</i> (41)			
<i>tet</i> (K), <i>tet</i> (L), <i>tet</i> (38), <i>tet</i> (45)			
tetA(P), tet(40)			
<i>otr</i> (B), <i>otr</i> (C)			
tcr			
<i>tet</i> (42)			
<i>tet</i> (43)			
tetAB(46)			

Tableau 5.1 Classification des gènes *tet* et *otr*. Adapté de (218)

5.3.1.2 Autres mécanismes

Des mutations chromosomiques au niveau de gènes codant pour des constituants du complexe ribosomal peuvent également causer la résistance aux TCs chez certaines espèces. Chez *Helicobacter pylori*, la mutation du triplet AGA₉₂₆₋₉₂₈ \rightarrow TTC dans les deux copies des gènes codant pour l'ARNr 16S cause un haut niveau de résistance à la TC, alors qu'un changement d'une ou deux bases induit un niveau de résistance plus faible (58, 270). Chez *N. gonorrhoeae*, des mutations ponctuelles au niveau du gène *rpsJ*, codant pour la protéine ribosomale S10, du gène *mtrR* codant pour un régulateur transcriptionnel et du gène *penB*, codant pour une porine ont été impliquées dans la résistance à la TC (115). De plus, la surexpression de pompes d'efflux de type ABC peut contribuer à la résistance à la TC chez certaines bactéries à Gram négatif (9, 116, 167).

5.3.2 La TGC

Bien que la résistance à la TGC soit rare chez le pneumocoque, elle fut décrite chez certaines espèces de bactéries à Gram négatif (14, 19, 32, 111, 131, 184) pour

lesquelles la résistance résulte principalement de l'expression de pompes d'efflux de type RND. Chez *Pseudomonas spp.* et *Proteus mirabilis*, deux espèces qui ont une résistance innée à la TGC, l'expression des pompes MexXY-OmpR et AcrAB est responsable de la résistance (61, 258). Également, chez *A. baumannii* et *Serratia marcescens*, la surexpression des pompes RND AdeABC et SdeXY-HasF diminue la sensibilité à la TGC (50, 112). Il a été démontré que la surexpression des facteurs de transcription MarA chez *E. coli*, de RamA chez *K. pneumoniae* et l'inactivation du répresseur RamR chez *Salmonella enterica* et chez *K. pneumoniae* peut altérer l'expression de la pompe AcrAB en faveur de la résistance à la TGC (132, 222, 257). Également, l'activation du système à deux composantes BaeSR, régulant l'expression de AdeABC chez *A. baumannii*, peut causer la résistance chez des isolats cliniques et des souches sélectionnées *in vitro* (152).

Mis à part l'efflux, des mutations dans les gènes rpsJ codant pour la protéine ribosomale S10, trm codant pour une méthyltransférase dépendante de sadenosylméthionine (SAM) et plusieurs gènes liés à la biosynthèse des lipopolysaccharides ont été associées à la résistance à la TGC chez *K. pneumoniae*, *A. baumannii* et *E. coli* (44, 153, 257). La TGC n'est pas affectée par la présence de gènes *tet* sauf dans le cas de *tet*(A) qui semble augmenter la résistance à la TGC chez *S. enterica* (8). La dégradation de la TGC par le produit du gène *tet*(X) a également été proposée comme mécanisme de résistance à la TGC (175). Chez les bactéries à Gram positif, la résistance n'a été rapportée que chez le genre *Enterococcus* et chez *S. aureus* (80). L'analyse génomique de souches *S. aureus* résistantes à la TGC sélectionnées *in vitro* a démontré que la diminution de la sensibilité est due à la pompe de type MATE MepA (168).

Chapitre VI : Étude de la résistance aux antibiotiques par approche « omique »

6.1 Séquençage de génome entier

Le premier génome bactérien publié a été celui de *H. influenzae* en 1995 par la méthode d'approche globale ou « shotgun » (78). Chez le pneumocoque, cette technique a également été utilisée pour le séquençage des premiers génomes de *S. pneumoniae* (R6 et TIGR4), au début des années 2000. Néanmoins, déjà au début des années 1990 des séquences partielles du génome du pneumocoque (localisés sur des fragments SmaI et ApaI) ont été utilisées pour construire la carte du génome de cette bactérie (88).

Étudier la résistance aux antibiotiques par une approche génomique nécessite des techniques permettant de résoudre la séquence du génome de l'organisme que l'on étudie. En effet, le génome bactérien est exposé à plusieurs événements génétiques, incluant les mutations, les duplications, les inversions, les transpositions, les délétions, les recombinaisons et les insertions qui peuvent conférer une nouvelle capacité métabolique à l'organisme qui a subi ces modifications. Pour repérer ces modifications impliquées dans la résistance, l'analyse comparative de souches résistantes et sensibles aux antibiotiques s'est avérée être une méthode de choix pour étudier les mécanismes impliqués dans la résistance et pour élucider le mode d'action des antibiotiques. L'étude comparative des génomes par hybridation sur puce a été initialement utilisée pour déterminer les mutations contenues dans des souches résistantes aux antibiotiques (10, 77). De nos jours, la caractérisation génomique repose principalement sur des techniques de nouvelles générations (454 Life Sciences, Illumina, ABI-SOLiD) qui ont révolutionné le séquençage de génome entier (55, 73-75, 77, 108, 114).

6.1.1 Séquençage à haut débit (NGS)

Les techniques de séquençage de nouvelles générations, aussi appelées séquençage à haut débit, ont révolutionné l'étude de la résistance aux antibiotiques en permettant de séquencer des génomes entiers plus rapidement et à un coût moindre. Ces techniques de séquençage en parallèle regroupent plusieurs technologies dont Ion Torrent de Life Technologies, le pyroséquençage 454 de Roche, la plateforme Illumina, le système SOLiD de Applied BioSystems et le système de séquençage PacBio de Pacific Biosystems. Le pyroséquençage 454 et le séquençage Illumina qui ont été utilisés dans cette thèse seront abordés dans cette section.

6.1.1.1 Le séquençage 454 (Roche)

La technologie GS-FLX de Roche permet d'obtenir une couverture détaillée des génomes séquencés en plus d'une observation complète des variations génétiques en utilisant des lectures (« reads ») longues (jusqu'à 1Kb pour le GS-FLX +) et de haute qualité (221). Ceci permet de faire l'assemblage *de novo* de nouveaux génomes et de reséquencer les génomes connus. Cette technologie de séquençage en parallèle permet de générer plus de vingt-cinq millions de bases à une exactitude d'au moins 99% (phred 20) en 4 heures (161). Le pyroséquençage 454 a déjà été utilisé pour séquencer des souches de *S. pneumoniae* résistantes à la LZD (77), au cefotaxime (73) et à la PG (74).

Le séquençage 454 comporte deux étapes principales, soit la préparation des échantillons par émulsion et le pyroséquençage (Figure 6.1) (229). En résumé, le génome entier est fragmenté mécaniquement et des adaptateurs (A et B) sont ligués aux extrémités franches des fragments. L'émulsion des billes de streptavidine, contenant un seul fragment d'ADN biotinylé, permet l'individualisation de chaque bille pour la polymérisation en chaîne du fragment d'ADN qu'elle contient. Chaque microgoutelette d'émulsion devient un microréacteur dans lequel l'unique fragment d'ADN fixé sur la bille va pouvoir être

amplifié. Après l'amplification, les billes sont déposées sur une plaque PTP (Pico Titer Plate) contenant 1 600 000 puits dont le diamètre ne permet la récupération que d'une seule bille par puits. C'est au sein de chacun de ces puits que va se réaliser la réaction de pyroséquençage. Les nucléotides (A, T, C, G) seront ajoutés de manière séquentielle, et ce, plusieurs fois de suite. Si le nucléotide ajouté correspond à celui permettant l'élongation du brin complémentaire, il y a libération de pyrophosphate inorganique. Celui-ci est alors utilisé par l'ATP sulphurylase pour produire de l'ATP. La luciférase utilise cet ATP pour produire de l'oxyluciférine dont la lumière sera captée par un capteur CCD (Charge-Coupled Device). La détermination de la séquence repose donc sur la mise en évidence d'une émission de lumière résultant de l'incorporation d'un ou plusieurs nucléotides lors de



Figure 6.1 : Principes de la technologie de séquençage 454. Adapté de (229).

6.1.1.2 Illumina (Solexa)

En 2006, la première plateforme permettant le séquençage de lectures courtes fut disponible pour l'analyse de génomes (117). Le "Illumina Genome Analyzer" est une plateforme à haut débit permettant l'analyse en parallèle de lectures courtes. La technologie de séquençage par synthèse de Solexa utilise une cellule de flux à huit canaux qui peut produire de plusieurs millions à plusieurs milliards de lectures, chacune d'une longueur entre 101 et 300 nucléotides selon le système utilisé (117). Brièvement, des fragments « tagmentés » d'ADN génomique contenant à leurs extrémités des séquences de reconnaissance complémentaires à celles retrouvées sur la cellule de flux sont hybridés à la cellule et amplifiés par la technique « d'amplification par pont » (Voir Figure 6.2 A) pour générer des groupes de fragments d'ADN identiques. Des nucléotides terminateurs marqués avec un fluorochrome sont utilisés pour le séquençage permettant la lecture d'une base à la fois par cycle (Voir Figure 6.2 B). À chaque cycle, les quatre nucléotides marqués sont ajoutés en même temps, permettant de diminuer le biais d'incorporation par compétition des nucléotides pour la base disponible. Après chaque cycle de séquençage, les nucléotides sont éliminés par lavage. À chaque cycle, la base intégrée est déterminée par acquisition d'images suite à l'excitation de la base avec un laser. Finalement, les fluorochromes et la partie 3' terminatrice de la base sont éliminés, permettant l'ajout de la prochaine base lors du prochain cycle.

Chez le pneumocoque, cette technologie est utilisée pour séquencer *de novo* le génome d'isolats de *S. pneumoniae* (47, 133), décrire le génome de souches résistantes aux antibiotiques (45, 73, 75, 242, 271) et pour étudier l'évolution de la résistance aux antibiotiques chez des clones de *S. pneumoniae* (52, 53).



Figure 6.2 : La technologie Illumina. (A) Génération des groupes de lectures sur la cellule de flux par amplification par pont (« bridge-amplification »). (B) Séquençage par synthèse par ajout de nucléotide terminateur. Adapté de (117).

6.2 Étude du transcriptome

Le transcriptome est défini comme l'ensemble des transcrits présents dans une cellule à un moment donné et dans une condition donnée. Deux technologies nous permettent aujourd'hui de déterminer l'état du transcriptome : les biopuces et le séquençage de l'ARN.

6.2.1 Biopuces

Les biopuces, ou puces à ADN, sont des collections de points microscopiques d'ADN monocaténaires (sondes) sur une surface solide qui permettent de mesurer simultanément l'expression d'un grand nombre de gènes. Le principe des biopuces repose sur la propriété que possède l'ADN dénaturé de reformer spontanément sa double hélice lorsqu'il est porté face à un brin complémentaire. Plusieurs dizaines de milliers de fragments d'ADN peuvent être fixés sur une puce, et chacun peut correspondre au brin complémentaire d'un ARNm d'un organisme interrogé.

Brièvement, les ARNm provenant des échantillons à comparer (ex. : souche résistante et souche sensible) sont extraits et des fluorochromes différents sont fixés aux bases de chacune des conditions (fluorochrome : Cyanine 3, Cyanine 5 ou Alexa) (Figure 6.3). Les ADNc marqués sont ensuite hybridés au brin monocaténaire d'ADN présent sur la puce. Une image est ensuite générée par excitation des fluorochromes par un laser et le niveau d'expression est directement proportionnel à la quantité d'ARNm hybridé à la séquence sur la puce (245). Dans ce type d'étude, la normalisation des résultats est essentielle. En effet, les résultats peuvent différer d'une puce à l'autre, entre autres, en raison du bruit de fond de la puce, et également selon l'endroit où la sonde a été déposée sur la puce. De plus, l'intensité des points des échantillons peut différer selon le fluorochrome utilisé (surtout dans des études à deux fluorochrome où le Cy3 et Cy5 sont utilisés, puisque la fluorescence du Cy3 est plus élevée que le Cy5); il est donc important de conduire l'expérience en inversant le fluorochrome associé à chaque échantillon (209, 245).

Chez le pneumocoque, cette technique a été utilisée afin de détecter la réponse au stress causée par la VA chez TIGR4 (94), les gènes responsables de la résistance aux macrolides, streptogramines et lincosamides chez vingt différentes espèces dont *S. pneumoniae* (42) et pour caractériser la réponse causée par l'efflux chez *S. pneumoniae* en réponse aux fluoroquinolones (163). Également, cette technique a été utilisée pour l'étude de l'expression des facteurs de virulence en fonction du stade de croissance (139).



Figure 6.3 : Principe des biopuces à deux fluorochromes. Tiré de (256).

6.2.2 Séquençage de l'ARN

L'arrivée du NGS a permis d'expansionner l'étude du transcriptome en permettant de surmonter plusieurs limitations de la technologie des puces à ADN (162, 230, 261). En effet, la technologie de biopuces est limitée quant au niveau de détection de l'expression (en raison du bruit de fond), à la saturation du signal et à la dimension/qualité des points d'ADN imprimés sur les puces. Également, le design des sondes de biopuces nécessite une connaissance de la séquence du génome de l'organisme ciblé. Ainsi, le séquençage de l'ARN (ARN-seq) permet de séquencer *de novo* et en parallèle, avec une bonne couverture des librairies, une petite quantité d'ADNc (187). De plus, l'ARN-seq permet de découvrir de nouveaux transcripts ou des transcripts modifiés (259). Le séquençage de l'ARN permet

aussi la caractérisation et la comparaison de l'expression de transcriptome avec ou sans génome de référence. Chez le pneumocoque, l'ARN-seq a été utilisé afin de découvrir les petits ARN non codants impliqués dans la virulence (160) et pour décrire les modifications du transcriptome survenant lors de l'adhésion du pneumocoque aux cellules D562 (cellules épithéliales du nasopharynx d'origine humaine) (137).

6.3 Étude de la résistance chez le pneumocoque par des techniques de protéomique

Chez le pneumocoque, comme chez d'autres organismes, il a été démontré que la corrélation entre les niveaux d'expression des protéines et de l'ARNm est imparfait (236). En effet, les analyses protéomiques et transcriptomiques de souches de pneumocoque résistantes à la PG a démontré que la quantité d'une protéine ne corrèle pas nécessairement avec l'abondance de son transcrit dans la cellule (236). Les études protéomiques représentent donc une approche complémentaire à la caractérisation du profil d'expression génique associé à la résistance. Chez *S. pneumoniae*, l'analyse du niveau d'expression des protéines par spectrométrie de masse demeure l'approche protéomique la plus utilisée dans l'étude des mécanismes de résistance aux antibiotiques. Cette technique a été utilisée avec succès pour décrire le protéome et l'intéractome du phage Cp-1 (102), du phage Dp-1 (225), le protéome membranaire de la membrane cytoplasmique de *S. pneumoniae* R6 (46) et afin de caractériser le protéome de souches résistantes à la LZD (76), aux macrolides (41) et à la PG(236).

6.4 Étude du métabolome chez S. pneumoniae

La métabolomique permet l'analyse intégrative et fonctionnelle du phénotype métabolique d'un système biologique. Au même titre que les autres données obtenues par les techniques « omiques », le métabolome est une partie essentielle de tout système biologique. L'analyse globale du métabolome utilise principalement des techniques de bioanalyses de chromatographie en phase liquide ou gazeuse (LC-MS ou GC-MS) couplées

avec des approches de spectrométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire, ce qui permet d'obtenir une idée globale de l'ensemble des métabolites (sucres, acides aminés, acides gras, etc.) présents dans une cellule, un organe ou un organisme à un moment précis.

Chez le pneumocoque, l'utilisation de la métabolomique est pour le moment présentie comme outil diagnostic pour la détection du pneumocoque dans les liquides biologiques chez les hôtes infectés (110, 145, 159, 231, 232) et également pour la découverte de nouvelles cibles vaccinales (226). Cette méthode relativement récente n'a pas été utilisée, pour le moment, pour caractériser la résistance aux antibiotiques chez *S. pneumoniae*. Cependant, elle a été utilisée avec succès chez *S. aureus*, afin de décrire le profil métabolique de souches sensibles et résistantes à la méthicilline (12) et chez des souches de *M. tuberculosis* résistantes à la rifampicine (30), ce qui suggère que cette approche pourrait être utilisée afin de caractériser les composantes du métabolome associées à la résistance aux antibiotiques chez *S. pneumoniae*.
Chapitre VII: Problématique, hypothèses et objectifs

7.1 Problématique

La bactérie *S. pneumoniae* est l'un des plus importants agents étiologiques de pneumonies acquises en communauté, de méningites, de bactériémies et d'otites et est responsable d'un haut taux de mortalité et de morbidité (264). Chez le pneumocoque, l'émergence de souches cliniques résistantes et multi-résistantes est devenue problématique. Ces souches peuvent présenter une résistance à la PG de même qu'au céfotaxime, aux fluoroquinolones, à la TC, au thriméthoprime/sulfamethaxone, aux macrolides, au CM et à la ceftriaxone (95, 136, 216) . L'étude des mécanismes de résistance devient alors un moyen de détecter les isolats résistants et de contrecarrer l'émergence de la résistance aux antibiotiques par le développement de nouvelles molécules échappant aux mécanismes connus.

7.2 Hypothèses

L'apparition de mutations peut donner un avantage sélectif à une bactérie, la rendant capable de résister plus aisément à un stress (195). Cette adaptation peut être critique lors d'un traitement antimicrobien, car il peut amener à l'inefficacité d'un traitement dirigé contre une bactérie pathogène. À ce jour, les mécanismes de résistance à la CIP rapportés chez le pneumocoque se limitent à l'acquisition de mutations dans les topoisomérases de type II, ainsi que l'efflux (86, 124, 191). Dans le cas de la TC, l'acquisition des gènes *tetM* et *tetO* sont les principaux mécanismes responsables de la résistance clinique (79). Cependant, d'autres mécanismes intervenant dans la résistance aux fluoroquinolones et à la TC ont été décrits chez d'autres espèces, laissant présager que des mécanismes de résistance additionnels peuvent également intervenir dans le cas du pneumocoque (58, 115, 116, 167, 170, 205, 223, 251, 257, 270). La résistance à la TGC n'a pas encore été observée

chez le pneumocoque en raison de son usage restreint. Cependant, la résistance à cette molécule a déjà été observée chez différentes bactéries à Gram négatif et à Gram positif (19, 85, 131). Déterminer les mécanismes de résistance à la TGC chez le pneumocoque avant son apparition en clinique par la caractérisation de souches résistantes générées en laboratoire nous permettrait de connaître la dynamique de résistance à cet antibiotique chez le pneumocoque et d'aider à générer des outils pour faciliter la détection de la résistance à la TGC chez *S. pneumoniae*.

7.3 Objectifs

L'objectif général des projets présentés dans cette thèse consiste en la caractérisation génomique et phénotypique des mécanismes de résistance à la CIP, la TC et la TGC chez *S. pneumoniae*.

L'objectif principal du chapitre VIII est la caractérisation fonctionnelle des mécanismes de résistance à la CIP à l'échelle génomique chez des mutants *S. pneumoniae* sélectionnés en laboratoire et chez des souches cliniques non sensibles à la CIP. Nous avons voulu plus spécifiquement (1) évaluer le rôle des mutations dans la résistance par reconstruction génotypique, et (2) caractériser les nouveaux mécanismes impliqués dans la résistance à la CIP chez les mutants.

L'objectif principal du chapitre IX porte sur la caractérisation fonctionnelle des mécanismes de résistance à la TC à l'échelle génomique chez des mutants *S. pneumoniae* sélectionnés en laboratoire par (1) l'identification et la validation des mutations associées à la résistance à la TC chez les mutants, et (2) l'étude du profil d'expression génique associé à la résistance à la TC.

L'objectif du chapitre X est d'effectuer la caractérisation fonctionnelle des mécanismes de résistance à la TGC à l'échelle génomique chez des mutants *S. pneumoniae*

sélectionnés en laboratoire en déterminant le rôle des mutations associées à la résistance à la TGC par reconstruction génotypique.

Chapitre VIII: Caractérisation génomique de la résistance à la ciprofloxacine chez un mutant dérivé d'une souche de laboratoire et d'une souche clinique de *Streptococcus pneumoniae*

Ce chapitre contient un article qui a été publié dans la revue *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013 Oct;57(10):4911-9.

8.1 Résumé

La ciprofloxacine, une fluoroquinolone à large spectre, est un antibiotique bactéricide ayant pour cible l'ADN topoisomérase IV et l'ADN gyrase. La résistance à la ciprofloxacine chez le pneumocoque est principalement causée par l'acquisition de mutations dans les régions dites QRDRs (« quinolone resistance-determining region ») de ParC et GyrA. Également, un faible niveau de résistance a été attribué à l'efflux de la drogue. Afin d'étudier la résistance à la ciprofloxacine à l'échelle génomique et possiblement découvrir de nouvelles mutations impliquées dans la résistance, nous avons effectué le séquençage du génome entier d'une souche de S. pneumoniae sélectionnée in vitro pour la résistance à la ciprofloxacine (128 µg/ml) et d'une souche clinique ayant un faible niveau de résistance (2 μ g/ml). L'inactivation génique et la transformation de fragments PCR contenant les mutations détectées chez le mutant in vitro ont révélé que la résistance est principalement causée par des mutations dans les régions QRDRs de parC et gyrA, ainsi que par la surexpression du transporteur ABC PatA/PatB. Aucune mutation QRDR ne fut identifiée dans le génome de la souche clinique de S. pneumoniae ayant un faible niveau de résistance à la ciprofloxacine. Des essais de sensibilité à la ciprofloxacine effectués en présence d'un inhibiteur d'efflux, la réserpine, suggèrent que la résistance chez cette souche est médiée par l'efflux. Il est intéressant de noter que le séquençage de la souche clinique a également permis de révéler des mutations dans les régions codantes de

patA et *patB* qui ont été impliquées dans la résistance. De plus, une mutation dans une glycérol-3-phosphate déshydrogénase dépendante du NAD(P)H identifiée chez la souche clinique serait impliquée dans la protection contre les dérivés réactifs de l'oxygène induits par la ciprofloxacine.

8.2 Article

Genomic characterisation of ciprofloxacin resistance in a laboratory derived mutant and clinical isolate of *S. pneumoniae*.

Andréanne Lupien¹, Dewan S. Billal¹, Fereshteh Fani¹, Hafid Soualhine¹, George G. Zhanel², Philippe Leprohon¹ and Marc Ouellette^{1#}

 ¹ Centre de recherche en Infectiologie du Centre de recherche du CHUL and Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada.
 ² Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, University of Manitoba, Winnipeg, MB, Canada.

Corresponding author: Marc Ouellette Ph.D. Centre de Recherche en Infectiologie 2705 Boul. Laurier Québec, QC Canada G1V 4G2 Tel : 1-418-654-2705 Fax : 1-418-654-2715 E-mail : <u>Marc.Ouellette@crchul.ulaval.ca</u>

¶Present address: Department of Biological Science at University of Calgary (DSB); Laboratoire de Santé Publique du Québec (HS).

Running title: Ciprofloxacin resistance in Streptococcus pneumoniae

Abstract

The second-generation fluoroquinolone ciprofloxacin is a bactericidal antibiotic targeting DNA topoisomerase IV and DNA gyrase encoded by the *parC* and *gyrA* genes. Resistance to ciprofloxacin in Streptococcus pneumoniae mainly occurs through the acquisition of mutations in the quinolone-resistance-determining-region (QRDR) of the ParC and GyrA targets. A role in low-level ciprofloxacin resistance has also been attributed to efflux systems. To look into ciprofloxacin resistance at a genome wide scale and to discover additional mutations implicated in resistance, we performed whole genome sequencing of a S. pneumoniae isolate selected for resistance to ciprofloxacin in vitro (128 μ g/mL) and of a clinical isolate displaying low-level ciprofloxacin resistance (2 μ g/mL). Gene disruption and DNA transformation experiments with PCR fragments harboring the mutations identified in the *in vitro S. pneumoniae* mutant revealed that resistance is mainly due to QRDR mutations in *parC* and *gyrA* and by the overexpression of the ABC transporters PatA and PatB. In contrast, no QRDR mutations were identified in the genome of the S. pneumoniae clinical isolate with low level resistance to ciprofloxacin. Assays performed in the presence of the efflux pump inhibitor reserpine suggested that resistance is likely mediated by efflux. Interestingly, the genome sequence of this clinical isolate also revealed mutations in the coding region of *patA* and *patB* that we implicated in resistance. Finally, a mutation in the NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase identified in the S. pneumoniae clinical strain was shown to protect against ciprofloxacinmediated reactive oxygen species.

Introduction

Streptococcus pneumoniae is a major Gram-positive pathogen responsible for pneumonia, bacteremia, otitis media and meningitis leading to considerable morbidity and mortality among children and elderly (1). Penicillin, a β -lactam antibiotic, has long been the mainstay against pneumococcal infections (2, 3) but the worldwide spread of antibiotic-resistant clones over the past decades has impaired its usefulness for dealing with *S. pneumoniae* infections (4-6). The rates of resistance against β -lactams and macrolides amongst *S. pneumoniae* isolates have translated into an increased usage of fluoroquinolone antibiotics in the treatment of respiratory diseases (7-10).

Fluoroquinolones are part of a class of synthetic broad spectrum antibiotics that inhibit DNA synthesis in bacteria by targeting DNA gyrase (GyrA and B subunits) and topoisomerase IV (ParC and E subunits), two enzymes that are vital for DNA supercoiling and chromosome segregation, respectively (11, 12). Although the worldwide prevalence of fluoroquinolone-resistant S. pneumoniae remains low in relation to β -lactam resistance (\leq 1%) (13-15), the dissemination of successful resistant clones has nonetheless increased the prevalence in some countries (16, 17). Resistance to fluoroquinolones in S. pneumoniae arises in a stepwise fashion and results from alterations in the target binding site due to the acquisition of spontaneous mutations in the quinolone resistance determinant regions (QRDR) of topoisomerase IV and DNA gyrase (18, 19). Although mutations usually occur in the QRDRs of parC and gyrA (20, 21), a role for mutations in the parE and gyrB subunits in low-level resistance has been reported (22-24). S. pneumoniae isolates with a mutation only in ParC usually remain susceptible or display only a modest increase in resistance (19, 24) but these first-step mutants are associated with an increased risk for secondary mutations that may enhance resistance (18, 19, 24-27). Higher levels of fluoroquinolone resistance require mutations in both parC and gyrA (18, 19, 24).

Resistance to fluoroquinolones can also occur through the overexpression of efflux systems, a phenotype frequently observed among resistant clinical pneumococci (28-30).

While active efflux only accounts for a moderate increase in resistance (31), efflux positive strains exhibit an increased likelihood of acquiring QRDR mutations and the combination of efflux and first step mutations can lead to minimum inhibitory concentrations (MIC) associated with treatment failure (32). To date, two efflux systems were found to confer resistance to fluoroquinolones in *S. pneumoniae*. The major facilitator PmrA was the first efflux system described during *in vitro* work on norfloxacin resistance in *S. pneumoniae* (33) but subsequent studies challenged the clinical significance of this transporter (34, 35). The second efflux system was revealed while characterizing thirteen putative efflux systems of the ATP-binding cassette (ABC) superfamily in *S. pneumoniae* TIGR4 (36). The ABC transporters SP2075 (PatA) and SP2073 (PatB) were shown to act as heterodimers (37) to enable resistance to several antimicrobial agents including ethidium bromide (EtBr), dyes and fluoroquinolones, and the overexpression of their genes is associated with fluoroquinolone resistance in *S. pneumoniae* clinical isolates (30).

Studying resistance at the genome scale can reveal additional insights into mechanisms having more subtle roles like in facilitating resistance (38, 39) or in compensating for fitness cost (40). Here, we characterized by genome sequencing one laboratory-derived *S. pneumoniae* mutant and a derived transformant highly resistant to ciprofloxacin (CIP). We also characterised a low-level CIP-resistant transformant obtained by whole genome DNA transformation of a clinical isolate into a susceptible strain in order gain insights into mechanisms leading to a decreased CIP susceptibility in the absence of QRDR mutations. We report the functional analysis of QRDR mutations in CIP resistance, in addition to provide new knowledge about the role in resistance for mutations in the coding regions of *patA* and *patB* and for a mutation preventing the generation of ciprofloxacin-induced oxidants.

Materials and Methods

Bacterial strains and growth conditions

Strains used in this study are listed in Supplementary Table 1. Pneumococci were grown in brain heart infusion broth (BHI; Difco), or in blood agar containing 5% defibrinated sheep's blood. Cultures were incubated for 16-24 hours in 5% CO₂ atmosphere at 35°C. All strains were maintained frozen at -80°C in BHI containing 15% glycerol. The mutant R6M2B was generated from *S. pneumoniae* R6 by a stepwise fashion on plates containing increasing concentration of CIP as described previously (39). Eight selection cycles were required to obtain R6M2B. The transformants of R6M2B (T1- to T5-R6M2B) were generated by transforming genomic DNA (gDNA) derived from R6M2B into *S. pneumoniae* R6 recipients in presence of CIP. This gDNA transformation scheme was done four times in presence of increasing concentration of CIP to obtain the final transformant T5-R6M2B. The clinical isolate 60827 was isolated from a respiratory sample collected from a 66 years old female at Mount Sinai Hospital in Toronto, Canada. The T1-60827 transformant was produced by a single round of gDNA transformation in *S. pneumoniae* R6 WT.

MIC determination

MICs to CIP (Sigma-Aldrich), ethidium bromide (EtBr; Fluka) and the efflux inhibitor reserpine (Sigma-Aldrich) were determined by microdilution according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). All compounds listed were prepared according to the manufacturer's instructions. The MICs for CIP and EtBr were also measured in the presence of a range of reserpine concentrations (0-20 μ g/mL). The MICs were recorded as the lowest dilution showing no growth. All MIC measurements were done at least in triplicates.

RNA extraction and Quantitative real-time RT-PCR

Total RNA was isolated from mid-log cells grown in BHI using the Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. The RNAs were treated with DNase I (Ambion) to avoid any DNA contamination. The quality and integrity of the RNAs was assessed using a 2100 BioAnalyzer and RNA6000 Nano chips (Agilent). The cDNAs were generated from total RNAs using the Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) and random hexamers according to the manufacturer's instruction. Real-time quantitative RT-PCR assays were carried out in a BioRad Cycler using SYBR Green I (Molecular Probes). A final volume of 20 µl was used for each reaction containing specific primers (Supplementary Table 2) and iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). All qRT-PCR data were normalized according to the amplification signals of the 16S rRNA.

Gene inactivation

The genes *patA*, *patB* and spr0043 (coding for the ABC protein ComA) were inactivated by insertional duplication mutagenesis using the non-replicative plasmids pFF3 or pFF6. The pFF3 vector is a derivative from pGEM-T-Easy plasmid (Promega) from which an Eam1105I restriction site was cloned in the multicloning site and the ampicillin resistance marker was replaced by the chloramphenicol resistance marker of the pEVP3 vector (41). The pFF6 plasmid is a derivative of pFF3 in which the chloramphenicol resistance marker was replaced by the kanamycin marker of the pDL289 plasmid (42). Fragments internal to the *patA*, *patB* and spr0043 genes were amplified from the gDNA of *S. pneumoniae* R6 and 60827 using the primers *patA*F-KO, *patA*R-KO, *patB*F-KO, *patB*R-KO, spr0043F-KO and spr0043R-KO, respectively (Supplementary Table 2), prior to be cloned into the Eam1105I site restriction site of pFF6 or pFF3. Transformants were selected on casein tryptone medium (CAT) agar plates supplemented with 5% defibrinated sheep's and either 500µg/mL kanamycin (pFF6) or 5µg/mL chloramphenicol (pFF3).

DNA transformation

Genetic transformation was performed as previously described (38, 40). When needed, a $rpsL^+$ fragment conferring resistance to streptomycin (Lys57Thr) was co-transformed as a surrogate selection marker along with the DNA fragment of interest (38).

Whole-genome sequencing (WGS)

Genomic DNA was prepared from mid-log phase cultures of *S. pneumoniae* using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. The genomes of R6M2B, T5-R6M2B and T1-60827 were sequenced using a 454 Life Sciences GS-FLX system (Roche). Genome sequencing, assemblies and comparative analyses were performed at the McGill University Genome Québec Innovation Center (http://gqinnovationcenter.com/index.aspx). R6M2B, T5-R6M2B and T1-60827 generated aggregated genome size of 2016866bps, 2016652bps and 2011560bps, respectively at a mean 20X coverage. Whenever possible, the order and orientation of assembled contigs were done in accordance with the genome assembly of *S. pneumoniae* R6 (accession number NC_003098). Mutations deduced from massively parallel sequencing were confirmed by PCR amplification and conventional DNA sequencing using the primers listed in Supplementary Table 2. The sequencing data has been deposited at the EBI SRA database (http://www.ebi.ac.uk/) under the study accession number ERP002062, samples accessions ERS199507, ERS199508, ERS199509 corresponding to *S. pneumoniae* R6M2B, T5-R6M2B and T1-60827, respectively.

Reactive oxygen species (ROS) accumulation

The intracellular accumulation of ROS was measured using dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA; Invitrogen) as described (38). CIP was added to exponential growth phase bacteria (OD₆₀₀ 0.12) according to the MIC of the tested *S. pneumoniae* strains. ROS accumulation was thus tested in presence of 32 μ g/mL CIP for strain R6^{parC,gyrA-R6M2B} and

R6^{parC,gyrA,spr1902-T5R6M2B, smR} and 128 µg/mL CIP for strain T5-R6M2B and T5-R6M2B^{spr0335R6, smR}. One milliliter aliquots were collected at baseline and up to 3 hour after exposure to CIP, a time point at which ROS were previously shown to be induced by CIP in *S. pneumoniae* R6 (38). Aliquots were washed once with 500 µL of PBS 1X and incubated in the presence of 5 µg/mL DCF-DA in the dark for 30 minutes. The cells were washed once with 1X PBS and a 200 µl aliquot was analysed using a Victor fluorometer (485 nm/535 nm) in 96 wells Nunc-ImmunoTM Plates (Thermo scientific). The fluorescence signals were normalized according to the bacterial count obtained by plating on trypticase soy agar supplemented with 5% sheep blood (BD).

Results

Selection of S. pneumoniae mutants and DNA transformants resistant to ciprofloxacin

To investigate CIP resistance at the genome scale, we produced a highly resistant mutant derived from S. pneumoniae R6 (CIP MIC 0.5 µg/mL) by stepwise CIP increments. The resulting S. pneumoniae mutant R6M2B had a final CIP MIC of 128 µg/mL and displayed cross-resistance to the third-generation fluoroquinolone levofloxacin (MIC=32µg/mL). We also studied the basis of CIP resistance in a serotype 11A S. pneumoniae clinical isolate named 60827 that displayed a CIP MIC characteristic of single-step CIP-resistant mutants (2 µg/mL). S. pneumoniae 60827 remained susceptible to levofloxacin (MIC=1 μ g/mL). No cross resistance to other antibiotics was observed in any of the strains (erythromycin, tetracycline, tigecycline, chloramphenicol, vancomycin, penicillin, clindamycin and amikacin tested). Owing to the extensive polymorphism occurring between S. pneumoniae clinical isolates (43), we reconstructed the resistance phenotype of both the *in vitro* mutant and the clinical isolate by transforming their genomic DNAs (gDNA) into the well-characterized S. pneumoniae R6 WT genetic background and selected transformants under CIP pressure. A total of five rounds and a single round of transformation were required to fully reconstruct the CIP resistance levels of R6M2B and 60827, the resulting T5-R6M2B and T1-60827 transformants having a CIP MIC of 128 μ g/mL and 2 μ g/mL, respectively (Table 1).

Genome sequence of S. pneumoniae ciprofloxacin-resistant strains

The genome sequence of R6M2B revealed only four mutations that were either within the QRDRs of *parC* (S79F) and *gyrA* (E85K) or within intergenic regions upstream of spr0129 and downstream of spr0952 (Table 2). Of these, the only mutations that transferred to T5-R6M2B were those within the QRDRs of *parC* and *gyrA*. Their contribution to CIP resistance was further assessed by transforming *S. pneumoniae* R6 WT

recipients with PCR products amplified from R6M2B. As CIP usually selects for mutations within parC prior to those in gyrA (24-26), parC was first amplified from gDNA derived from R6M2B using the primers listed in Supplementary Table 2 and the PCR products transformed into S. pneumoniae R6 WT. The selection of transformants using a CIP concentration of 1 µg/mL enabled recovering the transformant R6^{parC-R6M2B} which had a four-fold increase in CIP resistance (2 µg/mL) compared to S. pneumoniae R6 WT (Table 3). PCR-sequencing of *parC* confirmed that the mutation found in the mutant was transferred and selected during transformation. A second round of transformation using R6^{parC-R6M2B} as recipients and PCR products covering the mutated gyrA of R6M2B further increased CIP resistance to a MIC of 32µg/ml (Table 3). In contrast, no role in resistance could be attributed to the A to G transition observed three nucleotides upstream of spr0129 in R6M2B as its reversion to a wild type sequence had no effect on the CIP MIC of the mutant (Table 3). This was done by transforming a PCR fragment derived from the upstream region of spr0129 of S. pneumoniae R6 WT along with a PCR fragment covering the $rpsL^+$ allele of S. pneumoniae CP1296 conferring resistance to streptomycin that was used as a surrogate resistance marker (see Materials and Methods). The $rpsL^+$ PCR fragment had no impact on CIP susceptibility levels when transformed alone (Table 3). The lack of phenotype in CIP resistance for the mutation upstream of spr0129 is consistent with the fact that this SNP was not transferred into T5-R6M2B and since the 12 nucleotides deletion downstream of spr0952 in R6M2B was not transferred either (Table 2), its role in resistance was not further studied.

Despite our efforts to prevent the selection of *de novo* mutations while selecting for the T1- to T5-R6M2B transformants (see Materials and Methods), the genome sequence of T5-R6M2B revealed three additional mutations not found in the genome of its R6M2B parent mutant (Table 2). These occurred upstream of spr1544 and within the coding regions of the 6-phosphogluconate dehydrogenase spr0335 and the NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase spr1902 (Table 2). Albeit they were an artefact of transformation, we were still interested in assessing the role of these mutations in resistance to ciprofloxacin, especially due to the fact that we observed an identical T83I mutation in spr1902 of the T1-60827 transformant derived from clinical isolate 60827 (Table 2 and see below). Interestingly, co-transformation ($rpsL^+$) of the spr1902 T83I substitution conferred a two-fold increase in CIP resistance when transformed in the presence of both *parC* and *gyrA* mutations, but not when expressed in a WT background or only in the presence of an altered *parC* (Table 3). Similarly, the reversion of the spr0335 mutation to a wild type allele in *S. pneumoniae* R6M2B (using a co-transformation with the $rpsL^+$ PCR fragment) decreased the CIP MIC of the mutant by two-fold, from 128 µg/ml to 64 µg/ml (Table 3). It should be noted that it proved impossible to transform the spr0335 mutation directly into *S. pneumoniae* R6 WT or R6^{parC,gyrA-R6M2B} backgrounds. No role in resistance could be observed for the mutation upstream of spr1544 when transformed alone (data not shown) or in the presence of QRDR mutations (Table 3).

The genome sequence of T1-60827 revealed several single nucleotide polymorphisms (SNPs) compared to the *S. pneumoniae* R6 WT reference. We found a total of 7 stretches of SNPs that clustered in neighbor genes and that we named multi-gene recombination sequence segments (RSSs) (Table 2 and Fig. S1). Multi-genes RSS were comprised of 2 to 4 genes. An additional eight RSSs were also transferred from strain 60827 but these were restricted to single genes (Table 2 and Fig. S1). None of the RSSs covered the QRDRs of *parC* or *gyrA* (Tables 1 and 2), which is consistent with the low level of resistance of strain 60827 and with the absence of cross-resistance to levofloxacin (data not shown). Targeted sequencing of *parC* and *gyrA* in the 60827 clinical isolates also revealed the absence of mutations (data not shown).

ABC transporters and ciprofloxacin resistance

While the T5-R6M2B transformant is similarly resistant to CIP as its parent R6M2B mutant, the introduction of the mutations found in the latter by transformation of PCR fragments failed to fully reconstruct resistance. Resistance to the fluoroquinolones CIP and norfloxacin (but not to newer fluoroquinolones) is often associated with a reserpine-sensitive efflux mediated by the ABC proteins PatA and PatB (30, 36, 44) whose expression is frequently increased in strains showing a reserpine-sensitive phenotype in

fluoroquinolone resistance (30). The CIP MIC of the S. pneumoniae R6M2B and 60827 mutants and of their transformants was thus measured in the presence and absence of the efflux pump inhibitor reserpine to assess the role of efflux in resistance. The resistance of R6M2B and T5-R6M2B was partly reverted in the presence of reserpine (Tables 4 and S3) to a level attributable to the mutations in QRDRs (32 µg/mL) (Table 3). The inactivation of either *patA* or *patB* mirrored the phenotype conferred by reserpine (Table 4) and confirmed that these were fully responsible for the reserpine-sensitive CIP resistance of R6M2B and T5-R6M2B. In R6M2B a massive overexpression of *patA* was confirmed by quantitative RT-PCR (Table 4), a phenotype specifically transferred to its last-level transformant (Table 1). This was also true for a panel of clinical isolates with varying levels of susceptibility to ciprofloxacin for which the expression level of *patA* correlated with resitance (Table S4). The high expression of *patA* in R6M2B and T5-R6M2B could not be correlated with a point mutation in the promoter region of *patA/patB* locus (Table 2). Overexpression was a prerequisite for *patA* to confer resistance since neither reserpine nor gene inactivation impacted on the CIP susceptibility of S. pneumoniae R6 WT (Table 4). Reserpine also altered the susceptibility levels to EtBr of S. pneumoniae R6 WT, R6M2B and T5-R6M2B, a phenotype that could be attributed only in part to PatA and PatB (Table 4). The gene spr0043 codes for the ATP-binding protein ComA, an ABC transporter unrelated to resistance, and was used as a negative control for ABC gene inactivation (Table 4).

Consistent with previous reports about the role of efflux in low-level CIP resistance in the absence of QRDR mutations, the resistance of T1-60827 and of its parent mutant was almost exclusively the result of reserpine-sensitive efflux (Tables 4 and S3). The expression of *patA* was only slightly increased in the 60827 mutant and its T1-60827 transformant compared to a *S. pneumoniae* R6 reference (Table 4). The role of *patA/patB* in resistance was less clear with only the inactivation of *patB* having a minor effect on the level of CIP resistance in T1-60827 (Table 4). This lack of a clear phenotype might be explainable by the fact that overexpression of *patA* seems primordial for resistance (see above) and by the probable presence of another reserpine-sensitive efflux system (Table 4). Notwithstanding, the genome sequence of T1-60827 revealed that multi-gene RRS10 transferred from isolate 60827 conveyed non-synonymous mutations in the coding regions of *patA* (spr1887) and *patB* (spr1885) in addition to an A to C transversion 33 nucleotides upstream of *patA* (Tables 1 and 2). To assess the role of these mutations in CIP resistance, PCR fragments of *patA* and *patB* derived from T1-60827 were co-transformed in *S. pneumoniae* R6 WT along with an *rpsL*⁺ fragment for the selection of recombinant clones. The resulting *S. pneumoniae* transformants R6^{patA,T1-60827, smR} and R6^{patB,T1-60827, smR} displayed a two-fold increase in CIP MIC compared to *S. pneumoniae* R6 WT and confirmed the role for the *patA* and *patB* mutations in resistance (Table 3). While mutations in the promoter region of *patA* and *patB* were previously shown to be responsible for their increased expression in linezolid-resistant *S. pneumoniae* (40), we could not attribute a phenotype to the mutation upstream of the *patA* loci in T1-60827 by targeted transformation.

Ciprofloxacin resistance and protection against reactive oxygen species

As previously mentioned, we were intrigued that a mutation identical to the one found at position 248 of spr1902 in T5-R6M2B was also acquired by T1-60827 (Table 1) as part of RSS11 (Table 2). The same mutation could also be found in the parent clinical isolate 60827 (data not shown). The spr1902 gene product correspond to a glycerol 3phosphate dehydrogenase which participates in the maintenance of the intracellular redox potential by reducing NADP⁺ to NADPH while catalyzing the conversion of sn-glycerol 3phosphate to glycerone phosphate (45). Given that the mode of action of bactericidal antibiotics such as CIP was proposed to involve the production of reactive oxygen species (ROS) (46), we hypothesized that the basis for the selection of the mutation in spr1902 in both T5-R6M2B and strain 60827 involved protection against reactive oxygen species, hence contributing to resistance. The accumulation of ROS upon exposure to CIP according to the status of spr1902 was analysed in a S. pneumoniae background of altered parC and gyrA (R6^{parC,gyrA-R6M2B} and R6^{parC,gyrA,spr1902-T5R6M2B, smR}) using DCF-DA, a dye whose fluorescence intensity is indicative of the intracellular ROS levels. S. pneumoniae R6^{parC,gyrA-R6M2B} cells subjected to 32 µg/mL of CIP (the MIC of R6^{parC,gyrA-R6M2B}) demonstrated a time-dependent increase in DCF-DA fluorescence signals (Fig. 1), confirming an increase in ROS production upon exposure to inhibitory CIP concentrations. In contrast, the same treatment failed to induce the accumulation of oxidants in the S.

pneumoniae R6^{parC,gyrA,spr1902-T5R6M2B, smR} transformant harboring the T83I substitution of T5-R6M2B or T1-60827 in spr1902 (Fig. 1). While NADPH is also produced by the 6-phosphogluconate dehydrogenase spr0335, an enzyme catalyzing the decarboxylation of 6-phosphogluconate into ribulose 5-phosphate in the presence of NADP during the third step of the pentose phosphate pathway, the role in resistance for the mutation identified in T5-R6M2B (Table 3) could not be linked to ROS protection (data not shown).

Discussion

Fluoroquinolone antibiotics act by interfering with DNA topoisomerase and DNA gyrase which ultimately lead to inhibition of DNA replication and to bacterial death (11, 12). Prior work on S. pneumoniae laboratory-derived CIP-resistant mutants and unsusceptible clinical isolates has underlined the major role that QRDR mutations have in resistance in addition to highlight efflux proteins as contributors to resistance (21, 28). Genetic analyses into the basis of resistance found that conventional QRDR mutations usually target positions 79 and 83 of ParC and positions 81 and 85 of GyrA (47-49). Nonetheless, resistance appears to be heterogeneous since mutations at other QRDR sites also decreased susceptibility to fluoroquinolones (22, 50). The effect of specific mutations on the level of resistance depends on the fluoroquinolone molecule however, and the combination of amino acid changes within the four QRDR genes probably has more impact than the number of mutations (22). Here, the genome sequences of T5-R6M2B and of its parent mutant revealed mutations in QRDRs of both parC and gyrA. The Ser79Phe substitution in ParC was transferred early into the S. pneumoniae R6 WT recipients, at the first step of transformation, while the Glu85Lys change in GyrA occurred during the second round of transformation (Table 1). This is consistent with mutations in *parC* usually preceding those in gyrA during the selection for CIP resistance (25). Through targeted transformation of mutated PCR fragments, a role in CIP resistance was further confirmed for both mutations, the ParC Ser79Phe conferring low-level resistance (CIP MIC 2 µg/mL) while the GyrA Glu85Lys led to higher resistance levels in the presence of an altered ParC (CIP MIC 32 µg/mL). This is in agreement with previous work having shown that mutations in both genes were necessary for higher levels of fluoroquinolone resistance (18, 19, 24). Mutations affecting the Glu85 of GyrA have previously been observed in S. pneumoniae isolates unsusceptible to CIP and levofloxacin from the United States and Canada (22, 29, 48, 49, 51) and to be associated with a decreased susceptibility to fluoroquinolones in the presence of other QRDR mutations (52).

CIP resistance in the S. pneumoniae R6M2B mutant and in the clinical isolate 60827 was reversible by reserpine, suggesting that efflux may be implicated. The gene coding for the ABC transporters PatA is overexpressed in R6M2B and its transformant (Table 4). No mutations in the promoter region of *patA/patB* could explain this overexpression and the mechanism of overexpression remains unknown. Whatever the mechanism, it is intriguing that it is transferable by transformation and work is now ongoing to look into this. It is salient to point out that this phenomenon is likely to have clinical implications given that a similar lack of mutations upstream of *patA* or its *patB* partner was reported for S. pneumoniae clinical isolates resistant to fluoroquinolones with overexpression of *patA* and *patB* (30). Inactivation of *patA* and *patB* in R6M2B fully accounted for the reserpine-reversible CIP resistance. The inactivation of *patA* and *patB* also confirmed their role in resistance to EtBr, although this time an additional reserpinesensitive efflux pump is also likely to intervene since the sensitization to EtBr conferred by reserptine was higher than that observed in the absence of functional *patA* or *patB*. The T1-60827 transformant acquired a multi-gene RSS derived from clinical isolate 60827 that conveyed non-synonymous mutations to the *patA* and *patB* loci and a twofold increase in resistance to CIP was conferred by these mutations when transformed into a WT background (Table 3). While increased expression of patA/B has been shown to lead to resistance, this is the first example that point mutations can also lead to CIP resistance. The inactivation of *patA* and *patB* had only a minor effect on the level of CIP resistance in strain 60827 however, and susceptibilities assays in the presence of reserpine revealed that another efflux system may also be implicated in resistance (Table 4). This efflux system was probably transferred from the clinical isolate 60827 to the transformants during the DNA transformation process which suggested that it may be encoded by one of the 15 RSSs present in T1-60827. While clearly enhancing resistance to CIP, it is possible that the contribution of the mutations in the coding regions of *patA* and *patB* is masked in the clinical isolate by the presence of this additional reserpine-efflux system. The single mutation in PatA (R112L) is predicted to be located in the first cytoplasmic loop located between transmembrane helixes 2 and 3. The crystal structure of the homologous Sav1866 ABC protein purified from *Staphylococcus aureus* indicated that the first intracellular loop is important for the activity of the protein by participating in conformational changes upon ATP binding and hydrolysis that are transmitted from the nucleotide-binding to the transmembrane domains through non-covalent interactions at the shared interface (53). For PatB, the S48A substitution is predicted to occur in the first transmembrane helix while the A503T change is located in the C-terminal hydrophilic domain of the protein. Unfortunately, the lack of crystal structures for PatA and PatB precludes hypothesizing about the precise role of the PatA and PatB mutations in resistance.

Bactericidal antibiotics, regardless of their primary targets, are thought to kill bacteria by inducing alterations in iron homeostasis which ultimately lead to the accumulation of hydroxyl radicals through the Fenton reaction (46). In that context, nonenzymatic antioxidant molecules such as NADPH can help maintaining a reduced intracellular environment by scavenging ROS (54). Two of the enzyme mutated in our mutants or transformants (spr0335 and spr1902) are responsible for the reduction of NADP⁺ and should affect the pool of intracellular NADPH (45). Although the effect of the mutation on the activity of the protein remains unclear, ROS accumulation assay indicated that the T83I substitution in the glycerol-3-phosphate dehydrogenase spr1902 prevents the accumulation of ROS after exposure to CIP. Similarly to a previously described mutation in a putative iron importer that protected penicillin-resistant S. pneumoniae against the antibiotic-induced production of ROS (38), the T83I substitution in spr1902 appeared early during the acquisition of CIP resistance. This suggests that monitoring for similar mutations in S. pneumoniae clinical isolates might become warranted since these may possibly favors the acquisition of additional mutations (e.g. in QRDRs) by providing an early survival benefit against one of the main mode of action of bactericidal antibiotics. In contrast, the role of the spr0335 V416L substitution in CIP resistance appears to be unrelated to ROS.

In conclusion, resistance reconstruction by whole genomic DNA transformation combined with WGS had previously proved useful for pinpointing known and new mutations implicated in resistance to β -lactams (38) and linezolid (40) in *S. pneumoniae* and we have now applied this approach to CIP resistance. In addition to confirm the role of efflux and of QRDR mutations in resistance, we provide new knowledge into the more subtle but relevant roles for mutations in drug transporters and in redox enzymes. As these could prove important in facilitating resistance, it will be interesting to assess their prevalence in additional *S. pneumoniae* isolates resistant to fluoroquinolones.

Acknowledgements

This work was supported by a CIHR grant (# MOP-81266) to M.O. A.L. received a studentship from the CIHR, D.S.B. received a postdoctoral fellowship from the CIHR/Rx&D - Wyeth Pharmaceuticals Research Program and M.O. holds the Canada Research Chair in Antimicrobial Resistance. We thank the Genome Quebec Innovation Centre at McGill University for performing the sequencing.

References

- Levine OS, O'Brien KL, Knoll M, Adegbola RA, Black S, Cherian T, Dagan R, Goldblatt D, Grange A, Greenwood B, Hennessy T, Klugman KP, Madhi SA, Mulholland K, Nohynek H, Santosham M, Saha SK, Scott JA, Sow S, Whitney CG, Cutts F. 2006. Pneumococcal vaccination in developing countries. Lancet 367:1880-1882.
- 2. Linares J, Ardanuy C, Pallares R, Fenoll A. 2010. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. Clin Microbiol Infect 16:402-410.
- 3. **Zhanel GG, Karlowsky JA, Palatnick L, Vercaigne L, Low DE, Hoban DJ.** 1999. Prevalence of antimicrobial resistance in respiratory tract isolates of *Streptococcus pneumoniae*: results of a Canadian national surveillance study. The Canadian Respiratory Infection Study Group. Antimicrob Agents Chemother **43**:2504-2509.
- 4. **Richter SS, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, Beekmann SE, Doern GV.** 2009. Changing epidemiology of antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 2004-2005. Clin Infect Dis **48**:e23-33.
- 5. Imai S, Ito Y, Ishida T, Hirai T, Ito I, Maekawa K, Takakura S, Iinuma Y, Ichiyama S, Mishima M. 2009. High prevalence of multidrug-resistant Pneumococcal molecular epidemiology network clones among *Streptococcus pneumoniae* isolates from adult patients with community-acquired pneumonia in Japan. Clin Microbiol Infect **15**:1039-1045.
- 6. Sadowy E, Kuch A, Gniadkowski M, Hryniewicz W. 2010. Expansion and evolution of the *Streptococcus pneumoniae* Spain9V-ST156 clonal complex in Poland. Antimicrob Agents Chemother **54**:1720-1727.
- 7. **Patel SN, McGeer A, Melano R, Tyrrell GJ, Green K, Pillai DR, Low DE.** 2011. Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. Antimicrob Agents Chemother **55**:3703-3708.
- 8. Zhanel GG, Ennis K, Vercaigne L, Walkty A, Gin AS, Embil J, Smith H, Hoban DJ. 2002. A critical review of the fluoroquinolones: focus on respiratory infections. Drugs 62:13-59.
- 9. Adam HJ, Hoban DJ, Gin AS, Zhanel GG. 2009. Association between fluoroquinolone usage and a dramatic rise in ciprofloxacin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Canada, 1997-2006. Int J Antimicrob Agents **34**:82-85.
- 10. **Bhavnani SM, Hammel JP, Jones RN, Ambrose PG.** 2005. Relationship between increased levofloxacin use and decreased susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in the United States. Diagn Microbiol Infect Dis **51:**31-37.
- 11. **Hooper DC.** 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. Drug Resist Updat **2:**38-55.
- 12. **Drlica K, Zhao X.** 1997. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. Microbiol Mol Biol Rev **61:**377-392.
- 13. Morrissey I, Farrell DJ, Bakker S, Buckridge S, Felmingham D. 2003. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of fluoroquinolone-

resistant or -susceptible *Streptococcus pneumoniae* from Hong Kong. Antimicrob Agents Chemother **47:**1433-1435.

- 14. **Felmingham D, Reinert RR, Hirakata Y, Rodloff A.** 2002. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the PROTEKT surveillance study, and compatative in vitro activity of the ketolide, telithromycin. J Antimicrob Chemother **50 Suppl S1:**25-37.
- 15. Hoban DJ, Doern GV, Fluit AC, Roussel-Delvallez M, Jones RN. 2001. Worldwide prevalence of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, Haemophilus influenzae, and Moraxella catarrhalis in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. Clin Infect Dis **32 Suppl 2:**S81-93.
- 16. Fuller JD, Low DE. 2005. A review of *Streptococcus pneumoniae* infection treatment failures associated with fluoroquinolone resistance. Clin Infect Dis **41**:118-121.
- 17. de la Campa AG, Balsalobre L, Ardanuy C, Fenoll A, Perez-Trallero E, Linares J. 2004. Fluoroquinolone resistance in penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clones, Spain. Emerg Infect Dis 10:1751-1759.
- 18. Janoir C, Zeller V, Kitzis MD, Moreau NJ, Gutmann L. 1996. High-level fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in parC and gyrA. Antimicrob Agents Chemother **40**:2760-2764.
- 19. **Stewart BA, Johnson AP, Woodford N.** 1999. Relationship between mutations in parC and gyrA of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* and resistance to ciprofloxacin and grepafloxacin. J Med Microbiol **48**:1103-1106.
- 20. Jones ME, Sahm DF, Martin N, Scheuring S, Heisig P, Thornsberry C, Kohrer K, Schmitz FJ. 2000. Prevalence of gyrA, gyrB, parC, and parE mutations in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibilities to different fluoroquinolones and originating from Worldwide Surveillance Studies during the 1997-1998 respiratory season. Antimicrob Agents Chemother **44**:462-466.
- 21. Broskey J, Coleman K, Gwynn MN, McCloskey L, Traini C, Voelker L, Warren R. 2000. Efflux and target mutations as quinolone resistance mechanisms in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. J Antimicrob Chemother **45 Suppl** 1:95-99.
- 22. Weigel LM, Anderson GJ, Facklam RR, Tenover FC. 2001. Genetic analyses of mutations contributing to fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother **45**:3517-3523.
- 23. **Perichon B, Tankovic J, Courvalin P.** 1997. Characterization of a mutation in the parE gene that confers fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother **41:**1166-1167.
- 24. **Pan XS, Ambler J, Mehtar S, Fisher LM.** 1996. Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother **40**:2321-2326.
- 25. **Fukuda H, Hiramatsu K.** 1999. Primary targets of fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother **43:**410-412.
- 26. Fisher LM, Gould KA, Pan XS, Patel S, Heaton VJ. 2003. Analysis of dual active fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 52:312-313; author reply 313-314.

- 27. **Pan XS, Fisher LM.** 1997. Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. Antimicrob Agents Chemother **41:**471-474.
- 28. **Brenwald NP, Gill MJ, Wise R.** 1998. Prevalence of a putative efflux mechanism among fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother **42**:2032-2035.
- 29. Zhanel GG, Palatnick L, Nichol KA, Bellyou T, Low DE, Hoban DJ. 2003. Antimicrobial resistance in respiratory tract *Streptococcus pneumoniae* isolates: results of the Canadian Respiratory Organism Susceptibility Study, 1997 to 2002. Antimicrob Agents Chemother 47:1867-1874.
- 30. Garvey MI, Baylay AJ, Wong RL, Piddock LJ. 2011. Overexpression of patA and patB, which encode ABC transporters, is associated with fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother **55**:190-196.
- 31. **Zhanel GG, Hoban DJ, Schurek K, Karlowsky JA.** 2004. Role of efflux mechanisms on fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* and Pseudomonas aeruginosa. Int J Antimicrob Agents **24**:529-535.
- 32. Jumbe NL, Louie A, Miller MH, Liu W, Deziel MR, Tam VH, Bachhawat R, Drusano GL. 2006. Quinolone efflux pumps play a central role in emergence of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother **50**:310-317.
- 33. **Gill MJ, Brenwald NP, Wise R.** 1999. Identification of an efflux pump gene, pmrA, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother **43**:187-189.
- 34. **Piddock LJ, Johnson MM, Simjee S, Pumbwe L.** 2002. Expression of efflux pump gene pmrA in fluoroquinolone-resistant and -susceptible clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother **46**:808-812.
- 35. El Garch F, Lismond A, Piddock LJ, Courvalin P, Tulkens PM, Van Bambeke F. 2010. Fluoroquinolones induce the expression of patA and patB, which encode ABC efflux pumps in *Streptococcus pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 65:2076-2082.
- 36. **Robertson GT, Doyle TB, Lynch AS.** 2005. Use of an efflux-deficient *Streptococcus pneumoniae* strain panel to identify ABC-class multidrug transporters involved in intrinsic resistance to antimicrobial agents. Antimicrob Agents Chemother **49**:4781-4783.
- 37. Boncoeur E, Durmort C, Bernay B, Ebel C, Di Guilmi AM, Croize J, Vernet T, Jault JM. 2012. PatA and PatB Form a Functional Heterodimeric ABC Multidrug Efflux Transporter Responsible for the Resistance of *Streptococcus pneumoniae* to Fluoroquinolones. Biochemistry **51**:7755-7765.
- 38. **Fani F, Leprohon P, Legare D, Ouellette M.** 2011. Whole genome sequencing of penicillin-resistant Streptococcus pneumoniae reveals mutations in penicillinbinding proteins and in a putative iron permease. Genome Biol **12:**R115.
- Feng J, Lupien A, Gingras H, Wasserscheid J, Dewar K, Legare D, Ouellette M. 2009. Genome sequencing of linezolid-resistant *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals novel mechanisms of resistance. Genome Res 19:1214-1223.

- 40. **Billal DS, Feng J, Leprohon P, Legare D, Ouellette M.** 2011. Whole genome analysis of linezolid resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals resistance and compensatory mutations. BMC Genomics **12:**512.
- 41. Claverys JP, Dintilhac A, Pestova EV, Martin B, Morrison DA. 1995. Construction and evaluation of new drug-resistance cassettes for gene disruption mutagenesis in *Streptococcus pneumoniae*, using an ami test platform. Gene 164:123-128.
- 42. Buckley ND, Lee LN, LeBlanc DJ. 1995. Use of a novel mobilizable vector to inactivate the scrA gene of *Streptococcus sobrinus* by allelic replacement. J Bacteriol 177:5028-5034.
- 43. Hakenbeck R, Balmelle N, Weber B, Gardes C, Keck W, de Saizieu A. 2001. Mosaic genes and mosaic chromosomes: intra- and interspecies genomic variation of *Streptococcus pneumoniae*. Infect Immun **69**:2477-2486.
- 44. Marrer E, Schad K, Satoh AT, Page MG, Johnson MM, Piddock LJ. 2006. Involvement of the putative ATP-dependent efflux proteins PatA and PatB in fluoroquinolone resistance of a multidrug-resistant mutant of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother **50**:685-693.
- 45. **Purich DLA, R.D.** 2000. Handbook of Biochemical Kinetics: A Guide to Dynamic Processes in the Molecular Life Sciences, 1st Edition ed.
- 46. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. Cell 130:797-810.
- 47. **Biedenbach DJ, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN.** 2006. Characterization of fluoroquinolone-resistant beta-hemolytic *Streptococcus spp.* isolated in North America and Europe including the first report of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus dysgalactiae* subspecies equisimilis: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). Diagn Microbiol Infect Dis **55:**119-127.
- 48. **Bast DJ, Low DE, Duncan CL, Kilburn L, Mandell LA, Davidson RJ, de** Azavedo JC. 2000. Fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: contributions of type II topoisomerase mutations and efflux to levels of resistance. Antimicrob Agents Chemother 44:3049-3054.
- 49. Canton R, Morosini M, Enright MC, Morrissey I. 2003. Worldwide incidence, molecular epidemiology and mutations implicated in fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae*: data from the global PROTEKT surveillance programme. J Antimicrob Chemother **52**:944-952.
- 50. Jorgensen JH, Weigel LM, Ferraro MJ, Swenson JM, Tenover FC. 1999. Activities of newer fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates including those with mutations in the gyrA, parC, and parE loci. Antimicrob Agents Chemother **43**:329-334.
- 51. Davies TA, Goldschmidt R, Pfleger S, Loeloff M, Bush K, Sahm DF, Evangelista A. 2003. Cross-resistance, relatedness and allele analysis of fluoroquinolone-resistant US clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* (1998-2000). J Antimicrob Chemother **52:**168-175.
- 52. **Richter SS, Heilmann KP, Beekmann SE, Miller NJ, Rice CL, Doern GV.** 2005. The molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* with quinolone resistance mutations. Clin Infect Dis **40**:225-235.

- 53. **Dawson RJ, Locher KP.** 2006. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. Nature **443**:180-185.
- 54. **Cabiscol E, Tamarit J, Ros J.** 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. Int Microbiol **3:**3-8.

Tables

Table 1. Chronological appearance of the mutations functionally characterized inS. pneumoniae R6M2B and 60827 and their transformants.

Strains	CIP MIC	Alleles								
Strams	(µg/ml)	parC	gyrA	patA ^{a,b}	$patB^{c}$	spr0335	spr1544 ^d	spr1902		
R6	0.5	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT		
R6M2B	128	C245T	G253A	WT*	WT	WT	WT	WT		
T1-R6M2B	16	C245T	WT	WT	WT	WT	A-28G	C248T		
T2-R6M2B	64	C245T	G253A	WT	WT	WT	A-28G	C248T		
T3-R6M2B	64	C245T	G253A	WT	WT	WT	A-28G	C248T		
T4-R6M2B	64	C245T	G253A	WT	WT	WT	A-28G	C248T		
T5-R6M2B	128	C245T	G253A	WT*	WT	C1246T	A-28G	C248T		
T1-60827	2	WT	WT	RSS10	RSS10	WT	WT	C248T		

^a PatA mutations identified in RSS10: A-33C, G335T, T537C, A540G, C660T.

^b An asterisk indicates an increased expression of *patA* as measured by quantitative realtime PCR.

^c PatB mutations identified in RSS10: T142G , T357C, T618C, T1260C, G1507A, A1620G.

^d In non-coding sequence, the number preceded by "-" indicates the position upstream of the ATG.

Gene		Mutations ^{b,c,d,e}				
ID ^a	Gene Function (gene name)	R6M2B	T5-R6M2B	T1-60827 ^f		
spr0084	conserved hypothetical protein			RSS1		
spr0085	Hypothetical protein			RSS1		
spr0086	Hypothetical protein			RSS1		
spr0129	hypothetical protein	G-3T				
spr0291	PTS system IIA component			RSS2		
spr0309	Hypothetical protein			RSS3		
spr0310	Alpha, 1-6-glucosidase			RSS3		
spr0335	6-phosphogluconate dehydrogenase		G1246C <i>V416L</i>			
spr0757	DNA topoisomerase IV subunit A	C245T <i>S79F</i>	C245T <i>S79F</i>			
spr0931	Conserved hypothetical protein			RSS4		
spr0952	hypothetical protein	12 nucleotides del downstream				
spr0974	Phosphoenolpyruvate carboxylase			RSS5		
spr0981	Glycosyltransferase			RSS6		
spr1039	Second subunit of major exonuclease			RSS7		
spr1099	DNA gyrase subunit A	G247A <i>E85K</i>	G247A <i>E85K</i>			
spr1248	Conserved hypothetical protein			RSS8		
spr1249	Alpha-acetolactate decarboxylase			RSS8		
spr1250	Conserved hypothetical protein			RSS8		
spr1251	ABC transporter substrate-binding protein -			RSS8		
spr1544	preprotein translocase subunit SecA		A-28G			
spr1545	hypothetical protein			RSS9		
spr1885	ABC transporter ATP-binding/membrane spanning protein - unknown substrate (<i>patB</i>)			RSS10		
spr1886	degenerate transposase			RSS10		
spr1887	ABC transporter ATP-binding/membrane spanning protein - unknown substrate (<i>patA</i>)			RSS10		
spr1902	NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase		C248T <i>T83I</i>	RSS11		
spr1919	ABC transporter membrane-spanning permease - maltose/maltodextrin			RSS12		
spr1945	Choline-binding protein			RSS13		
spr1946	Degenerate transposase (orf1)			RSS13		
spr1979	D-alanine transfer from undecaprenol- phosphate to the poly(glycerophosphate) chain			RSS14		
spr1981	D-alanine transfer from Dcp to undecaprenol- phosphate			RSS14		
spr1982	D-alanine-D-alanyl carrier protein ligase			RSS14		
spr1983	hypothetical protein			RSS14		
spr1988	Glycerol uptake facilitator protein			RSS15		

Table 2. List of mutations identified by WGS in ciprofloxacin resistant S. pneumoniae

spr1989	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase,	RSS15
	truncation	
spr1990	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase,	RSS15
	truncation	

^a Nomenclature according to the genome annotation of *S. pneumoniae* R6.
^b When mutations are within coding regions, the change in amino acids is also indicated in italics.
^c In non-coding sequence, the number preceded by "-" indicates the position upstream of the ATG.
^d Abbreviations: del, deletion; RSS, recombinant sequence segment
^e Mutations in bold were further studied to determine their potential role in CIP resistance.

^fMutations in bolded RSSs have been confirmed in the parental isolate 60827.

	Alleles								CIP MIC	
Strains ^a	parC	gyrA	spr0129	spr0335	spr1544	spr1902	patA	patB	(µg/ml) ^b	
R6	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	0.5	
R6 ^{smR}	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	0.5	
R6 ^{spr1902-T5R6M2B,smR}	WT	WT	WT	WT	WT	T5- R6M2B	WT	WT	0.5	
R6 ^{parC-R6M2B}	R6M2B	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	2	
R6 ^{parC,spr1902-T5R6M2B,smR}	R6M2B	WT	WT	WT	WT	T5- R6M2B	WT	WT	2	
R6 ^{parC,gyrA-R6M2B}	R6M2B	R6M2B	WT	WT	WT	WT	WT	WT	32	
R6 ^{parC,gyrA,spr1544-} T5R6M2B,smR	R6M2B	R6M2B	WT	WT	T5- R6M2B	WT	WT	WT	32	
R6 ^{parC,gyrA,spr1902-} T5R6M2B,smR	R6M2B	R6M2B	WT	WT	WT	T5- R6M2B	WT	WT	64	
R6 ^{patA,T1-60827,smR}	WT	WT	WT	WT	WT	WT	T1- 60827	WT	1	
R6 ^{patB,T1-60827,smR}	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	T1- 60827	1	
T1-60827	WT	WT	WT	WT	WT	WT	T1- 60827	T1- 60827	2	
T5-R6M2B	R6M2B	R6M2B	WT	T5- R6M2B	T5- R6M2B	T5- R6M2B	WT	WT	128	
T5-R6M2B ^{spr0335-} WT,smR	R6M2B	R6M2B	WT	WT	R6M2B	R6M2B	WT	WT	64	
R6M2B	R6M2B	R6M2B	R6M2B	WT	WT	WT	WT	WT	128	
R6M2B ^{spr0129-WT,smR}	R6M2B	R6M2B	WT	WT	WT	WT	WT	WT	128	

Table 3. Functional analysis of mutations found by whole genome sequencing in R6M2B, T5-R6M2B and T1-60827

^a smR indicates that a $rpsL^+$ allele conferring resistance to streptomycin was cotransformed along with the PCR fragment of interest for selection purposes. These strains are resistant to streptomycin.

^b MICs in bold are significantly different from the parent strain without the mutation.

|--|

Genetic	QRDR mutations ^a		patA	Gene	MIC (µg/ml) ^c			
Dackground	gyrA	parC	expression	mactivated	CIP	CIP+R	EtBr	EtBr+R
R6	WT	WT	1.0	None	0.5	0.5	2	0.25
	WT	WT		patB	0.5	0.5	1	0.25
	WT	WT		patA	0.5	0.5	1	0.25
	WT	WT		spr0043	0.5	0.5	2	0.25
R6M2B	E85K	S79F	66±12.44	None	128	32	16	0.25
	E85K	S79F		patB	32	32	4	0.25
	E85K	S79F		patA	32	32	4	0.25
	E85K	S79F		spr0043	64	32	16	0.25
T5-R6M2B	E85K	S79F	170±9.25	None	128	32	16	0.25
	E85K	S79F		patB	32	32	4	0.25
	E85K	S79F		patA	32	32	1	0.25
	E85K	S79F		spr0043	128	32	16	0.25
T1-60827	WT	WT	1.82 ± 0.28	None	2	0.5	16	0.25
	WT	WT		patB	1	0.5	8	0.25
	WT	WT		patA	2	0.5	8	0.25
	WT	WT		spr0043	2	0.5	16	0.25
60827	WT	WT	4.78 ± 0.88	None	2	0.5	16	0.25
	WT	WT		patB	2	1	16	0.25
	WT	WT		patA	2	0.5	16	025
	WT	WT		spr0043	2	0.5	16	0.25

^a gyrA: DNA gyrase; parC: topoisomerase IV. ^b As measured by qRT-PCR. ^c Gene inactivations conferring $a \ge 2$ fold-change in MICs compared to the parental strain are shown in bold. CIP, ciprofloxacin; R, Reserpine (20 µg/mL); Etbr, ethidium bromide.



Figure 1. Mutations in spr1902 and ciprofloxacin-induced production of reactive oxygen species.

Intracellular levels of reactive oxygen species in the absence of ciprofloxacin were monitored in *S. pneumoniae* R6^{parC,gyrA-R6M2B} (dark gray bars) and R6^{parC,gyrA,spr1902-T5R6M2B, smR} (white bars) by measuring DCF-DA fluorescence signals for 3 h. Ciprofloxacin-induced reactive oxygen species were monitored in *S. pneumoniae* R6^{parC,gyrA-R6M2B} (black bars) and R6^{parC,gyrA,spr1902-T5R6M2B, smR} (light gray bars) at baseline and up to 3 h after exposure to 32 µg/ml of ciprofloxacin. Results are the averages of three independent experiments. The significance of the differences in DCF-DA signal between conditions was confirmed by Student's *t* test. The level of significance was set to a *P* value of ≤0.05.
	Description	Courses
Staring	Description	Source
Suallis	Wild trme	
K0 D()(2D		AICC BAA 255
R6M2B	R6 clone selected from CIP resistance	This work
15-R6M2B	R6 clone transform with gDNA from R6M2B selected	I his work
	for CIP resistance	
T1-60827	R6 clone transformed with gDNA from 60827 selected	This work
	for CIP resistance	
14599	clinical isolate	Dr. GG Zhanel
14635	clinical isolate	Dr. GG Zhanel
14636	clinical isolate	Dr. GG Zhanel
64933	clinical isolate	Dr. GG Zhanel
45089	clinical isolate	Dr. GG Zhanel
51597	clinical isolate	Dr. GG Zhanel
59774	clinical isolate	Dr. GG Zhanel
60827	clinical isolate	Dr. GG Zhanel
60911	clinical isolate	Dr. GG Zhanel
45693	clinical isolate	Dr. GG Zhanel
60827	clinical isolate	Dr. GG Zhanel
R6	R6 transformed with plasmid pFF60043, KAN ^r	This work
pFF6 <i>0043</i>		
R6M2B	R6 transformed with plasmid pFF6 <i>patA</i> , KAN ^r	This work
pFF6 <i>patA</i>		
R6M2B	R6 transformed with plasmid pFF6 <i>patB</i> , KAN ^r	This work
pFF6 <i>patB</i>		
R6M2B	R6M2B transformed with plasmid pFF60043, KAN ^r	This work
pFF60043	1 1 7	
R6M2B	R6M2B transformed with plasmid pFF6 <i>patA</i> . KAN ^r	This work
pFF6 <i>patA</i>		
R6M2B	R6M2B transformed with plasmid pFF6 <i>patB</i> . KAN ^r	This work
pFF6 <i>patB</i>		
T5-R6M2B	T5-R6M2B transformed with plasmid pFF60043. KAN ^r	This work
pFF60043	r in the rest of the second seco	
T5-R6M2B	T5-R6M2B transformed with plasmid pFF6 <i>natA</i> . KAN ^r	This work
pFF6 <i>patA</i>		
T5-R6M2B	T5-R6M2B transformed with plasmid pFF6 $natB$ KAN ^T	This work
nFF6 <i>natB</i>		
T1-60827	T1-60827 transformed with plasmid pFF30043 CM ^r	This work
nFF30043	11 00027 duilisionned with plusing pri 50075,eth	THIS WOLK
T1-60827	T1-60827 transformed with plasmid pFF3 <i>pat 4</i> CM ^r	This work
nFF3natA	11-00027 transformed with plasmid prir sputh, CM	
T1_608 77	T1_60827 transformed with plasmid pEE2nat A CM	This work
11-0002/ nEE2natD	1 1-00027 transformed with plasmid prr <i>sputa</i> , CM	THIS WOLK
рггэрав		

Supplementary Table 1. Strains and plasmids used in this study

60827	60827 transformed with plasmid pFF30043, CMr	This work
60827	60827 transformed with plasmid pFF3patA, CM ^r	This work
pFF3 <i>patA</i>		
60827 pEF3 <i>patB</i>	60827 transformed with plasmid pFF3patB, CM ^r	This work
R6parC-R6M2B	R6 transformed with <i>parC</i> PCR fragment from R6M2B	This work
R6 ^{spr1902-}	R6 transformed with spr1902 PCR fragment from T5-	This work
T5R6M2B,smR	R6M2B and $rnsL^+$ strentomycin resistance marker SM ^r	THIS WOLK
R 6parC, gyrA-	R_{par}^{C} transformed with $avr 4$ PCR fragments from	This work
R6M2B	R6M2B	THIS WORK
R6 ^{parC, gyrA,}	R6 ^{parC,gyrA-R6M2B} co-transformed with spr1902 PCR	This work
spr1902-	fragment from T5-R6M2B and <i>rnsL</i> ⁺ SM ^r	THIS WOLK
T5R6M2B,smR	hughent from 15 Rom2D und (p52, 50)	
R6 ^{parC, gyrA,}	R6 ^{parC,gyrA-R6M2B} co-transformed with spr1544 PCR	This work
spr1544-	fragment from T5-R6M2B and <i>rnsL</i> ⁺ SM ^r	
T5R6M2B,smR		
R6 ^{patB,T1-}	R6 co-transformed with patB fragment from T1-60827	This work
60827,smR	and $rpsL^+$ (contain mutations T142G ;T357C;	
	T618C;C1260T), SM ^r	
R6 ^{patA,T1-}	R6 co-transformed with patB fragment from T1-60827	This work
60827, smR	and $rpsL^+$ (contain mutations G335T; T537C; A540C;	
	C660T) SM ^r	
T5-R6M2B	T5-R6M2B co-transformed with spr0335 PCR fragment	This work
spr0335R6, smR	from R6 and $rpsL^+$, SM ^r	
R6M2B	R6M2B co-transformed with spr0129 PCR fragment	This work
spr0129R6, smR	from R6 and <i>rpsL</i> ⁺ , SM ^r	
Plasmids		
pFF3	<i>S. pneumoniae</i> non-replicative vector that contains a CM ^r	Unpublished
	resistance marker	data
pFF6	pFF3 in which the CM ^r resistance marker was replaced	Unpublished
	with a KM ^r resistance marker.	data
pFF60043	plasmid pFF6(KAN ^r) containing a fragment of spr0043	This work
	amplified from R6	
pFF6 <i>patA</i>	pFF6(KAN ^r) containing a fragment of <i>patA</i> (spr1887)	This work
	amplified from R6	
pFF6 <i>patB</i>	pFF6(KAN ^r) containing a fragment of <i>patB</i> (spr1885)	This work
	amplified from R6	
pFF3 <i>0043</i>	pFF3(CM ^r) containing a fragment of <i>patA</i> (spr1887)	This work
	amplified from 60827	
pFF3 <i>patA</i>	plasmid pFF3(CM ^r) containing a fragment of <i>patA</i>	This work
	(spr1887) amplified from 60827	
pFF3 <i>patB</i>	Plasmid pFF3(CM ^{1}) containing a fragment of <i>patB</i>	This work
	(spr1885) amplified from 60827	

Abbreviations: CIP: Ciprofloxacin; KAN: Kanamycin; CM: Chloramphenicol; SM: streptomycin; CRI; Centre de Recherche en Infectiologie

Supplementary Table 2. Primers used in this study

Primers	Primer sequences
Gene inactivations	
<i>patB</i> F-KO	CCAACCTCCAGCAGAAAGAG
patBR-KO	CCTGACTAGCATCTGGCACA
patAF-KO	GGGGTACCGTTGGTTCCATCGCTTCTTT
patAR-KO	CGGGATCCATCCTTTGTTTTTGTCCACC
spr0043F-KO	GGGAGATATGACCTTCAAGC
spr0043R-KO	AAACTGCTAGTCGCCTCATC
Mutant reconstruct	tion
parC-F	TGGGTTGAAGCCGGTTCA
parC-R	CAAGACCGTTGGTTCTTTC
gyrA-F	TTCTCTACGGAATGAATG
gyrA-R	GATATCACGAAGCATTTCCAG
spr0129(L)-F	TGTTGCTTGCGTTTATGGAG
spr0129(L)-R	TGATAGAGAAATTTTTATGA
spr1902-F	ATGGAAAAACAAACCGTCGCCGT
spr1902-R	TTAAGACCACTCATTTTCTGC
spr1902(L)-F	CCATATTGAAGGCCAAGTCCT
spr1902(L)-R	GTTGCAGCTGCCTTTGATATGG
spr0335(L)-F	TGACCGTTTTGGCGCTTGTATC
spr0335(L)-R	ATTTTGTAGCTGACCATTGA
spr1544(L)-F	TTCAGTTCTGTTTTTCAATATCG
spr1544(L)-R	TGGTACGACCTGTAAATTGGT
up <i>patA-</i> F	AAACCAAGACTCACTAGTTA
<i>patB</i> -R	TTATTCGAAAACAAATTGATTGTG
qRT-PCR	
RT16sRNA-F	CCTATTGTTAGTTGCCATCATTCAG
RT16srRNA-R	GACTCGTTGTACCAGCCATTGT
RT <i>patA-</i> F	GGTGGCAAGGATATTCGAGA
RT <i>patA-</i> R	AGAATGGCACGTTGGAGAAC
RT <i>patB</i> -F	GCCTTTACTGGAGCTGAACG
RT <i>patB</i> -R	AGGTTGGAGCCTTTTCAGGT
RTspr0081-F	CCTACTACGAAGCAGCGACAG
RTspr0081-R	TACAAGCGGAGTCAACTGAGG
RTspr1884-F	CGGTGTCCAACTTGTCAATG
RTspr1884-R	GAGTGAGATGTCCCGAAAGG

Abbreviation: F: Forward; R: Reverse;(L): Long fragment; up: upstream; qRT-PCR: quantitative real-time PCR.

Strains	CIP MIC µg/mL				
µg/mL reserpine	0	2.5	5	10	20
R6	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
T1-60827	2	0.5	0.5	0.5	0.5
60827	2	1	1	0.5	0.5
R6M2B	128	64	64	32	32
T5-R6M2B	128	64	64	32	32

Supplementary Table 3. Reversion of the efflux phenotype by reserpine.

	Qł	RDRs			
	mutations		patA	MIC (µg/mL) ^b	
Strains	gyrA	parC	expression ^a	CIP	CIP+R
14599			1.1±0.25	0.5	0.5
14635			1.4±0.3	0.5	0.5
14636			0.734±0.169	0.5	0.5
64933			1.13±0.04	1	1
45089		K137N	1.14±0.234	1	1
51597		S79F	8.87±1.356	8	2
59774			11.13±2.347	4	0.5
60911			11.09±2.67	4	0.5

Supplementary Table 4. QRDRs mutations, *patA* expression and CIP MIC in *S. pneumoniae* clinical isolates.

S81F

45693

 aAs measured by qRT-PCR bCIP (ciprofloxacin); R (reserpine 20 $\mu g/mL$). MICs have been measured at least in triplicates.

6.98±0.03

32

128

S79F



Figure S1. Schematic representation (in CG view) of mutated locus present in each CIP resistant strains sequenced R6M2B (A) T5-R6M2B (B) and T1-60827 (C). In this figure, genes indicates in red are encoded on the forward DNA strand and the genes in blue are encoded on the reverse strand. Genes with (*) have mutation(s) in the region upstream of the ATG and genes with (⁺) have mutation(s) in the downstream region of the gene. Abbreviations: *parC*: DNA topoisomerase IV subunit A, *gyrA*: DNA gyrase subunit A,

gnd: 6-phosphogluconate dehydrogenase, *secA*: preprotein translocase subunit SecA, *gpsA*: NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, *PTS-EIIA*: PTS system IIA component, *dexB*: glucan 1,6-alpha-glucosidase, *ppc*: phosphoenolpyruvate carboxylase, *cpoA*: glycosyl transferase CpoA, *rexB*: second subunit of major exonuclease, *aldB*: alpha-acetolactate decarboxylase, *glnH*: amino acid ABC transporter amino acid-binding protein, *patB*: ABC transporter ATP-binding protein/permease, *patA*: ABC transporter ATP-binding protein/permease, *patA*: D-alanine transfer from undecaprenol-phosphate to the poly(glycerophosphate) chain, *dltC*: D-alanine-poly(phosphoribitol) ligase subunit 2, *dltB*: D-alanine transfer from Dcp to undecaprenol-phosphate, *dltA*: D-alanine--poly(phosphoribitol) ligase subunit 1, *glpF*: glycerol uptake facilitator protein.

Chapitre IX: La présence de mutations et l'augmentation de l'expression d'ARN chez des souches de *Streptococcus pneumoniae* résistantes à la tétracycline causent la résistance tel que démontré par séquençage de génome et séquençage de l'ARN messager.

Ce chapitre contient un article soumis pour publication dans le journal *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.

9.1 Résumé

Contexte

Le but de cette étude est de caractériser les mutations chromosomiques associées à la résistance à la tétracycline chez *Streptococcus pneumoniae*.

Résultats

Le séquençage du génome de deux mutants *S. pneumoniae* R6 sélectionnés pour la résistance à la tétracycline a révélé des mutations dans le gène *rpsJ*, codant pour la protéine S10, et dans les régions promotrice et codante du transporteur ABC PatA/PatB. Les mutants présentent une résistance croisée à la ciprofloxacine. La reconstruction de la résistance par transformation d'allèles contenant les mutations dans la région codante de *patA* a confirmé le rôle de ces mutations dans la résistance. La surexpression du transporteur ABC PatA/PatB contribue à la résistance à la tétracycline, à la ciprofloxacine et au bromure d'éthidium et est associée à une diminution de l'accumulation de la tétracycline tritiée. La réintroduction des mutations détectées par le séquençage du génome

n'a pas permis de reconstruire le niveau de résistance observé chez les souches parentes. L'analyse comparative du transcriptome par profilage de l'ARN des mutants résistants a permis de révéler qu'en plus de la surexpression de *patA* et *patB*, l'expression de plusieurs gènes de la voie de biosynthèse et de récupération de la thiamine est augmentée chez les deux mutants. L'inactivation de ces gènes a confirmé leur rôle dans la résistance à la tétracycline.

Conclusion

La combinaison de l'analyse génomique et transcriptomique couplée à l'étude fonctionnelle a permis la découverte de nouvelles mutations causant la résistance à la tétracycline chez *S. pneumoniae*.

9.2 Article

Multiple mutations and increased RNA expression in tetracycline resistant *Streptococcus pneumoniae* as determined by genome wide DNA and mRNA sequencing.

Andréanne Lupien¹, Hélène Gingras¹, Michel G. Bergeron¹, Philippe Leprohon¹, Marc Ouellette^{1§}

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

[§]Corresponding author: Marc Ouellette Ph.D. Centre de Recherche en Infectiologie 2705 Boul. Laurier Québec, QC Canada G1V 4G2 Tel : 1-418-654-2705 Fax : 1-418-654-2715 E-mail :<u>Marc.Ouellette@crchul.ulaval.ca</u>

Running title: Tetracycline resistance in *Streptococcus pneumoniae*.

Emails

Andréanne Lupien: <u>andreanne.lupien@crchul.ulaval.ca</u> Hélène Gingras : <u>helene.gingras@crchul.ulaval.ca</u> Michel G. Bergeron : <u>Michel.G.Bergeron@crchul.ulaval.ca</u> Philippe Leprohon: <u>philippe.leprohon@crchul.ulaval.ca</u>

Synopsis

Objectives

This study aimed at characterizing chromosomal mutations associated to resistance to tetracycline in *Streptococcus pneumoniae*.

Methods

Chronological appearance of mutations in two *S. pneumoniae* R6 mutants (R6M1TC-5 and R6M2TC-4) selected for resistance to tetracycline was determined by next-generation sequencing. A role for the mutations identified was confirmed by reconstructing resistance to tetracycline in a *S. pneumoniae* R6 wild-type background. RNA sequencing was performed on R6M1TC-5 and R6M2TC-4 and the relative expression of genes was reported according to R6. Differentially expressed genes were classified according to their ontology.

Results

Whole-genome sequencing of R6M1TC-5 and R6M2TC-4 revealed mutations in the gene *rpsJ* coding for the ribosomal protein S10 and in the promoter region and coding sequences of the ABC genes *patA* and *patB*. These cells were cross-resistant to ciprofloxacin. Resistance reconstruction confirmed a role in resistance for the mutations in *rpsJ* and *patA*. Overexpression of the ABC transporter PatA/PatB or mutations in the coding sequence of *patA* contributed to resistance to tetracycline, ciprofloxacin and ethidium bromide, and was associated with a decreased accumulation of H³-tetracycline. Comparative transcriptome profiling of the resistant mutants further revealed that, in addition to the overexpression of *patA* and *patB*, several genes of the thiamine biosynthesis and salvage pathway were

increased in the two mutants but also in clinical isolates resistant to tetracycline. This overexpression most likely contributes to the tetracycline resistance phenotype.

Conclusions

The combination of genomic and transcriptomic analysis coupled to functional studies has allowed the discovery of novel tetracycline resistance mutations in *S. pneumoniae*.

Keywords

Streptococcus pneumoniae, tetracycline, ABC transporter, *rpsJ*, thiamine, genomic, RNAseq.

Introduction

Streptococcus pneumoniae is a Gram positive bacterium responsible for several diseases such as otitis media, meningitis, community-acquired pneumonia and bacteremia ¹ and for which resistance to antibiotics has become a worldwide concern. The prevalence of resistance varies between countries but is globally high for β -lactams, macrolides, chloramphenicol and tetracycline (TC) mainly due to the spread of multidrug-resistant clones. ² Since the first report in 1967 of penicillin and TC non-susceptible isolates, ³⁻⁷ resistance has increased to a point where 24%, 35%, 42%, and even >80% of disease-causing pneumococci are now resistant to TC in the USA, France, Spain and some regions of Asia, respectively. ⁸⁻¹⁰ Doxycycline, a TC mostly use for the treatment of intracellular bacterial infections, have been proposed for the treatment of community-acquired pneumonia. ¹¹ However, cross-resistance between the TC family compounds is observable in pneumococci, ^{12, 13} except for the new glycylcycline tigecycline (TGC).

Tetracycline inhibits protein synthesis by blocking the attachment of charged aminoacyl-tRNA to the A site on the ribosome, which prevent the introduction of new amino acids to the nascent peptide chain. ¹⁴ Resistance to TC in bacteria occurs through enzymatic inactivation, ¹⁵ by active efflux or by ribosome protection from the acquisition of *tet* genes. ^{16, 17} In pneumococci, the acquisition of the gene *tet*(M) is the most common mechanism of resistance to TC, ^{6, 18, 19} while resistance mediated by *tet*(O) have only been reported sporadically. ²⁰ Both genes are located on *Tn916*-like mobile genetic elements and encode ribosomal protection proteins that have homology to elongation factors G. ²¹ The GTPase activity of *tet*(M) and *tet*(O) appears to be important for the displacement of tetracycline from the ribosome. ¹⁹ Resistance to TC is now so frequent in S. *pneumoniae* that it is seldomly used for treating this bacterium.

Besides mobile elements, chromosomal mutations have also been shown to participate in resistance to TC. In *Helicobacter pylori*, the triple base pair mutation AGA₉₂₆₋₉₂₈ \rightarrow TTC in both copies of the 16S rRNA gene caused high level resistance to TC, whereas

strains with low-level resistance harbored only single or double base pair mutations. $^{22, 23}$ In *Neisseria gonorrhoeae*, point mutations in the *rpsJ* gene coding for ribosomal protein S10, the gene *mtrR* coding for a transcriptional regulator or the gene *penB* coding for a porin have also been implicated in resistance to TC. 24

Overexpression of multidrug efflux pumps of the ABC superfamily can contribute to resistance to structurally unrelated molecules, including TC in Gram negative bacteria and fluoroquinolones in *S. pneumoniae*. ²⁵⁻²⁷ Fluoroquinolones still have an excellent activity against *S. pneumoniae but* resistance in *in vitro*-selected or clinical strains was indeed shown to involve the overexpression of the multidrug ABC transporter PatA/PatB in addition to mutations in gyrase and topoisomerase genes. ²⁸⁻³² Here, we studied resistance to TC in the absence of *tet*(M) in *S. pneumoniae* by DNA and RNA sequencing and found several novel mutations and gene overexpression, including one ribosomal protein, the ABC proteins PatA/PatB and thiamine biosynthetic enzymes that are associated for the first time with TC resistance in *S. pneumoniae*.

Methods

Bacteria culture and strains

Strains used in this study are listed in Table S1. Pneumococci were grown in brain heart infusion broth (BHI, Difco), or on tryptic-soy agar containing 5% defibrinated sheep's blood. Cultures were incubated for 16-24 hours in a 5% CO₂ atmosphere at 35°C. TC resistant mutants of *S. pneumoniae* were obtained by successive passages of *S. pneumoniae* R6 WT on plates containing increasing concentrations of TC, as previously described. ³²⁻³⁵ Briefly, the selection for tetracycline resistance was conducted on Szybalski plates containing concentration gradients of tetracycline. Mutants were selected by scrapping colonies growing at the front of the highest concentration of tetracycline at each stage. This pool of colonies was then streaked onto plates containing either the same concentration of antibiotic or a gradient of increased antibiotic concentrations. End-point mutants corresponded to colonies growing on plates with the highest concentration of antibiotic and for which an additional increase in tetracycline concentration failed to yield resistant colonies. A total of five and four selection cycles were required to obtain the endpoint *S. pneumoniae* R6M1TC-5 and R6M2TC-4 mutants, respectively.

Next-generation DNA sequencing

Genomic DNAs were extracted using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. The genomes of R6M1TC-5 and R6M2TC-4 were sequenced using a 454 Life Sciences GS-FLX system (Roche). Genome sequencing, assemblies and comparative analyses were performed at the McGill University Genome Québec Innovation Center (http://gqinnovationcenter.com/index.aspx). R6M1TC-5 and R6M2TC-4 generated aggregated genome size of 2016699 bps, 2017241 bps, respectively, at a mean 21X coverage. Whole genome sequencing was also performed on clones of strains R6M1TC-1, R6M1TC-2, R6M1TC-3, R6M1TC-4, R6M2TC-1, R6M2TC-2 and R6M2TC-3 using an Illumina MiSeq system (Centre de Recherche du CHU de 104

Québec) and a 250-nucleotides paired-end reads protocol. This generated genome assemblies covering at least 99% of the *S. pneumoniae* R6 genome at a mean 120X coverage. Sequence reads from each strain were filtered based on quality score using Trimmomatic ³⁶ and aligned to the genome of *S. pneumoniae* R6 using the software bwa (bwa aln, version 0.5.9) with default parameters. ³⁷ The maximum number of mismatches was 4, the seed length was 32 and 2 mismatches were allowed within the seed. The detection of single nucleotide polymorphisms was performed using samtools (version 0.1.18), beftools (distributed with samtools) and vcfutils.pl (distributed with samtools), ³⁸ with a minimum of three reads to call a potential variation prior to further analysis. Mutations deduced from massively parallel sequencing were confirmed by PCR amplification and conventional DNA sequencing.

Sequencing data accession numbers

All sequencing data described in this paper has been deposited at the EBI SRA database (http://www.ebi.ac.uk/) under the study accession number PRJEB6539 and the sample accession numbers ERS480579 (R6M1TC-1); ERS480580 (R6M1TC-2); ERS480581 (R6M1TC-3a); ERS480582 (R6M1TC-3b); ERS480583 (R6M1TC-4a); ERS480584 (R6M1TC-4b); ERS480567 (R6M1TC-5); ERS480585 (R6M2TC-1a); ERS480586 (R6M2TC-1b); ERS480587 (R6M2TC-2a); ERS480588 (R6M2TC-2b); ERS480589 (R6M2TC-3a); ERS480590 (R6M2TC-3b) and ERS480568 (R6M2TC-4).

Genetic transformation and inactivation

Long PCR fragments (~5kb) containing the mutations of interest were amplified using primers listed in Table S2 and transformed in *S. pneumoniae* R6 as described previously. ^{32, 34} For introducing mutations that were less amenable to selection, short (500bp) PCR fragments amplified from ribosomal protein S12 (*rpsL*) or dihydrofolate reductase (*dhfr*) gene variants conferring resistance to streptomycin and trimethoprim, respectively, were co-transformed and used as surrogate selection markers as previously described. ³² Fragments containing the mutations from the entire *patA-patB* operon from R6M1TC-5 and R6M2TC-4 were produced by overlap PCR from two distinct fragments to increase the length of the PCR product.

Gene inactivation was performed using the plasmid pFF6 (KAN^R) or pFF3 (CHL^R). ³² PCR fragments covering the middle region of the genes *patA*, *patB*, spr0632, spr0634, spr0637 and spr0638 were amplified using the primers listed in Table S2 and cloned into EamII05I-digested pFF6 or pFF3 to produce plasmids pFF6*patA*, pFF6*patB*, pFF6spr0632(R6), pFF3spr0632(CCRI22087), pFF6spr0634, pFF6spr0637 and pFF6spr0638. These were transformed into *S. pneumoniae* as previously described. ^{34, 39}

MIC determination

MICs to TC (Sigma), CIP (Sigma) and Etbr (Fluka) in the absence and the presence of 20ug/mL reserpine (Sigma) were determined by microdilution. All MICs measurements were performed at least in triplicates.

RNA sequencing

Total RNA was isolated from *S. pneumoniae* R6M1TC-5, R6M2TC-4 and *S. pneumoniae* R6 WT grown to mid-log phase in BHI using the Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNAs were quantified using 2100 BioAnalyzer RNA6000 Nano chips (Agilent) and 1µg of total RNA was treated with Ribo-ZeroTM rRNA Removal Kits (Bacteria) (Epicentre). RNAseq libraries were produced from 50 ng of rRNA-depleted samples using the ScriptSeqTM v2 RNA-Seq Library Preparation Kit (Epicentre). The libraries were analyzed using 2100 BioAnalyser High Sensitivity DNA chips and quantified by PicoGreen. The libraries were pooled, diluted to 8pM and sequenced on an Illumina MiSeq system using a 250bps paired-ends reads protocol.

Reads were mapped to the *S. pneumoniae* R6 reference genome as described above. Transcripts were assembled from the alignment files by using the Cufflinks pipeline. ⁴⁰ Differential gene expression was computed with CuffDiff, and genes with a *p*-value \leq 0.015 were considered for further analysis.

Quantitative real-time PCR

Total RNAs were extracted as described above and treated with DNase I (Ambion) to avoid any DNA contamination. The quality and integrity of the RNAs was assessed using a 2100 BioAnalyzer and RNA6000 Nano chips (Agilent). cDNAs were generated from 250ng of total RNAs using the Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) and random hexamers according to the manufacturer's instruction. Real-time quantitative RT-PCR assays were carried out with a BioRad Cycler using SYBR Green I (Molecular Probes). A final volume of 10µl was used for each reaction containing specific primers (Table S2) and iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad). All qRT-PCR data were normalized according to the amplification signals of 16S rRNA.

Gene ontology (GO)

Differentially expressed genes were classified according to their ontology by using the Blast2GO software. ⁴¹ If not mentioned, the default setups were used during the analysis. *S. pneumoniae* R6 ORFs were first blasted against the NCBI genome database and GO mapping performed on the blasted genomes to assign cellular component (CC), molecular function (MF) and biological process (BP) ontology levels. Mapped genes where then screened using KEGG. GO Enrichment analysis (Fisher exact two-tailed t-test) was then performed for genes identified as overexpressed or down-regulated (p-value ≤ 0.015) in R6M1TC-5 and R6M2TC-4 by the CuffLinks pipeline, and also on the *S. pneumoniae* R6 genome as a control. GO terms with a value $p \leq 0.015$ were considered significantly enriched in the group tested. Results are expressed as the proportion of sequences associated with a particular GO term in the tested group.

TC accumulation

S. pneumoniae was grown to exponential phase (O.D.600nm 0.2-0.3) in BHI. Cells were centrifuged and washed once with 0.1M Phosphate buffer pH 7. Cells were then concentrated 40X (approximately 10⁹ cells/mL) in 0.1M Phosphate buffer containing 1mM MgSO₄ pH 7 and incubated at 37°C in the presence 1% glucose for 15 min. After preincubation with glucose, 0.05µM of [7-3H(N)]-tetracycline (H3-TC) (17.9 Ci/mmol, Moravek Biochemicals and Radiochemicals) was added to a final concentration of 5µM of TC. H³-TC was used within one week upon arrival to avoid possible degradation. ⁴² When required, 20 µg/ml of the efflux pump inhibitor reserpine was added 15 minutes after the addition of H³-TC. Aliquots (0.1mL) were withdrawn at specific intervals and accumulation was stopped by diluting with 1mL of ice-cold 0.1M Phosphate buffer pH 7 containing 100mM LiCl. Samples were centrifuged immediately at 4°C for 2 minutes and washed once with 0.1M ice-cold Phosphate buffer, 100mM LiCl, pH 7. Pelleted cells were resuspended in 0.1mL 1X Phosphate buffered saline, and 5mL Ecolite was added before scintillation counts were measured using a LS6000TA Scintillation counter (Beckman). Results were normalised to bacterial count obtained prior to the addition of TC at 0°C and 37°C, since no growth was observed during the course of the experiment after the addition of the drug.

Results

Tetracycline resistant mutants

Two *S. pneumoniae* mutants named R6M1TC-5 and R6M2TC-4 were independently selected for resistance to TC from *S. pneumoniae* R6 wild-type (WT) (MIC TC 0.125µg/mL) by serial passages in the presence of increasing TC concentrations until they reached a MIC of 8µg/mL (Table 1). This is considered resistant according to recently revised breakpoints for TC. ⁴³ Five and four passages on TC-supplemented agar plates were required for the selection of R6M1TC-5 and R6M2TC-4, respectively. The R6M1TC-5 and R6M2TC-4 mutants were also cross-resistant to the fluoroquinolone CIP and to the intercalating dye ethidium bromide (EtBr) (Table 1). A low level cross-resistance was also observed in R6M1TC-5 and R6M2TC-4 to the new glycylcycline tigecycline (TGC). Interestingly, the efflux pump inhibitor reserpine decreased the CIP and EtBr MICs of both mutants to WT levels and also substantially increased their sensitivity to TC (Table 1). Reserpine had no effect on the small cross-resistance to TGC (Table 1). While confirming a role for drug efflux in the multidrug resistance phenotype of *S. pneumoniae* R6M1TC-5 and R6M2TC-4, the reserpine-insensitive residual TC resistance suggests that additional mechanisms are also likely to contribute to resistance in these mutants.

Whole-genome sequencing (WGS) of TC mutants

The genomes of each selection steps leading to both R6M1TC-5 and R6M2TC-4 mutants were sequenced to understand the genomics of TC resistance and the order of appearance of mutations linked to resistance. The genomes of *S. pneumoniae* R6M1TC-5 and R6M2TC-4 both contained 9 mutations which were distributed over 7 and 8 genomic loci, respectively (Table 2). Two of the mutated loci were common to both mutants, i.e. the gene spr0187 coding for ribosomal protein S10 and the gene spr1887 coding for the multidrug ABC transporter PatA, although mutations occurred at different positions in each

mutant (Table 2). For the gene spr0187 (also known as *rpsJ*), the R6M1TC-5 mutant harboured a C157T transition (leading to a R53C mutation) in addition to a small deletion covering positions 175-180 (Table 2). Interestingly, intermediate mutants R6M1TC-1 to R6M1TC-4 presented instead a single G178T transversion in spr0187 (Table 2). The increasing TC pressure thus appears to have selected for several distinct events in R6M1TC, the first one being selected early at position 178 and the others occurring late at positions 157 and 175-180 of *rpsJ* (which encompasses the initial G178T mutation) (Table 2). In contrast, a unique A169G transition leading to a K57E substitution was observed in spr0187 in R6M2TC-4, which was selected early at the first selection step (Table 2). For the *patA* locus, both mutants harbored mutations upstream of the start codon (possibly in the promoter region) and within the coding region (Table 2). Interestingly, in both cases the mutations in the promoter region of *patA* preceded those within the gene (Table 2). The number of *patA* mutations also correlated with the level of resistance to TC (Table 2).

Reconstruction of TC resistance

Recurrent mutations are the most likely candidates to contribute to resistance and the role of the *rpsJ* and *patA* mutations was thus further assessed by resistance reconstruction. This was done by transforming *S. pneumoniae* R6 WT with variant alleles amplified from RM1TC-5 or R6M2TC-4 either alone or along with a PCR fragment covering the *rpsL*+ allele of *S. pneumoniae* CP1296 and conferring resistance to streptomycin that was used as a surrogate marker for the selection of transformants (see Materials and Methods). The *rpsL*+ PCR fragment had no impact on TC susceptibility levels when transformed alone (Table 3). Each reconstructed strain was then tested for resistance to TC, CIP and EtBr in the presence and absence of reserpine. The introduction of the *rpsJ* alleles from R6M1TC-1 (harboring a G178T mutation) or R6M2TC-4 (harboring a A169G mutation) into *S. pneumoniae* R6 WT increased the TC MIC four-fold in the *S. pneumoniae* R6^{rpsJ(R6M1TC-1)} and *S. pneumoniae* R6^{rpsJ(R6M2TC-1)} transformants (Table 3). Interestingly, the *rpsJ* allele from R6M1TC-5 was more potent at conferring resistance to TC than the one from R6M1TC-1 (compare R6^{rpsJ(R6M1TC-1)} and R6^{rpsJ(R6M1TC-5})</sup> in Table 3), which is consistent with their chronological order of appearance during the selection of the R6M1TC series of mutants (Table 3). To exclude the possibility of secondsite mutations introduced during the transformation, we reintroduced the wild-type *rpsJ* allele in the *S. pneumoniae* R6^{rpsJ(R6M1TC-1)} and R6^{rpsJ(R6M1TC-5)} transformants and these cells became more sensitive to TC (see R6^{rpsJ(R6M1TC-1)-rev(R6WT)-rpsL+} and R6^{rpsJ(R6M1TC-5)-rev(R6WT)-} rpsL+ in Table 3).

The *patA* allele from R6M1TC-5 also accounted for a four-fold increase in resistance to TC in the *S. pneumoniae* R6^{patA(R6M1TC)} transformant (Table 3), of which half is attributable to the G-35A mutation in the promoter region (R6^{p_patA(R6M1TC)-rpsL+} in Table 3) and the other half to the G510A mutation within the gene (compare R6^{CDSpatA(R6M1TC)-rpsL+}, R6^{CDSpatA(G510A)(R6M1TC)-rpsL+} and R6^{CDSpatA(C883A)(R6M1TC)-rpsL+} in Table 3). The *patA* allele from R6M2TC-4 was less effective at increasing TC resistance however, as it could only doubled the TC MIC of the *S. pneumoniae* R6^{patA(R6M2TC)} transformant (Table 3). As expected, TC resistance conferred by the *patA* mutations, but not by the *rpsJ* alleles, was reversible by reserpine (Table 3). Resistance to CIP and EtBr for both mutants (Table 3). As a final proof of the role of *patA* in resistance we introduced the wild-type version of *patA* in *S. pneumoniae* R6^{patA-patB(R6M2TC)} which became more sensitive to TC (see R6^{patA-patB(R6M2TC)-rev(patA)-rpsL+} in Table 3).

Gene inactivation experiments further confirmed the role of the variant *patA* alleles in the resistance of R6M1TC-5 and R6M2TC-4 (Table 4). Inactivation of the gene coding for the ABC transporter PatB also sensitized both mutants to TC and CIP, which is consistent with the finding that PatA and PatB act as heterodimers to extrude toxic compounds in *S. pneumoniae*. ⁴⁴ In contrast to *patA* however, no role in resistance could be attributed to the mutation selected in R6M2TC-4 in the coding region of *patB* (spr1885) by transformation into a TC susceptible *S. pneumoniae* background (Table 3).

Other strain specific mutations were observed in the mutants (Table 2). These were often, but not always, detected in the most resistant mutants but we could not, by gene transformation along with the rpsL+ allele, link any of these strain specific mutations with TC resistance (result not shown).

Decreased accumulation of TC in S. pneumoniae resistant mutants

Mutations upstream of *patA* have previously been linked to drug resistance in S. *pneumoniae* by inducing the overexpression of the transporter, ^{35, 45} although never for TC. Quantitative RT-PCR also confirmed that *patA* was overexpressed in the S. pneumoniae R6M1TC-5 and R6M2TC-4 mutants and introducing the G-35A and G-48A mutations in a S. pneumoniae R6 wild-type background confirmed that these were indeed responsible for *patA* overexpression (Table 4). As mutations in the coding regions of *patA* were also shown to contribute to TC (Table 3) and CIP (Table 3 and by Lupien and coworkers ³²) resistance, TC accumulation experiments were conducted to directly address to role of both types of mutations (i.e. promoter vs coding region) on the transport capacity of the PatA/PatB heterodimer. S. pneumoniae R6M1TC-5 and R6M2TC-4 accumulated less H³-TC than the parental S. pneumoniae R6 WT (p-value ≤ 0.05) (Figure 1A). This is directly linked to the presence of *patA* variants as *S. pneumoniae* R6^{patA(R6M1TC)} and R6^{patA-patB(R6M2TC)} harboring promoter and coding region mutations derived from R6M1TC-5 and R6M2TC-4, respectively, displayed the same reduced accumulation of H³-TC as the original mutants (Figure 1B, C). Interestingly, while mutations in the promoter of *patA* and in its coding region conferred resistance to TC when introduced on their own in S. pneumoniae R6 WT (Table 3), only the mutations in the promoter region were responsible for the decreased accumulation of TC in the mutants (*p*-value ≤ 0.05) (Figure 1B, C). The addition of reserpine, an inhibitor of efflux pumps, ^{29, 46} restored the accumulation of TC in the S. pneumoniae R6^{patA(R6M1TC)} and R6^{patA-patB(R6M2TC)} transformants (Figure 1D).

RNA expression profiling in TC mutants

The *rpsJ* and *patA* mutations could only partly explain the levels of TC resistance of *S. pneumoniae* R6M1TC-5 and R6M2TC-4 (Table 3) and none of the other mutations identified in the genome of the mutants (Table 2) conferred resistance to TC when introduced into *S. pneumoniae* R6 WT (not shown). We therefore hypothesized that

resistance to TC could also involve differences in gene expression (as in the case of *patA/patB*) and performed comparative gene expression profiling between the R6M1TC-5 and R6M2TC-4 mutants and their susceptible *S. pneumoniae* R6 WT parent by RNAseq. Overall, 43 and 60 genes were found to be significantly overexpressed (*p*-value \leq 0.015) in the R6M1TC-5 and R6M2TC-4 mutants compared to R6 WT, respectively (Figure 2 and Table S3). Moreover, 31 and 26 genes had their expression significantly decreased (*p*-value \leq 0.015) in R6M1TC-5 and R6M2TC-4 compared to R6 WT, respectively (Figure 2 and Table S3). Overall, 13 overexpressed and 14 downregulated genes were common to both mutants (Table S3).

Clustering differentially expressed genes according to their ontology revealed that genes overexpressed in S. pneumoniae R6M1TC-5 were enriched for biological processes involving thiamine metabolism (Figure 3). For S. pneumoniae R6M2TC-4, genes identified as overexpressed by RNAseq were enriched mainly for processes implicated in carbohydrates metabolism and transport functions (Figure 3) and were not directly linked to the metabolism of thiamine. Nonetheless, a thorough examination of the RNAseq data revealed that the expression of most genes related to thiamine metabolism overexpressed in R6M1TC-5 were also increased in R6M2TC-4 when the cutoff p-value for filtering differentially expressed genes was loosened to $p \le 0.05$. Quantitative RT-PCR later confirmed that genes spr0632, spr0634, spr0637 and spr0638, all involved in thiamine metabolism (See Figure S1) were indeed overexpressed in both mutants (Table 4). The expression of the spr0632 gene was further tested by qRT-PCR in 10 clinical isolates of S. pneumoniae (5 sensitive and 5 resistant). Interestingly, an increased expression of spr0632 was observed in two resistant clinical isolates and in none of the sensitive ones (Table 5). Downregulated genes also clustered in GO terms shared by the two TC-resistant mutants (biological processes implicated in alcohol/polyol/glycerol or organophosphate metabolism) (Figure 3).

In addition to its central role in intermediary metabolism, vitamin B1 (i.e. thiamine) has also been reported to act as an important stress-response molecule against oxidative or osmotic stress in bacteria, ^{47, 48} plants ^{49, 50} and fungi. ⁵¹ Interestingly, a triphosphorylated

derivative of vitamin B1, namely thiamine triphosphate, was shown to act as an alarmone initiating a reaction cascade involved in the adaptation of bacteria to stringent conditions such as amino acid starvation. ⁵² As the inhibition of translation by tetracycline should mimic amino acid starvation, we hypothesized that the overexpression of genes linked to thiamine metabolism in R6M1TC-5 and R6M2TC-4 could also have a role in favoring resistance to TC. The gene spr0632 is overexpressed in R6M1TC-5 and R6M2TC-4 and codes for the ATPase subunit of an ABC transporter putatively involved in the transport of HMP from the extracellular milieu (Figure S1). The inactivation of spr0632 by insertionduplication mutagenesis decreased the level of TC resistance of R6M1TC-5 and R6M2TC-4 by two and four fold, respectively (Table 4). A two-fold sensitization to TC was also observed upon inactivation of spr0632 in the clinical isolate CCRI 22087 initially overexpressing the gene, but not in the clinical isolate CCRI 18414 not overexpressing spr0632 (Table 5). We were incapable to transform strain CCRI 14774 which also had overexpression of spr0632 (Table 5). This is consistent with the lack of TC sensitization upon inactivation of spr0632 in S. pneumoniae R6 WT (Table 4 and Table5) and suggests that the overexpression of the gene is required for its contribution in resistance. In the case of R6M2TC-4, the inactivation of spr0632 also sensitized to CIP (data not shown). The inactivation of spr0634 and spr0638, coding for a thiaminase and for a phosphomethylpyrimidine kinase in the thiamine biosynthesis pathway (Figure S1), also affected the level of TC susceptibility but this time specifically in R6M2TC-4 (Table 4), which suggests that overexpression of some genes of the HMP salvage pathway is associated with TC resistance.

Discussion

The selection of the S. pneumoniae TC-resistant mutants R6M1TC-5 and R6M2TC-4 from S. pneumoniae R6 WT (which lacks tet(M) or tet(O)) by incremental increases in TC concentrations revealed the possibility for S. pneumoniae to become resistant to TC through genomic alterations. For both mutants, the first event selected occurred at the level of the gene *rpsJ* coding for ribosomal protein S10. Based on the crystal structure of the 30S ribosomal subunit from *Thermus thermophilus* cross-linked with TC, ⁵³ the mutations in the R6M1TC-5 and R6M2TC-4 mutants are all located in the vertex loop of ribosomal protein S10. This loop is composed of 50-60 amino acids and is located near the primary site of action of TC, i.e. the aminoacyl-tRNA site. ¹⁷ As previously proposed, amino acid changes located in the vicinity of this site could decrease the affinity for the antibiotic by altering the rRNA structure near the TC-binding site. 53 Interestingly, the amino acid from ribosomal protein S10 the nearest to the primary site in T. thermophilus (lysine-55) was found to be within 8 to 9 Ä of bound TC ^{24, 53} and the equivalent residue is mutated in R6M2TC-4 (K57E). Substitutions at homologous residues were also previously observed and implicated in TC resistance in high-level resistant Neisseria gonorrhoeae, 24 confirming the importance of endogenous mutations near the ribosomal aminoacyl-tRNA site for TC resistance in the absence of *tet* genes.

Multidrug efflux pumps are important contributors of resistance to antimicrobials and the *S. pneumoniae* multidrug ABC transporter PatA/B had already been implicated in resistance to EtBr, berberine, novobiocine, acriflavin, erythromycin, fluoroquinolones, chloramphenicol and linezolid. ^{35, 54} A phenotypic microarray screening for 240 compounds against a panel of *S. pneumoniae* mutants inactivated for putative efflux pumps also identified PatA/PatB as a possible contributor to oxytetracycline resistance, but this was not further validated by an additional quantitative method like microdilution MIC. ⁵⁵ Here we provide such evidence with *S. pneumoniae* transformants for which the introduction of a mutation upstream of *patA* facilitates the transcription of the PatA/PatB genes to foster resistance to TC by decreasing its accumulation, most likely by increased efflux. While several other bacterial ABC transporters have been shown to confer resistance to

structurally dissimilar compounds, including TC and fluoroquinolones, ^{25-27, 56} this is the first time that a reduced accumulation of TC mediated by such transporter is directly measured. The mutation in the promoter region of *patA* most likely increases transcription rates by loosening a terminator-like structure upstream of the gene. It was recently proposed that mutations upstream of *patA* could lead to its overexpression by altering the strength of a terminator-like stem-loop structure in the 5' UTR of patA. 45, 57 Also, constitutive overexpression of *patAB* in fluoroquinolones resistants isolates may be caused by mutations in a Rho-independent transcriptional terminator structure located upstream of patA gene.⁵⁷ An analysis of the DNA sequence upstream of patA using RibEx ⁵⁸ indeed suggested the presence of three stem-loop structures (a transcriptional terminator, an antiterminator and an anti-antiterminator structure) in S. pneumoniae R6 (Figure S2). Interestingly, the strength (ΔG) of the transcriptional terminator stem-loop structure is decreased by the presence of the mutations detected upstream of *patA* in R6M1TC-5 and R6M2TC-4 mutants (Figure S2) suggesting that these alterations are responsible for the increase in *patA* transcription (Table 4). Similarly, small deletions impeding with the formation of a transcriptional attenuator upstream of tet(M) have been shown to increase its transcription rate in S. pneumoniae clinical isolates unsusceptible to TC. 59 In S. pneumoniae. TC resistance conferred by ribosomal protection proteins such as Tet(M) would lead to an excess of unbound TC and overexpressing the chromosomally encoded PatA/PatB efflux pump may be exploited by the pneumococcus to efflux the excess TC. It would thus be interesting to assess whether *patA/patB* overexpression also occur in S. pneumoniae clinical isolates resistant to TC due to the presence of mobile elements of the Tn916 family.

Mutations in the coding region of *patA* also contributed to resistance to TC and CIP (Table 2), possibly by altering the specificity of the transporter. A TMHMM analysis of the PatA sequence revealed that every mutation observed in R6M1TC-5 and R6M2TC-4 was located in transmembrane domains (TM). A comparison with the crystal structure of the bacterial ABC exporter SAV1866 from *Staphylococcus aureus* ⁶⁰ also supported the location of mutation M170I within TM4 and the location of mutations G287E and R295S within TM6. Residues from transmembrane helices TM1, TM4–TM6 and TM10–TM12 in

the homologous human MDR1 have been shown to interact with the substrates of the transporter. ⁶¹ Unfortunately, no well-defined substrate binding sites have been identified for bacterial ABC exporters ^{62, 63} to hypothesize more precisely about the role of these mutations on the activity of the transporter. Nonetheless, it is intriguing that for both R6M1TC-5 and R6M2TC-4 mutants, a single mutation in the coding region of *patA* enhanced resistance against structurally different molecules. Mutations affecting substrate specificity have also been reported previously for other multidrug efflux pumps. ^{64, 65} These mutations can possibly alter the tertiary structure of the transporter and thereby modulate the substrate profile or provide additional substrate binding sites relevant for the recognition of a given substrate.

The expression profile of R6M1TC-5 and R6M2TC-4 has highlighted that gene expression alterations others than the overexpression of *patA/patB* can foster resistance to TC (Figure 2 and Table S3). Comparative expression profiling by RNAseq and qRT-PCR indeed revealed that key genes involved in the salvage of HMP in the thiamine biosynthesis pathway were overexpressed in the R6M1TC-5 and R6M2TC-4 mutants (Tables 4 and S3 and Figure S1). This appears to be coherent with resistance to TC since the inactivation of spr0632, which is responsible for the uptake of HMP from the extracellular milieu, increased TC susceptibility in both mutants. Interestingly, increased expression of thiamine metabolism gene was also observed in clinical isolates resistant to TC. An increased expression of spr0632 could be detected in two TC-resistant pneumococcal isolates but in none of the sensitive isolates tested (Table 5). While the number of isolates tested is small, these results indicates that the expression of thiamine metabolism genes can be increased in clinical isolates and further work will undoubtedly help refining our understanding of the clinical significance between thiamine metabolism and resistance to TC. The inactivation of the spr0632 gene in one TC resistant clinical isolate reduced its resistance to TC. The activity of several enzymes of carbohydrate metabolism such as pyruvate dehydrogenase, 2-oxoglutarate dehydrogenase and transketolase requires thiamine pyrophosphate as a cofactor. ⁶⁶ Resistance to TC may require increased energetic needs which would translate into a higher thiamine demand from these enzymes. Alternatively, thiamine derivatives have been shown to act as signals involved in the adaptation of bacteria to stressful

conditions ^{52, 67} and it will be interesting to conduct metabolomics studies with extracts derived from mutants R6M1TC-5 and R6M2TC-4 to fully understand the changes happening in the thiamine biosynthesis pathway.

Overall, the combined use of whole genome sequencing, RNAseq and functional analyses revealed that endogenous TC resistance mechanisms can be selected in *S. pneumoniae* in the absence of tet(M) and tet(O). One early mutation is the S10 ribosomal protein but the clinical relevance of antibiotic efflux mediated by the ABC transporter PatA/PatB in *S. pneumoniae* was reiterated by the demonstration that the overexpression of this transporter can foster resistance to TC in addition to resistance to fluoroquinolones ^{30-32, 44} and linezolid. ³⁵ A novel link between thiamine metabolism and resistance to TC was also revealed.

Acknowledgements

We thank the McGill University Genome Quebec Innovation Centre for performing the sequencing of R6M1TC-5 and R6M2TC-4 mutants. Les bourses d'Andréanne et mon CRC.

Funding

This work was supported by a Canadian Institutes of Health Research grant to M. O.

Transparency declarations

The authors declare that they have no competing interests.

Author contributions

AL, PL and MO conceived and designed the experiments. AL and HG performed the experiments. AL and PL conducted the bioinformatics analyses of the data. AL and PL wrote the paper (with contributions from all of the authors). All authors have read and approved the manuscript for publication.

Supplementary data

Table S1: list of strains and plasmids used in this study

Table S2: list of primers used in this study

Table S3: genes lists of differentially expressed genes (*p*-value ≤ 0.015) in R6M1TC-5 and R6M1TC-4 compared to R6 according to RNAseq

Figure S1: schematic representation of the thiamine biosynthesis pathway genes altered in R6 TC resistant mutants.

Figure S2: schematic representation of the predicted structure upstream of *patA* by RibEx.

References

1. Levine OS, O'Brien KL, Knoll M et al. Pneumococcal vaccination in developing countries. *Lancet* 2006; **367**: 1880-2.

2. McGee L, McDougal L, Zhou J et al. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. *Journal of clinical microbiology* 2001; **39**: 2565-71.

3. Hansman D. BMM. A resistant pneumococcus. *Lancet* 1967; **290**: Pages 264–5.

4. Parra EL, Ramos V, Sanabria O et al. Serotype and Genotype Distribution among Invasive Streptococcus pneumoniae Isolates in Colombia, 2005-2010. *PloS one* 2014; **9**: e84993.

5. Zhou L, Ma X, Gao W et al. Molecular characteristics of erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from pediatric patients younger than five years in Beijing, 2010. *BMC microbiology* 2012; **12**: 228.

6. Montanari MP, Cochetti I, Mingoia M et al. Phenotypic and molecular characterization of tetracycline- and erythromycin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2003; **47**: 2236-41.

7. Sa-Leao R, Tomasz A, Sanches IS et al. Carriage of internationally spread clones of *Streptococcus pneumoniae* with unusual drug resistance patterns in children attending day care centers in Lisbon, Portugal. *The Journal of infectious diseases* 2000; **182**: 1153-60.

8. Jones RN, Sader HS, Moet GJ et al. Declining antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in the United States: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2009). *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2010; **68**: 334-6.

9. Wyres KL, van Tonder A, Lambertsen LM et al. Evidence of antimicrobial resistance-conferring genetic elements among pneumococci isolated prior to 1974. *BMC genomics* 2013; **14**: 500.

10. Kim SH, Song JH, Chung DR et al. Changing trends in antimicrobial resistance and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asian countries: an Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) study. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2012; **56**: 1418-26.

11. Johnson JR. Doxycycline for treatment of community-acquired pneumonia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2002; **35**: 632; author reply -3.

12. Izdebski R, Sadowy E, Fiett J et al. Clonal diversity and resistance mechanisms in tetracycline-nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* isolates in Poland. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2007; **51**: 1155-63.

13. Lederman ER, Gleeson TD, Driscoll T et al. Doxycycline sensitivity of *S. pneumoniae* isolates. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2003; **36**: 1091.

14. Connell SR, Tracz DM, Nierhaus KH et al. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2003; **47**: 3675-81.

15. Yang W, Moore IF, Koteva KP et al. TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics. *The Journal of biological chemistry* 2004; **279**: 52346-52.

16. Nguyen F, Starosta AL, Arenz S et al. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biological chemistry* 2014.

17. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 2001; **65**: 232-60 ; second page, table of contents.

18. Doherty N, Trzcinski K, Pickerill P et al. Genetic diversity of the tet(M) gene in tetracycline-resistant clonal lineages of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2000; **44**: 2979-84.

19. Widdowson CA, Klugman KP. The molecular mechanisms of tetracycline resistance in the pneumococcus. *Microb Drug Resist* 1998; **4**: 79-84.

20. Widdowson CA, Klugman KP, Hanslo D. Identification of the tetracycline resistance gene, tet(O), in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1996; **40**: 2891-3.

21. Donhofer A, Franckenberg S, Wickles S et al. Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012; **109**: 16900-5.

22. Wu JY, Kim JJ, Reddy R et al. Tetracycline-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates with and without mutations in 16S rRNA-encoding genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2005; **49**: 578-83.

23. Dailidiene D, Bertoli MT, Miciuleviciene J et al. Emergence of tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*: multiple mutational changes in 16S ribosomal DNA and other genetic loci. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2002; **46**: 3940-6.

24. Hu M, Nandi S, Davies C et al. High-level chromosomally mediated tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* results from a point mutation in the rpsJ gene encoding ribosomal protein S10 in combination with the mtrR and penB resistance determinants. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2005; **49**: 4327-34.

25. Huda N, Lee EW, Chen J et al. Molecular cloning and characterization of an ABC multidrug efflux pump, VcaM, in Non-O1 *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2003; **47**: 2413-7.

26. Al-Hamad A, Upton M, Burnie J. Molecular cloning and characterization of SmrA, a novel ABC multidrug efflux pump from *Stenotrophomonas maltophilia*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2009; **64**: 731-4.

27. Matsuo T, Chen J, Minato Y et al. SmdAB, a heterodimeric ABC-Type multidrug efflux pump, in *Serratia marcescens. Journal of bacteriology* 2008; **190**: 648-54.

28. Avrain L, Garvey M, Mesaros N et al. Selection of quinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* exposed in vitro to subinhibitory drug concentrations. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2007; **60**: 965-72.

29. Garvey MI, Piddock LJ. The efflux pump inhibitor reserpine selects multidrugresistant *Streptococcus pneumoniae* strains that overexpress the ABC transporters PatA and PatB. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2008; **52**: 1677-85.

30. El Garch F, Lismond A, Piddock LJ et al. Fluoroquinolones induce the expression of patA and patB, which encode ABC efflux pumps in *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2010; **65**: 2076-82.

31. Garvey MI, Baylay AJ, Wong RL et al. Overexpression of patA and patB, which encode ABC transporters, is associated with fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011; **55**: 190-6.

32. Lupien A, Billal DS, Fani F et al. Genomic Characterization of Ciprofloxacin Resistance in a Laboratory-Derived Mutant and a Clinical Isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2013; **57**: 4911-9.

33. Fani F, Brotherton MC, Leprohon P et al. Genomic analysis and reconstruction of cefotaxime resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2013; **68**: 1718-27.

34. Fani F, Leprohon P, Legare D et al. Whole genome sequencing of penicillinresistant *Streptococcus pneumoniae* reveals mutations in penicillin-binding proteins and in a putative iron permease. *Genome biology* 2011; **12**: R115.

35. Feng J, Lupien A, Gingras H et al. Genome sequencing of linezolid-resistant *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals novel mechanisms of resistance. *Genome research* 2009; **19**: 1214-23.

36. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014.

37. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)* 2009; **25**: 1754-60.

38. Li H, Handsaker B, Wysoker A et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009; **25**: 2078-9.

39. Billal DS, Feng J, Leprohon P et al. Whole genome analysis of linezolid resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals resistance and compensatory mutations. *BMC genomics* 2011; **12**: 512.

40. Trapnell C, Roberts A, Goff L et al. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature protocols* 2012; **7**: 562-78.

41. Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 2005; **21**: 3674-6.

42. McMurry L, Levy SB. Two transport systems for tetracycline in sensitive *Escherichia coli*: critical role for an initial rapid uptake system insensitive to energy inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1978; **14**: 201-9.

43. Dallas SD, McGee L, Limbago B et al. Development of doxycycline MIC and disk diffusion interpretive breakpoints and revision of tetracycline breakpoints for *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of clinical microbiology* 2013; **51**: 1798-802.

44. Boncoeur E, Durmort C, Bernay B et al. PatA and PatB Form a Functional Heterodimeric ABC Multidrug Efflux Transporter Responsible for the Resistance of *Streptococcus pneumoniae* to Fluoroquinolones. *Biochemistry* 2012; **51**: 7755-65.

45. Croucher NJ, Mitchell AM, Gould KA et al. Dominant role of nucleotide substitution in the diversification of serotype 3 pneumococci over decades and during a single infection. *PLoS genetics* 2013; **9**: e1003868.

46. Schmitz FJ, Fluit AC, Luckefahr M et al. The effect of reserpine, an inhibitor of multidrug efflux pumps, on the in-vitro activities of ciprofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 1998; **42**: 807-10.

47. Jung IL, Kim IG. Thiamine protects against paraquat-induced damage: scavenging activity of reactive oxygen species. *Environmental toxicology and pharmacology* 2003; **15**: 19-26.

48. Fukui K, Wakamatsu T, Agari Y et al. Inactivation of the DNA repair genes mutS, mutL or the anti-recombination gene mutS2 leads to activation of vitamin B1 biosynthesis genes. *PloS one* 2011; **6**: e19053.

49. Tunc-Ozdemir M, Miller G, Song L et al. Thiamin confers enhanced tolerance to oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 2009; **151**: 421-32.

50. Rapala-Kozik M, Wolak N, Kujda M et al. The upregulation of thiamine (vitamin B1) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* seedlings under salt and osmotic stress conditions is mediated by abscisic acid at the early stages of this stress response. *BMC plant biology* 2012; **12**: 2.

51. Kowalska E, Kujda M, Wolak N et al. Altered expression and activities of enzymes involved in thiamine diphosphate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* under oxidative and osmotic stress. *FEMS yeast research* 2012; **12**: 534-46.

52. Lakaye B, Wirtzfeld B, Wins P et al. Thiamine triphosphate, a new signal required for optimal growth of *Escherichia coli* during amino acid starvation. *The Journal of biological chemistry* 2004; **279**: 17142-7.

53. Brodersen DE, Clemons WM, Jr., Carter AP et al. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* 2000; **103**: 1143-54.

54. Robertson GT, Doyle TB, Lynch AS. Use of an efflux-deficient *Streptococcus pneumoniae* strain panel to identify ABC-class multidrug transporters involved in intrinsic resistance to antimicrobial agents. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2005; **49**: 4781-3.

55. Tocci N, Iannelli F, Bidossi A et al. Functional analysis of pneumococcal drug efflux pumps associates the MATE DinF transporter with quinolone susceptibility. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2013; **57**: 248-53.

56. Fernandez-Moreno MA, Carbo L, Cuesta T et al. A silent ABC transporter isolated from *Streptomyces rochei* F20 induces multidrug resistance. *Journal of bacteriology* 1998; **180**: 4017-23.

57. Baylay AJ, Piddock LJ. Clinically relevant fluoroquinolone resistance due to constitutive overexpression of the PatAB ABC transporter in *Streptococcus pneumoniae* is conferred by disruption of a transcriptional attenuator. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2014.

58. Abreu-Goodger C, Merino E. RibEx: a web server for locating riboswitches and other conserved bacterial regulatory elements. *Nucleic acids research* 2005; **33**: W690-2.

59. Grohs P, Trieu-Cuot P, Podglajen I et al. Molecular basis for different levels of tet(M) expression in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2012; **56**: 5040-5.

60. Dawson RJ, Locher KP. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* 2006; **443**: 180-5.

61. Loo TW, Clarke DM. Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux. *The Journal of membrane biology* 2005; **206**: 173-85.

62. Higgins CF, Linton KJ. The ATP switch model for ABC transporters. *Nature structural & molecular biology* 2004; **11**: 918-26.
63. Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* 2007; **446**: 749-57.

64. Bohnert JA, Schuster S, Fahnrich E et al. Altered spectrum of multidrug resistance associated with a single point mutation in the *Escherichia coli* RND-type MDR efflux pump YhiV (MdtF). *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2007; **59**: 1216-22.

65. Vettoretti L, Plesiat P, Muller C et al. Efflux unbalance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2009; **53**: 1987-97.

66. Du Q, Wang H, Xie J. Thiamin (vitamin B1) biosynthesis and regulation: a rich source of antimicrobial drug targets? *International journal of biological sciences* 2011; **7**: 41-52.

67. Bettendorff L, Wirtzfeld B, Makarchikov AF et al. Discovery of a natural thiamine adenine nucleotide. *Nature chemical biology* 2007; **3**: 211-2.

Tables

Table 1. Minimal inhibitory concentration (MICs) of TC-resistant strains used in this study.

	MICs (ug/mL) ^a							
	TC	TC+R	CIP	CIP+R	EtBr	EtBr+R	TGC	TGC+R
R6	0.125	0.125	0.5	0.5	2	0.125	0.031	0.031
R6M1TC-1	2	1	1	0.5	8	0.25	0.063	0.063
R6M1TC-2	2	1	2	0.5	8	0.25	0.063	0.063
R6M1TC-3	4	1	4	0.5	8	0.25	0.063	0.063
R6M1TC-4	4	1	4	0.5	16	0.25	0.063	0.063
R6M1TC-5	8	2	4	0.5	16	0.25	0.25	0.25
R6M2TC-1	2	1	1	0.5	2	0.25	0.063	0.063
R6M2TC-2	2	1	1	0.5	2	0.25	0.063	0.063
R6M2TC-3	4	1	4	0.5	16	0.25	0.125	0.125
R6M2TC-4	8	1	8	0.5	16	0.25	0.125	0.125

^aCIP, ciprofloxacin; Etbr, ethidium bromide; R, reserpine (20ug/mL); TC, tetracycline; TGC, tigecycline. MICs are the results of three independents triplicates.

Locus	Function ^a						Mutations	b,c,d		
ID ^a				R6M1TC				R6N	12TC	
		1 ^e	2^{f}	3 ^g	4 ^h	5	1 ⁱ	2 ^j	3 ^k	4
spr0187	30S ribosomal protein S10	<u>G178T</u> <u>D60Y</u>	<u>G178T</u> <u>D60Y</u>	<u>G178T</u> <u>D60Y</u>	<u>G178T</u> <u>D60Y</u>	<u>C157T</u> <u><i>R53C</i> Δ175- 180</u>	<u>A169G</u> <u>K57E</u>	<u>A169G</u> <u>K57E</u>	<u>A169G</u> <u>K57E</u>	<u>A169G</u> <u>K57E</u>
spr0219	phosphoglycerate mutase	WT	WT	WT	WT	T-52C	WT	WT	WT	WT
spr0291	PTS system IIA component	WT	WT	WT	WT	WT	C- 101G	C- 101G	C- 101G	C- 101G T-30C
spr0691	biotin synthase	WT	WT	WT	WT	WT	G356T <i>A119D</i>	G356T <i>A119D</i>	G356T <i>A119D</i>	G356T <i>A119D</i>
spr0822	agmatine deiminase	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	A95C Stop \triangleright S position 32
spr0825	hypothetical protein	G-61A	G-61A	G-61A	G-61A	G-61A	WT	WT	WT	WT
spr0960	positive transcriptional regulator MutR	WT	WT	WT	WT	A-151C	WT	WT	WT	WT
spr1262	transcriptional regulator Spx	WT	WT	T-11C	T-11C	T-11C	WT	WT	WT	WT
spr1377	cystathionine gamma-synthase	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	T290 C <i>A97V</i>
spr1777	DNA-directed RNA polymerasesubunit beta	WT	WT	WT	WT	C1442T Syn	WT	WT	WT	WT
spr1885	ABC transporter ATP-binding protein/permease	WT	WT	WT	WT	WT	WT	G794A G265E	G794A G265E	G794A G265E
spr1887	ABC transporter ATP-binding protein/permease	<u>G-35A</u>	<u>G-35A</u> C883A (<i>R295S</i>)	<u>G-35A</u> <u>G510A</u> <u>M170I</u> C883A <i>R295S</i>	<u>G-35A</u> <u>G510A</u> <u>M170I</u> C883A <i>R295S</i>	<u>G-35A</u> <u>G510A</u> <u>M170I</u> C883A R295S	WT	WT	<u>G-48A</u>	<u>G-48A</u> <u>G860A</u> <u>G287E</u>
spr1991	Glycerol kinase	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	ΔG position 75

Table 2. Chronological appearance of mutations in TC mutants.

^a ID, identity. Nomenclature according to the genome annotation of *S. pneumoniae* R6. ^b When mutations are within coding regions, the change in amino acids is also indicated in italics.

^c In noncoding sequence, the number preceded by a hyphen indicates the position upstream of the ATG.

^d Mutations in bold were further studied to determine their potential role in TC resistance and mutations underlined are involved in drugs resistances (TC, CIP, Etbr)

^e1 clone was sequenced. Unique mutations: spr1138(C443A)

^f1 clone was sequenced. Unique mutations: spr0428(G250A); spr0857(G1298T)

^g: 2 clones were sequenced. Unique mutations: spr0313(A195G); spr1032(G1216T); spr1367(C511A); spr1865(G224A); spr2035(G-72A)

^h: 2clones were sequenced. Unique mutations: spr0294(T111C) ⁱ: 2 clones were sequenced. Unique mutations: spr0661(G896T)spr0797: 458bp downstream

^j 2 clones were sequenced. Unique mutations: spr0661(G896T,A); spr1250(spr1250)

^k 2 clones were sequences. Unique mutations: spr0232(G191A)

Table 3.	Functional	analysis o	of S.pneum	oniae R6	containing	mutations	s in R6M	1TC-5 and
R6M2TC	C -4 .							

	Mutated alleles				MIC (ug/mL) ^{b,c}					
Strains ^a	rpsJ	-	patA	patB	TC	TC+R	CIP	CIP+R	Etbr	Etbr+R
		promotor	CDS							
R6	WT	WT	WT	WT	0.125	0.125	0.5	0.5	2	0.25
R6 ^{rpsL+}	WT	WT	WT	WT	0.125	0.125	0.5	0.5	2	0.25
R6M1TC-5	R6M1TC- 5	R6M1TC- 5	R6M1TC-5	WT	8	2	4	0.5	16	0.25
R6M2TC-4	R6M2TC- 4	R6M2TC- 4	R6M2TC-4	R6M2TC- 4	8	1	8	0.5	16	0.25
R6 ^{rpsJ(R6M1TC-1)}	R6M1TC- 1	WT	WT	WT	0.5	0.5	0.5	0.5	2	0.25
R6 ^{rpsJ(R6M1TC-1)-rpsL+}	R6M1TC- 1	WT	WT	WT	0.5	ND	0.5	ND	ND	ND
R6 ^{rpsJ(R6M1TC-1)-} rev(R6WT)-rpsL+	WT	WT	WT	WT	0.125	ND	0.5	ND	ND	ND
R6 ^{rpsJ(R6M1TC-5)}	R6MITC- 5	WT	WT	WT	1	1	0.5	0.5	2	0.25
R6 ^{rpsJ(R6M1TC-5)-} rpsL+	R6MITC- 5	WT	WT	WT	1	ND	0.5	ND	ND	ND
R6 ^{rpsJ} (R6M1TC-5)- rev(R6WT)- rpsL+	WT	WT	WT	WT	0.125	ND	0.5	ND	ND	ND
R6 ^{patA(R6M1TC)}	WT	R6M1TC- 5	R6M1TC-5	WT	0.5	0.125	2	0.5	16	0.25
R6 ^{p_patA(R6M1TC)-rpsL+}	WT	R6M1TC- 5	WT	WT	0.25	0.125	1	0.5	8	0.25
R6 ^{CDSpatA(R6M1TC)-rpsL+}	WT	WT	R6M1TC-5	WT	0.25	0.125	1	0.5	8	0.25
R6 ^{CDSpatA(G510A)(R6M1TC)-} rpsL+	WT	WT	R6M1TC(G510A)	WT	0.25	0.125	1	0.5	4	0.25
R6 ^{CDSpatA(C883A)(R6M1TC)-} rpsL+	WT	WT	R6M1TC(C883A)	WT	0.125	0.125	1	0.5	8	0.25
R6 ^{rpsJ(R6M1TC)-} patA(R6M1TC)	R6M1TC- 5	R6M1TC	R6M1TC-5	WT	2	0.5	2	0.5	16	0.25
R6 ^{rpsJ(R6M2TC)}	R6M2TC- 4	WT	WT	WT	0.5	0.5	0.5	0.5	2	0.25
R6 ^{patA-patB(R6M2TC)}	WT	R6M2TC- 4	R6M2TC-4	R6M2TC- 4	0.25	0.125	1	0.5	16	0.25
R6 ^{patA-patB(R6M2TC)-rpsL+}	WT	R6M2TC- 4	R6M2TC-4	R6M2TC- 4	0.25	ND	1	ND	ND	ND
R6patA-patB(R6M2TC)- rev(patA)-rpsL+	WT	WT	WT	R6M2TC- 4	0.125	ND	0.5	ND	ND	ND
R6 ^{p_patA(R6M2TC)-rpsL+}	WT	R6M2TC- 4	WT	WT	0.25	0.125	1	0.5	8	0.25
R6 ^{CDSpatA(R6M2TC)-rpsL+}	WT	WT	R6M2TC-4	WT	0.25	0.125	1	0.5	4	0.25
R6 ^{CDSpatB(R6M2TC)-rpsL+}	WT	WT	WT	R6M2TC- 4	0.125	0.125	0.5	0.5	2	0.25
R6 ^{CDSpatA-patB(R6M2TC)-} dhfr+	WT	WT	R6M2TC-4	R6M2TC- 4	0.25	0.125	1	0.5	8	0.25

R6 ^{rpsJ(R6M2TC)-} patA(R6M2TC)	R6M2TC- 4	R6M2TC- 4	R6M2TC-4	WT	0.5	0.25	2	0.5	16	0.25
R6 rpsJ(R6M2TC)- patA(R6M2TC)-patB(R6M2TC)	R6M2TC- 4	R6M2TC- 4	R6M2TC-4	R6M2TC- 4	0.5	0.25	2	0.5	16	0.25

^a*rpsL*+and *dhfr*+ indicates an allele conferring resistance to streptomycin and trimethoprim, respectively, that was co-transformed along with the PCR fragment of interest for selection purposes.

^b MICs in bold are significantly different from the parent strain without the mutation. ^cND, Not done.

 Table 4 Genes relative expression and functional inactivation

		Mean fold		
		expression		MIC TC
		compare to	Gene	$(\mu g/mL)$
Strains	Gene ^a	R6 ^b	inactivated ^a	c
R6		-	None	0.125
	patA	-	patA	0.125
	patB	-	patB	0.125
	spr0632	-	spr0632	0.125
	tenA	-	tenA	0.125
	thiD	-	thiD	0.125
	thiE	-	thiE	0.125
R6M1TC-5		-	None	8
	patA	6,031±3.647	patA	2
	patB	-	patB	4
	spr0632	4,334±1,048	spr0632	4
	tenA	5,597±0,997	tenA	8
	thiD	5,165±1,374	thiD	8
	thiE	$3,952\pm0,880$	thiE	8
	spr1021	$1,685\pm0,247$	spr1021	-
R6 ^{p_patA(R6M1TC)-}		-	None	
rpsL+				0.25
	patA	7,782±1,157	-	-
R6M2TC-4		-	None	8
	patA	$15,268\pm5,841$	patA	2
	patB	-	patB	2
	spr0632	8,325±2,587	spr0632	2
	tenA	6,616±1,513	tenA	2
	thiD	6,955±0,541	thiD	4
	thiE	4,381±0,570	thiE	-
	spr1021	1,548±0,199	spr1021	-
R6 ^{p_patA(R6M1TC)-}		-	None	
rpsL+				0.25
	patA	$11,426\pm3,034$	-	-

^a*patA*, spr1887; *patB*, spr1885; *tenA*, spr0634; *thiD*, spr0638: *thiE*; spr0637. ^bMean fold expression was measured using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) Gene expressions were normalized on the 16srRNA expression. The gene spr1021was used as a control.

^cInactivation of *patA* and *patB* were done as control. The MICs are the results of three independent replicates. MICs in bold are significantly different from the parent strain without the inactivated gene.

			enotyp	e ^c	Mean fold	MIC WT/MIC
Strains	Specimen source ^a	tetM	tet0	rps.J	spr0632	$\Delta spr0632$
				· · · ·		$(\mu g/mL)$
R6	ATCC, BAA-2555	-	-	WT	1	0.125/0.125
	1					
CCRI 14730	BAL ^o	-	+	WT	0,770±0,097	32/NA
CCRI 14774	Throat	+	-	WT	4,937±1,510	2/NA
CCRI 15711	Sinus	+	-	WT	$0,858\pm0,442$	2/NA
CCRI 18414	Nose	-	+	WT	0,950±0,467	16/16
CCRI 22087	Cerebrospinal fluid	+	-	WT	2,913±0,772	32/16
CCDI 55073	Despiratory treat			WT	0 705±0 260	0 125/NIA
CCRI 55075	Respiratory tract	-	-	W I	$0,793\pm0,300$	0.125/INA
CCRI 60827	Respiratory tract	-	-	WT	$0,6/1\pm0,315$	0.125/NA
CCRI 1974	NA	-	-	WT	$0,525\pm0,060$	0.125/NA
CCRI 9008	Sputum	NA	NA	NA	1,104±0,619	0.125/NA
CCRI 14598	Blood	NA	NA	NA	0,581±0,322	0.125/NA

Table 5 Expression of spr0632 in *S. pneumoniae* clinical isolates sensitive and resistant toTC.

^aAll clinical isolates are from Canada except for CCRI 1974 which is of unknown origin. ^bBAL, Broncho-alveolar lavage

^cPrimers used to amplified *tetM*, *tetO* and *rpsJ* are listed in Table S1. NA, Not available



Figure 1 Accumulation of TC in S. pneumoniae. (A) Accumulation of labeled TC was measured in *S. pneumoniae* R6 WT (circles), R6M1TC-5 (diamonds) and R6M2TC-4 (squares) at baseline and at 5 minutes intervals for a total of 20 minutes. (B) The role of mutations selected at the *patA* locus in R6M1TC-5 on accumulation of TC was assessed by comparing the accumulation of labeled TC in R6 WT (circles) R6^{patA(R6M1TC)} (empty diamonds), R6^{p_patA(R6M1TC)-rpsL+}(upward triangles) and R6^{CDSpatA(R6M1TC)-rpsL+} (downward triangles) for up to 20 minutes. (C) The role of mutations selected at the *patA* locus in R6M2TC-4 on accumulation of TC was assessed by comparing the accumulation of TC was assessed by comparing the accumulation of labeled TC in R6 WT (circles), R6^{patA-patB(R6M2TC)} (empty squares), R6^{p_patA(R6M2TC)-rpsL+} (upward triangles) and R6^{CDSpatA-patB(R6M2TC)-dhfr+} (downward triangles) for up to 20 minutes. Results represent the mean of three independent replicates. T-test was performed on normalized data at 10 and 20 minutes and the significance threshold set to *p*≤ 0.05. (D) Accumulation of TC in the presence of reserpine in R6 WT (circles), R6^{patA(R6M1TC)} (empty diamonds) and R6^{patA-patB(R6M2TC)} (empty squares). The arrow indicates the time point at which 20 mg/mL reserpine was added.



Figure 2 Gene expression alterations in S. pneumoniae TC resistant mutants. Gene expression was compared between *S. pneumoniae* R6 WT and (A) R6M1TC-5 or (B) R6M2TC-4 by RNAseq. The dots represent the 2043 genes from the S. pneumoniae R6 genome sorted in numerical order on the abscissa. Dots coloured in black, blue and grey represent overexpressed, downregulated and not significantly altered genes ($p \le 0.01$), respectively.

Α GO:0030529 ribonucl GO:0005840 ribo GO:0016491 oxidoreductase activi GO:0010181 FMN bindin GC:0008972 phosphomethylpytimidine kinase activity GC:0016417 hydroxyethythiazole kinase activity GC:0016456 cell redox homesotasis GC:1901070 guanosine-containing compound biosynthetic process GC:0006772 thiamine-containing compound metabolic process GC:0042723 thiamine-containing compound biosynthetic process GC:0042723 thiamine-containing compound biosynthetic process GC:0042733 glycerol-3-phosphate dehydrogenase complex GC:0009228 thiamine-biosynthetic process GC:00092393 glycerol-3-phosphate activity GC:00016773 phosphotransferses activity, actorol group as acceptor GC:0008444 CDP-diacylgycerol-3-phosphate 3-phosphate indivitransferase activity GC:0017169 CDP-alcohol phosphatersase activity GC:0017169 CDP-alcohol phosphatersase activity GC:0017169 CDP-alcohol phosphatersase activity GC:0017169 CDP-alcohol phosphatersase activity GC:0017169 CDP-alcohol phosphaters activity activity activity and transmembrane transporter activity GO:0008972 ph sphomethylpyrimidine kinase activity GO terms GO:0015141 carbohydrate transmembrane transporter activity rotein-N(PI)-phosphohistidine-sugar phosphotransferase activity transferase activity, transferring aldehyde or ketonic groups GO:0047473 D-alanine-poly(phosphorbibil) [gase activity GO:004802 transketolase activity GO:0008982 prote GO:0004802 transketolase activity, GO:0016614 oxidoreductase activity, acting on CH-OH group of donors, GO:0015901 oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, outrone or GO:0004368 glycerol-3-phosphate oxidase activity GO:0004369 glycerol-3-phosphate oxidase activity GO:0016899 oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, oxygen as acceptor GO:0016893 unidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, oxygen as acceptor GO:0016405 additol catabolic process GO:0019405 additol catabolic process GO:0043100 pyrimidine nucleobase salvage GO:0006750 glutathione biosynthetic process GO:0046164 alcohol catabolic process GO:0046174 polyol catabolic process GC/0019860 urali metabolic process GC/0019860 urali metabolic process GC/0019563 glycerol catabolic process GC/005114 oxidation-reduction process GC/0017102 organic substance transport GC/0008643 carbohydrate transport GC/004275 cellular carbohydrate catabolic process GO:0009401 phosphoenolpyruvate-dependent sugar phosphotransferase system GO:0019637 organophosphate metabolic process GO:0006072 glycerol-3-phosphate metabolic process 10 40 0 20 30 % sequences GO:0031975 envelope В GO:0030288 outer membrane-bounded peripla GO:0042597 peripla nic space GO:0044462 external en GO:0030313 cel GO:0030312 external encapsulating GO:0005215 transporter activity GO:0005215 transporter activity or acting on glycosyl bonds GO-0003012 external encapsulating structure GO-0005215 transporter activity GO-0016798 hydrolase activity, acting on glycosyl bonds GO-004527 glucosyltransferase activity GO-0030246 carbohydrate binding GO-0009051 biosyltransferase activity GO-0009058 biosynthetic process GO-004170 macromolecule metabolic process GO-0019580 protein metabolic process GO-0019580 protein metabolic process GO-0019553 protein metabolic process GO-000577 glycogen metabolic process GO-000573 cellular glucan metabolic process GO-0005973 glycogen biosynthetic process GO-0005978 glycogen metabolic process GO-000512 energy reserve metabolic process GO-0043244 protein complex GO-0043244 protein complex GO-0043234 protein complex GO-004331 glycerol-5-ptosphale dehydrogenase complex GO terms GO:0009331 glycerol-3-phosphate dehydrogenase complex GO:0032991 macromolecular complex GO:0047810 D-alanine:2-oxoglutarate aminotransferase activity GO:0005198 structural molecule activity GO:0003735 structural anotexituent of ribosome GO:0003723 RNA binding GO:0016744 transferase activity, transferring aidehyde or ketonic groups GO:0047473 D-alanine-poly(phosphoribio) ligase activity GO:0019843 rRNA binding GO:0004802 transketolas e activit G0:0004802 transketolase activity GC:0016901 oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, GO:0004388 glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity GO:0004389 glycerol-3-phosphate dehydrogenase activity GO:0016899 oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, oxygen as acceptor GO:0016164 atcholic process GO:0016164 atcholic catabolic process GO:0046154 alconol catabolic process GO:0046174 polyo catabolic process GO:0019563 glycerol catabolic process GO:0005612 translation GO:0019637 organophosphate metabolic process GO:0006072 glycerol-3-phosphate metabolic process 25 0 5 10 15 20 30 35 40 45

Figure 3. GO classification of genes whose expression is significantly altered in S. pneumoniae TC resistant mutants. Genes differentially expressed (*p*-value≤0.015) in (A) R6M1TC-5 and (B) R6M2TC-4 compared to *S. pneumoniae* R6 WT were clustered

50

% sequences

according to their ontology. Go terms surround by a dark grey, medium grey and light grey correspond to cellular component, molecular function and biological process associated GO, respectively. The percentage of sequences associated with a specific GO term is shown for overexpressed genes (green), downregulated genes (blue) and overall *S. pneumoniae* R6 genes (red).

Suplementary data

Table S1 – Strain used in this study

Strains	Description	References
R6	Wild-type	ATCC BAA
		255
CCRI 14730	clinical isolates	
CCRI 14774	clinical isolates	
CCRI 15711	clinical isolates	
CCRI 18414	clinical isolates	
CCRI 22087	clinical isolates	
CCRI 55073	clinical isolates	
CCRI 60827	clinical isolates	
CCRI 1974	clinical isolates	
CCRI 9008	clinical isolates	
CCRI 14598	clinical isolates	
R6M1TC 1-5	R6 laboratory-derived mutants resistant to TC	This work
R6M2TC 1-4	R6 laboratory derived mutants resistant to TC	This work
R6 ^{rpsJ(R6M1TC-1)}	R6 transformed with <i>rpsJ</i> (spr0187) PCR	This work
R6 ^{rpsJ(R6M1TC-1)-rev(R6WT)-} rpsL+	fragment amplified from R6M1TC-1 R6 ^{rpsJ(R6M1TC-1)} co-transformed with <i>rpsJ</i> (spr0187) PCR fragment amplified from R6 and streptomycin resistance marker <i>rpsL</i> +,	
R6 ^{rpsJ(R6M1TC-5)}	R6 transformed with <i>rpsJ</i> (spr0187) PCR	This work
R6 ^{rpsJ(R6M1TC-5)} -rev(R6WT)- rpsL+	fragment amplified from R6M11C-5 R6 ^{rpsJ(R6M1TC-5)} co-transformed with <i>rpsJ</i> (spr0187) PCR fragment amplified from R6 and $rnsI + SM^r$	
R6 ^{spr0825(R6M1TC)-} rpsL+	R6 co-transformed with spr0825 PCR fragment amplified from R6M1TC-5 and $rnsL+$. SM ^r	This work
R6 ^{patA(R6M1TC)}	R6 transformed with PCR fragment containing mutations in coding region and promoter region of <i>patA</i> from R6M1TC-5	This work
R6 ^{p_patA(R6M1TC)-rpsL+}	R6 co-transformed with a PCR fragment containing mutations in promoter region of <i>patA</i> from R6M1TC-5 and <i>rpsL</i> + SM ^r	This work
$ m R6^{CDSpatA(R6M1TC)-rpsL+}$	R6 co-transformed with PCR fragment containing mutations in coding region of <i>patA</i> from R6M1TC-5 and <i>rpsL</i> +, SM ^r	This work

R6 ^{CDSpatA(G510A)(R6M1TC)-} rpsL+	R6 co-transformed with PCR fragment containing mutations in coding region of	This work
R6 ^{CDSpatA(C883A)(R6M1TC)-} rpsL+	<i>patA</i> from R6M1TC-5 and <i>rpsL</i> +, SM ^r R6 co-transformed with PCR fragment containing mutations in coding region of	This work
$R6^{rpsJ(R6M1TC)-spr0825(R6M1TC)-}_{rpsL+}$	R6 ^{rpsJ-R6M1TC} co-transformed with spr0825 PCR fragment amplified from R6M1TC-5	This work
R6 ^{rpsJ(R6M1TC)-patA(R6M1TC)}	and <i>rpsL</i> +, SM ⁴ R6 ^{rpsJ-R6M1TC} transformed with PCR fragment containing mutations in the coding	This work
R6 ^{rpsJ} (R6M1TC)-patA(R6M1TC)-	region of <i>patA</i> from R6M1TC-5 R6 ^{rpsJ-R6M1TC-patA-M1TC} co-transformed with	This work
R6 ^{rpsJ(R6M1TC)} -patA(R6M1TC)-	R6M1TC-5 R6 ^{rpsJ-R6M1TC-patA-R6M1TC-spr0825-R6M1TC rpsL+} co-	This work
spr0825(R6M1TC)-spr1262(R6M1TC)- dhfr+	transformed with spr1262 PCR fragment amplified from R6M1TC and <i>dhfr</i> +,	
R6 ^{rpsJ(R6M2TC)}	thrimethoprim resistance marker, TMP ^r R6 transformed with <i>rpsJ</i> (spr0187) PCR fragment amplified from R6M2TC 4	This work
R6 ^{patA-patB(R6M2TC)}	R6 transformed with a PCR fragment containing mutations in promoter and coding	This work
R6 ^{patA-patB(R6M2TC)-rev(patA)-} rpsL+	region of <i>patA</i> and <i>patB</i> from R6M2TC-4 R6 ^{patA-patB(R6M2TC)} co-transformed with <i>patA</i> PCR fragment amplified from R6 and	
$R6^{p_patA(R6M2TC)-rpsL+}$	<i>rpsL</i> +, SM ^r R6 co-transformed with PCR fragment containing mutations in promoter region of	This work
$ m R6^{CDSpatA(R6M2TC)-rpsL+}$	<i>patA</i> from R6M2TC-4 and <i>rpsL</i> +, SM ^r R6 co-transformed with fragment containing mutations in coding region of <i>patA</i> from	This work
$R6^{CDSpatB(R6M2TC)-rpsL+}$	R6M2TC-4 and <i>rpsL</i> +, SM ^r R6 co-transformed with fragment containing mutations in coding region of <i>patB</i> from	This work
$ m R6^{CDSpatA-patB(R6M2TC)-dhfr+}$	R6M2TC-4 and $rpsL+$, SM ^r R6 ^{CDSpatB-R6M2TC rpsL+} co-transformed with fragment containing mutations in <i>patA</i> from	This work
R6 ^{rpsJ(R6M2TC)-patA(R6M2TC)}	R6M2TC-4 and $dhfr$ +, TMP ^r R6 ^{rpsJ-R6M1TC} transformed with <i>patA</i> PCR fragment containing mutations in promoter	This work
R6 ^{rpsJ(R6M2TC)-patA(R6M2TC)-} patB(R6M2TC)	and coding regions of R6M2TC-5 R6 ^{rpsJ-R6M1TC} transformed with PCR fragment containing mutations in promoter	This work
R6 ^{rpsJ(R6M2TC)-patA(R6M2TC)-}	region of <i>patA</i> and coding regions of <i>patA</i> and <i>patB</i> from R6M1TC-5 R6 ^{rpsJ- R6M2TC-patAR6M2TC-patBR6M2TC} co-	This work

patB(R6M2TC)-spr0291(R6M2TC)- rpsL+	transformed with spr0291 PCR fragment amplified from R6M2TC-4 and <i>rpsL</i> +, SM ^r	
R6rpsJ(R6M2TC)-patA(R6M2TC)- patB(R6M2TC)-spr0822(R6M2TC)-	R6 ^{rpsJ- R6M2TC-patAR6M2TC-patBR6M2TC} co- transformed with spr0822 PCR fragment	This work
rpsL+ R6rpsJ(R6M2TC)-patA(R6M2TC)-	amplified from R6M2TC-4 and <i>rpsL</i> +, SM ^r R6 ^{rpsJ- R6M2TC-patAR6M2TC-patBR6M2TC} co-	This work
patB(R6M21C)-spr1377(R6M21C)- rpsL+	transformed with spr1377 PCR fragment amplified from R6M2TC-4 and <i>rpsL</i> +, SM ^r	
R6rpsJ(R6M2TC)-patA(R6M2TC)- patB(R6M2TC)-spr0691(R6M2TC)-	R6 ^{rpsJ-R6M21C-patR6M21C-patBR6M21C} co- transformed with spr0691 PCR fragment	This work
CCRI 22087	amplified from R6M2TC-4 and <i>rpsL</i> +, SM ^r CCRI 22087 transformed with	This work
pFF3spr0632(CCRI22087) R6pFF6patB	pFF3spr0632(CCRI22087), CM ^r	Lupien et al
R6pFF6patA		2013 Lupien et al.2013
R6pFF6spr0632	R6 transformed with plasmid pFF6spr0632, KAN ^r	This work
R6M1TC-5pFF6patB	R6M1TC-5 transformed with plasmid pFF6patB, KAN ^r	This work
R6M1TC-5pFF6patA	R6M1TC-5 transformed with plasmid pFF6patA, KAN ^r	This work
R6M1TC-5pFF6spr0632	R6M1TC-5 transformed with plasmid pFF6spr0632, KAN ^r	This work
R6M1TC-5pFF6spr0634	R6M1TC-5 transformed with plasmid pFF6spr0634, KAN ^r	This work
R6M1TC-5pFF6spr0637	R6M1TC-5 transformed with plasmid pFF6spr0637, KAN ^r	This work
R6M1TC-5pFF6spr0638	R6M1TC-5 transformed with plasmid pFF6spr0638, KAN ^r	This work
R6M2TC-4pFF6patB	R6M2TC-2 transformed with plasmid pFF6patB, KAN ^r	This work
R6M2TC-4pFF6patA	R6M2TC-2 transformed with plasmid pFF6patA, KAN ^r	This work
R6M2TC-4pFF6 spr0632	R6M2TC-2 transformed with plasmid pFF6spr0632, KAN ^r	This work
R6M2TC-4pFF6 spr0634	R6M2TC-2 transformed with plasmid pFF6spr0634, KAN ^r	This work
R6M2TC-4pFF6 spr0638	R6M2TC-2 transformed with plasmid pFF6spr0638, KAN ^r	This work
Plasmid pFF6		Lupien et
pFF6patA		Lupien et
pFF6patB		Lupien et

1		al 2013
pFF6spr0632(R6)	plasmid pFF6(KAN ^r) containing a fragment	This work
	of spr0632 amplified from R6	
pFF3spr0632(CCRI22087)	plasmid pFF3(CM ^r) containing a fragment	This work
	of spr0632 amplified from CCRI 22087	
pFF6spr0634	plasmid pFF6(KAN ^r) containing a fragment	This work
	of spr0634 amplified from R6	
pFF6spr0637	plasmid pFF6(KAN ^r) containing a fragment	This work
	of spr0637 amplified from R6	
pFF6spr0638	plasmid pFF6(KAN ^r) containing a fragment	This work
	of spr0638 amplified from R6	

Primers	Primer sequences
Genes inactivations	
<i>patB</i> F-KO	CCAACCTCCAGCAGAAAGAG
<i>patB</i> R-KO	CCTGACTAGCATCTGGCACA
<i>patA</i> F-KO	GGGGTACCGTTGGTTCCATCGCTTCTTT
<i>patA</i> R-KO	CGGGATCCATCCTTTGTTTTGTCCACC
spr0632F-KO	GTGTCCAGAAGGTTGGCATT
spr0632R-KO	GCTCCTCTCGCAGACTGACT
spr0634F-KO	GCAGGCTTCCTTTCATCATC
spr0634R-KO	ATGGCTAAGTTCGGTTCTGC
spr0637F-KO	AGTTTCGGTAGCTCGCAAAG
spr0637R-KO	CGAAGTCAAGCCTCCAATAG
spr0638F-KO	AATCGAGCACGTTTCTCCTC
spr0638R-KO	GATGTCCGCCTTTGATAACC
Mutants reconstruction	
<i>rpsJ</i> (L)-F	AGTATCCAGTCCTTCAGCAAAAT
<i>rpsJ</i> (L)-R	GTGTGGGTGATCGTTAGGGTTC
spr0825(L)-F	ATCCATAGCGATGGTCAAGG
spr0825(L)-R	ACGACATCACCCTCTTGGAC
spr1262(L)-F	GGTCTTTATGAACCGGATGC
spr1262(L)-R	GCTGGTCTCCAAAAGTCTGC
spr0291(L)-F	GTCACTTAATGCCAGACCAT
spr0291(L)-R	CCAAGCTTGAATAAAACCAC
spr0822(L)-F	AAGGTTACGATGTGGATTTG
spr0822(L)-R	CTAGCAACGGAAAATTCATC
spr1377(L)-F	GGAGGTTCTGGAAATGAAA
spr1377(L)-R	CCTTTTCAAGTTGGTCAAAG
spr0691(L)-F	AACTGTTGGTTTGACAGAAGA
spr0691(L)-R	GGATACACCAGAATTTTTGGA
Introduction of mutations in	patA-patB operon ^a
up-patA(L)-F	CTATCATTCTGCCCAACAGTAT
p_R6M1TC(-35*)-R	ACTTTCTCCTTAAAAAATAGACAAAAGGGAGCGA <u>T</u> AAT
	GCGTCAGCTCCTT
p_R6M1TC-F	CCCTTTTGTCTATTTTTTAAGG
CDS_R6M1TC(510*)-F	GCTGTCAT <u>A</u> ATGGGAATGATGG
CDS_R6M1TC(883*)-R	AATCATGGCAC <u>T</u> GCTGACAGA
p_R6M2TC(-48*)-R	TCCTTAAAAAATAGACAAAAGGGAGCGACAATGCGTC
	AGCT <u>T</u> CTTTTCAT
p_R6M2TC-F	CGCATTGTCGCTCCCTTTTGTCT
CDS_R6M2TC(860*)-R	AATCATGGCACGGCTGACAGAATTTCCCAAAAAT <u>T</u> CAA
CDS_R6M2TC-F	GGGAAATTCTGTCAGCCGTG

patB-R	TTATTCGAAAACAAATTGATTGTG
<i>tet(M)</i> and <i>tet(O)</i> PCR	
tet(M)-F	GTGGACAAAGGTACAACGAG
tet(M)-R	CGGTAAAGTTCGTCACACAC
tet(O)-F	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC
tet(O)-R	TCCCACTGTTCCATATCGTCA
qRT-PCR	
RT16sRNA-F	CCTATTGTTAGTTGCCATCATTCAG
RT16srRNA-R	GACTCGTTGTACCAGCCATTGT
RTpatA -F	GGTGGCAAGGATATTCGAGA
RT <i>patA</i> -R	AGAATGGCACGTTGGAGAAC
RTspr0632-F	GTGTCCAGAAGGTTGGCATT
RTspr0632-R	ATTGCTGGACAACCTCTGCT
RTspr0634-F	CAGGGTTTAGTGGAGGGTGA
RTspr0634-R	GGATGTTGCTCCATTTCCTG
RTspr0637-F	AGTTTCGGTAGCTCGCAAAG
RTspr0637-R	AAATGGCTCCTGTACCCAAG
RTspr0638-F	GGTTATCAAAGGCGGACATC
RTspr0638-R	CTGCAGCAAAGGTACATCCA

Abbreviation: F: Forward; R: Reverse; (L): Long fragment; up: upstream; qRT-PCR: quantitative real-time PCR.

^a Modify nucleotides, compare to R6 sequence, are underlines

Table S3: Significantly expressed genes (p-value $\leq 0,015$) in R6M1TC-5 compared to R6

according to RNAseq experiment

		F	R6M1TC-5/F	R6	R6M2TC-4/R6		
gene	function	log2(fold- change)	p_value	q_value	log2(fold_ change)	p_value	q_value
overexpres	sed						
Spr0057	beta-N-acetyl hexosaminidase				2,6601	0,00046337	0,0583966
Spr0559	Beta-galactosidase 3				2,38199	0,00261514	0,138373
Spr0661	PTS system IIC component				2,69512	0,0004137	0,0562084
Spr0664	sugar isomerase domain protein AgaS				2,52529	0,00108121	0,0786964
Spr0065	aldose 1-epimerase				2,36627	0,00264796	0,138373
Spr0081	ABC transporter permease				2,88557	0,00014387	0,0325785
Spr0082	ABC transporter permease				3,22419	3,10E-05	0,0104996
Spr0083	ABC transporter substrate- binding protein				2,72874	0,00031731	0,0497448
spr0098	bacteriocin	2,25696	0,00700	0,28540	2,07978	0,00847928	0,250446
Spr0115	hypothetical protein	2,05847	0,01064 56	0,285469			
Spr0118	hypothetical protein	2,27423	0,00344 075	0,163076			
Spr0161	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase				1,94427	0,0122371	0,311739
spr0299	hypothetical protein	2,67247	0,00699	0,28540			
Spr0440	endo-beta-N- acetylglucosaminidase				2,63361	0,00048712	0,0583966
spr0470	hypothetical protein	2,83064	0,00149	0,11237			
spr0482	ribosome-binding factor A	2,44772	0,00146	0,11237			
spr0484	Putative uncharacterized protein	4,52046	0,00004	0,00893			
spr0550	hypothetical protein	2,47757	0,00806	0,31256			
Spr0563	hypothetical protein				2,68373	0,00088272	0,0764286
Spr0567	hypothetical protein				3,06705	0,00022324	0,0379143
spr0586	hypothetical protein	2,00283	0,01338	0,40130	2,12146	0,00576149	0,225806
Spr0587	hypothetical protein				2,07933	0,00463764	0,18903
Spr0600	hypothetical protein				2,8081	0,00021249	0,0379143
Spr0602	sodium ABC transporter ATP- binding protein				2,5702	0,00062315	0,0634993
Spr0617	hypothetical protein				2,13386	0,00713938	0,236314
Spr0620	ABC transporter substrate- binding protein - unknown substrate, truncation, partial				2,38426	0,00291874	0,14871
Spr0621	ABC transporter substrate- binding protein - unknown substrate, truncation, partial				2,32539	0,00605917	0,232629
Spr0622	amino acid ABC transporter ATP-binding protein				2,63268	0,0007733	0,0749924

Spr0624	amino acid ABC transporter				2,20967	0,00765169	0,240286
apr0625	permease	2 11272	0.00070	0.07404			
spr0625	partial	5,11572	0,00070	0,07494			
spr0627	lactate oxidase	2,16573	0,00636	0,27589			
spr0632	ABC transporter ATP-binding protein	2,40792	0,00407	0,21951	2,11307	0,00773793	0,240286
spr0634	extracellular enzyme gene transcriptional regulator	2,52424	0,00340	0,19865	2,205	0,0065063	0,232629
spr0635	hypothetical protein	2,58449	0,00874	0,31256			
spr0637	thiamine-phosphate pyrophosphorylase	2,69219	0,00409	0,21951			
spr0638	phosphomethylpyrimidine kinase	1,98158	0,00870	0,31256			
spr0643	hypothetical protein	2,90890	0,00020	0,03160			
spr0646	phospho-beta-gluco or galactosidase, truncation, partial	4,49692	0,00001	0,00420			
spr0674	superoxide dismutase, manganese-dependent	3,19004	0,00004	0,00893	2,07103	0,00643473	0,232629
spr0691	biotin transport system substrate-specific component (A)	2,78712	0,00033	0,04423	1,97921	0,00702997	0,236314
spr0697	hypothetical protein	2,03039	0,01437	0,40130			
Spr0709	hypothetical protein				2,11717	0,00393396	0,174292
spr0740	30S ribosomal protein S20	2,52542	0,00270	0,17302			
Spr0806	hypothetical protein				1,88694	0,014826	0,351342
Spr0817	hypothetical protein				2,50291	0,00306388	0,152183
Spr0811	degenerate transposase				1,90644	0,00942225	0,266293
spr0898	degenerative transposase	2,20315	0,00607	0,27536			
spr0940	Putative uncharacterized protein	2,66147	0,00085	0,07522	1,89577	0,0129832	0,322652
Spr0956	Tn5252, ORF 9 protein				3,17632	0,0092653	0,265953
spr0988	transposase	1,88394	0,01311	0,40130			
spr1020	DNA-binding protein HU	2,33885	0,00241	0,16385			
Spr1031	required for glycogen biosynthesis				2,20417	0,00354653	0,164269
Spr1032	glycogen synthase				2,35971	0,00150845	0,0960697
Spr1034	glycerate kinase				2,02038	0,00876849	0,255288
spr1171	50S ribosomal protein L19	2,02898	0,00775	0,30978			
spr1200	hypothetical protein	2,36705	0,01383	0,40130			
spr1301	hypothetical protein	2,43470	0,00621	0,27536			
spr1302	hypothetical protein	2,79410	0,00048	0,05933			
Spr1326	oxidoreductase				1,83627	0,0110926	0,293593
spr1345	cell wall surface anchor family protein	3,22416	0,01345	0,40130			
spr1385	hypothetical protein	3,13346	0,00005	0,00911	1,95298	0,00718913	0,236314
spr1467	30S ribosomal protein S15	3,34326	0,00004	0,00893			
spr1495	thiol peroxidase	2,04047	0,01246	0,40130			
Spr1523	hypothetical protein				2,06624	0,00484186	0,193485

Spr1545	hypothetical protein				2,76712	0,00122566	0,0834803
Spr1552	hypothetical protein				2,33366	0,00207089	0,120585
spr1602	thioredoxin	2,25871	0,00350	0,19865			
spr1603	NADPH-dependent 7-cyano-7- deazaguanine reductase	2,57962	0,00332	0,19865			
spr1612	hypothetical protein	1,87733	0,01500	0,41326			
spr1613	hypothetical protein	3,42049	0,00001	0,00420	2,35759	0,00148476	0,0960697
spr1659	hypothetical protein	2,07564	0,00872	0,31256			
Spr1764	hypothetical protein				2,49178	0,00241617	0,133085
spr1765	hypothetical protein	2,69280	0,00222	0,15626	3,67721	1,68E-06	0,00170897
Spr1766	hypothetical protein				2,93111	0,00097505	0,0764286
Spr1767	bacteriocin formation protein				2,19069	0,00410678	0,175922
spr1883	hypothetical protein	3,28066	0,00113	0,09632	2,39529	0,00663419	0,233112
spr1884	glutamine amidotransferase	2,08751	0,01423	0,40130			
spr1885	ABC transporter ATP-binding protein/permease	1,97612	0,01311	0,40130	3,65901	5,75E-05	0,0146527
Spr1886	Degenerate transposase				3,81667	1,43E-06	0,00170897
spr1887	ABC transporter ATP-binding protein/permease	2,30541	0,00351	0,19865	4,05175	4,90E-06	0,00249856
Spr1889	Arginine repressor				2,10152	0,0041434	0,175922
Spr1914	hypothetical protein				2,92478	0,00183588	0,110937
Spr1915	hypothetical protein				1,93543	0,0131404	0,322652
spr1943	50S ribosomal protein L32	2,61441	0,00080	0,07522			
Spr1951	hypothetical protein				2,11659	0,0044364	0,184518
Spr1952	hypothetical protein				2,6173	0,00080954	0,0749924
Spr1966	hypothetical protein				2,51861	0,00094393	0,0764286
Spr1969	PTS system IIB component				2,46769	0,00122886	0,0834803
Spr1972	L-fuculose phosphate aldolase				1,86138	0,0100763	0,273806
Spr1973	fucose kinase				1,97317	0,00787729	0,240286
Down-regula	ated						
spr0039	degenerate transposase (orf2)	-2,87484	0,00075	0,07522	-1,92863	0,0143446	0,343932
spr0040	amphipathic pore-forming peptide precursor	-2,31872	0,00485	0,23559			
spr0112	hypothetical protein	-2,92226	0,00119	0,09721			
spr0176	Holliday junction resolvase-like protein	-1,95321	0,01413	0,40130			
Spr0189	50S ribosomal protein L4	-2,69375	0,00058	0,06563	-2,79441	0,00054323	0,0615055
Spr0202	30S ribosomal protein S14	-2,44927	0,00167	0,12172	-2,14338	0,00694486	0,236314
spr0214	30S ribosomal protein S11				-1,86235	0,0133155	0,323059
spr0277	hypothetical protein	-4,47813	0,00024	0,03444			
spr0511	degenerate transposase				-3,98859	0,0005865	0,0629099
spr0655	uracil phosphoribosyl transferase	-2,08494	0,00668	0,28384			
spr0747	hypothetical protein	-1,98635	0,01248	0,40130			

spr0751	degenerate transposase (orf1)	-2,87366	0,00611	0,27536			
spr0798	hypothetical protein				-2,11898	0,0117194	0,30233
spr0861	translation initiation factor IF-3	-2,03179	0,00849	0,31256	-1,92438	0,0112523	0,294003
spr0922	thymidine kinase	-2,13159	0,01028	0,35532	-2,08244	0,00782243	0,240286
spr0961	UDP-N-acetyl-D-	-4,75566	0,00464	0,23559			
	mannosaminuronic acid dehydrogenase						
spr1075	galactose-6-phosphate isomerase subunit LacB	-2,67414	0,00049	0,05933			
spr1080	hypothetical protein	-2,35048	0,01088	0,36983			
spr1199	hypothetical protein	-3,75566	0,00597	0,27536			
spr1239	cytoplasmic alpha-amylase				-1,86341	0,00993652	0,273657
spr1241	hypothetical protein	-1,86572	0,01419	0,40130			
spr1396	30S ribosomal protein S6				-2,1709	0,00313625	0,152183
spr1440	ATP-dependent RNA helicase				-2,08664	0,00789948	0,240286
spr1481	hypothetical protein	-2,53445	0,00889	0,31256	-2,60577	0,00223728	0,126655
spr1573	tranposase (orf2)	-2,00762	0,01286	0,40130			
spr1744	degenerate transposase (orf1)	-2,87212	0,00873	0,31256			
spr1817	ABC transporter ATP- bindingprotein				-2,82623	0,00037121	0,0540381
spr1818	hypothetical protein				-3,19923	0,00018185	0,0370606
spr1859	hypothetical protein				-2,47308	0,00366759	0,166101
Spr1863	competence protein CglB				-2,17497	0,00617806	0,232629
spr1936	transketolase, C-terminal subunit, partial	-3,20167	0,00005	0,00911	-1,98423	0,00643179	0,232629
spr1937	transketolase n-terminal section, partial	-4,07009	0,00000 04	0,00075	-2,34521	0,00185077	0,110937
spr1938	ascorbate-specific PTS system enzyme IIC	-3,54898	0,00001	0,00420	-2,44367	0,00102541	0,0773995
spr1939	PTS system IIB component	-2,79126	0,00084	0,07522			
spr1940	hypothetical protein	-3,37690	0,00001	0,00420	-1,94039	0,0129914	0,322652
spr1970	PTS system IIA component	-2,50592	0,00477	0,23559			
spr1987	hypothetical protein	-2,92291	0,00272	0,17302	-3,73452	2,73E-05	0,0104996
spr1989	glycerol-3-phosphate dehydrogenase, truncation, partial	-2,47348	0,00479	0,23559	-2,67753	0,00094798	0,0764286
spr1990	glycerol-3-phosphate dehydrogenase, truncation, partial	-3,54886	0,00001	0,00420	-3,21224	3,61E-05	0,0104996
spr1991	Glycerol kinase	-3,63915	0,00000	0,00412	-3,73035	2,68E-06	0,00182256
spr2027	CDP-diacylglycerolglycerol- 3-phosphate 3- phosphatidyltransferase	-1,96009	0,01354	0,40130			
spr2045	serine protease				-2,13976	0,00953847	0,266293



Figure S1: Thiamine biosynthesis pathway in TC resistant *S.pneumoniae*. Plain arrows represent modulates genes according to RNA-seq analysis and dotted arrows show none-modulated genes in R6M1TC and R6M2TC mutants. Abbreviation: AIR: aminoimidazole ribotide ;dxp :1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate; THZ:5-(2-Hydroxyethyl)-4-methylthiazole ; THZ-P:4-Methyl-5-(2-phosphoethyl)-thiazole ; HMP: 4-Amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine; HMP-P: 4-Amino-2-methyl-5-diphosphomethylpyrimidine; tenA: thiaminase (EC:3.5.99.2); thiC: thiamine biosynthesis protein; thiD: phosphomethylpyrimidine kinase (EC:2.7.4.7); thiE: thiamine-phosphate pyrophosphorylase (EC:2.5.1.3) ;thiG: thiazole biosynthesis protein ; thiH: thiazole biosynthesis protein; thiK: thiamine kinase; thiM: hydroxyethylthiazole kinase (EC:2.7.1.50) ;ThP: thiamine phosphate; ThPP: thiamine diphosphate;



Figure S2. Mutations upstream of *patA* decrease the strength of a transcriptional terminator structure and allow increased transcription rate. Schematic representation of the *patA* 5'UTR transcriptional regulatory structures according to the Ribex prediction algorithm. Three structures were predicted 1) an anti-antiterminator, 2) an anti-terminator and 3) a transcriptional terminator stem-loop structures. The positions of the mutated nucleotides upstream of *patA* in R6M1TC-5 (G-35A) and R6M2TC-4 (G-48A) are circled.

Chapitre X: L'induction de la résistance à la tigécycline chez *Streptococcus pneumoniae* révèle la sélection de mutations dans des protéines ribosomales et de l'ARN ribosomal

Ce chapitre sera soumis sous peu pour publication.

10.1 Résumé

La tigécycline est un antibiotique à large spectre qui agit sur la sous-unité 30S du ribosome, ce qui inhibe la traduction. Développée en réponse à l'augmentation de la prévalence de bactéries multi-résistantes, la tigécycline a une bonne activité contre plusieurs bactéries à Gram négatif, Gram positif et anaérobes, incluant Streptococcus pneumoniae. Nous avons étudié les déterminants moléculaires de la résistance à la tigécycline chez S. pneumoniae par le séquençage du génome de deux séries de mutants sélectionnnés in vitro en présence d'une concentration croissante de tigécycline. Les mutants S. pneumoniae R6M1TGC-6 et R6M2TGC-6 présentent une résistance croisée à la tétracycline et à la minocycline. Un rôle dans la résistance à la TGC a été attribué à quatre des douze gènes altérés chez les deux mutants. Les mutations dans la protéine ribosomale S10, apparues précocement lors de la sélection des mutants, et dans la protéine S3, acquises tardivement, ont été toutes deux impliquées dans la résistance par reconstruction génotypique. Également, des mutations ont été détectées dans les quatre allèles de l'ARNr 16s aux sites impliqués dans la liaison de la TGC. Le nombre d'allèles mutés corrèle avec le niveau de résistance à la TGC et à la TC. Finalement, les mutations non-sens sélectionnées chez les mutants dans le gène spr1784, codant potentiellement pour une méthyltransférase de l'ARNr 16s, diminuent la sensibilité à la TGC. Cette première étude des mécanismes de résistance de la TGC chez S. pneumoniae a révélé que, comparativement aux espèces bactériennes à Gram négatif où des mécanismes d'efflux sont principalement impliqués, la résistance à la TGC chez S. pneumoniae résulte de l'acquisition de mutations reliées aux ribosomes.

10.2 Article

Induced tigecycline resistance in *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals mutations in ribosomal proteins and rRNA.

Andréanne Lupien¹, Hélène Gingras¹, Philippe Leprohon¹, Marc Ouellette^{1§}

 ¹ Centre de recherche en Infectiologie du Centre de recherche du CHU de Québec and Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada.
 [§]Corresponding author: Marc Ouellette Ph.D. Centre de Recherche en Infectiologie
 2705 Boul. Laurier
 Québec, QC
 Canada
 G1V 4G2
 Tel : 1-418-654-2705
 Fax : 1-418-654-2715

E-mail :<u>Marc.Ouellette@crchul.ulaval.ca</u>

Running title: Tigecycline resistance in Streptococcus pneumonia

Keywords: Streptococcus pneumoniae, tigecycline, whole-genome sequencing

Abstract

Tigecycline (TGC) is a broad spectrum antibiotic acting at the level of the 30S ribosomal subunit to inhibit translation. Developed primarily in response to the increased prevalence of multidrug-resistant bacteria, it has a good activity against many Gramnegative, Gram-positive and anaerobes bacteria, including Streptococcus pneumoniae. We studied the molecular determinants of resistance to TGC in S. pneumoniae through whole genome sequencing of two series of mutants made resistant to TGC in vitro in a stepwise fashion. The S. pneumoniae R6M1TGC-6 and R6M2TGC-6 mutants were cross-resistant to tetracycline and minocycline. A role in TGC resistance could be attributed to four of the twelve genes that were mutated in both mutants. Mutations in ribosomal protein S10 and S3 respectively acquired early and late during the selection of both mutants have been implicated in resistance by genotype reconstruction. Similarly, mutations were detected in the four alleles of the 16S ribosomal rRNA at sites involved in TGC binding and the number of mutated alleles correlated with the level of resistance. Finally, the gene spr1784 encodes a putative 16S rRNA methyltransferase for which inactivating mutations selected in the S. pneumoniae R6 TGC-resistant mutants were found to decrease susceptibility to TGC. This first report about TGC resistance mechanisms in S. pneumoniae revealed that in contrast to Gram-negative bacteria for which efflux appears central for TGC resistance, TGC resistance in the pneumococcus occurs through mutations related to ribosomes.

Introduction

Streptococcus pneumoniae is a Gram-positive bacterium responsible for several diseases including otitis media, meningitis and pneumonia. Due to the spread of multidrug-resistant clones not included in the pneumococcal conjugate vaccine [1-3] the prevalence of resistance among *S. pneumoniae* is globally high for β -lactams [4, 5]. The situation is even worst for macrolides and tetracycline (TC) for which resistance rates higher than 50% were reported [3, 6]. Second generation tetracyclines have been proposed for the treatment of community-acquired pneumonia [7, 8] but cross-resistance between compounds of the TC family is observable in pneumococci [6, 9] with the exception for the new glycylcycline tigecycline (TGC).

TGC is a new broad spectrum antibiotic with a good activity against Gram-positive, Gram-negative and anaerobes bacteria [10, 11]. It was first introduced in 2005 for the treatment of complicated skin and skin-structure infections (cSSSIs) and intra-abdominal infections (cIAIs) [12] and was later approved by the FDA in 2010 for the treatment of community-acquired pneumonia for which S. pneumoniae is an important etiologic agent [13]. It is a third generation TC derived from minocycline (MI) to which a 9-tbutylglycylamido moiety has been added at position C9 of the four-ring structure [14]. In general, TGC is considered bacteriostatic; however it has demonstrated bactericidal activity against isolates of S. pneumoniae [15] and methicillin resistant Staphilococcus aureus (MRSA) in a rat endocarditis model [16]. Similarly to TC, TGC is reversibly binding to the decoding center of the 30S ribosome subunit [17], although at an affinity up to 20 times greater compared to other TC compounds [18, 19]. TGC also displays improved inhibitory activities against a range of bacteria [20, 21], which is likely explained by the increased steric hindrance that TGC imposes at the A site of the ribosome during prokaryotic translation [17, 22]. TGC also overcomes resistance resulting from the expression of the well characterized *tet*-gene encoded efflux pumps and ribosomal protection proteins [21, 23].

TGC remains very effective in the case of the pneumococcus [24-27] but the apparition of TGC non-susceptible isolates in other species is worrying [27-32]. In Gramnegative bacteria, resistance to TGC is mainly caused by the expression of efflux pumps of the resistance-nodulation-cell division (RND) superfamily. More specifically, the expression of the chromosomally encoded MexXY-OmpR and AcrAB pumps is responsible for the intrinsic TGC resistance of Pseudomonas aeruginosa and Proteus mirabilis, respectively [33, 34]. Similarly, the overexpression of the AdeABC and SdeXY RND pumps is responsible for reduced susceptibility to TGC in Acinetobacter baumanii and Serratia marcescens, respectively [35, 36]. For several Gram-negative bacteria, the increased activity of these RND pumps is related to alterations in factors regulating their expression [37-40]. Despite the fact that TGC was designed to overcome resistance mediated by tet genes, mutations in the tetA efflux system were shown to reduce susceptibility to TGC in Salmonella [41-43]. Resistance to TGC in Gram-positive bacteria is very scarce but studying MRSA selected for resistance to TGC revealed a novel MATE efflux system called MepA whose increased expression contributed to reduced susceptibility to TGC [44].

Besides efflux, resistance to TGC can also occur through the flavin-dependent monooxygenase TetX that modifies TGC to 11a-hydroxytigecycline, a molecule with a weakened ability to inhibit protein translation compared to TGC [45, 46]. A mutation at the vertex of a conserved loop in ribosomal protein S10 has also been implicated in resistance to TGC in *Klebsiella pneumoniae* [39]. In *A. baumanni*, a mutation leading to a truncated version of an S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase was shown to confer an 8-fold increase in resistance to TGC [47]. Finally, mutations in genes linked to the biosynthesis of the lipopolysaccharide core were shown to increase resistance to TGC in *Escherichia coli* [48].

In this study, we characterized *S. pneumoniae* mutants selected for resistance to TGC by the combined use of next generation sequencing (NGS) and resistance reconstruction. We report that TGC resistance involves mutations in ribosomal protein S3 and S10, in the 16S ribosomal RNA (rRNA) and also in a putative 16S rRNA

methyltransferase from the RsmD family. These constitute new molecular determinants of resistance to TGC in *S. pneumoniae*.

Results

TGC mutants

Two *S. pneumoniae* mutants resistant to TGC, namely R6M1TGC-6 and R6M2TGC-6, were generated by successive passages of *S. pneumoniae* R6 WT (TGC MIC 0.031 µg/ml) in BHI broth in the presence of increasing concentrations of TGC over a period of 27 and 25 days, respectively (Supplementary file 1). Seven TGC increments were required to obtain the endpoint mutants resistant to 8 µg/mL TGC (Supplementary file 1 and Table 1), which is considered as resistant in other species according to the FDA [49]. R6M1TGC-6 and R6M2TGC-6 exhibited cross-resistance to first- and second-generation tetracyclines (TC and MI) but not to other classes of antibiotics (Table 1). Resistance to TC in *S. pneumoniae* R6 was previously shown to involve the reserpine-reversible ABC efflux system PatA/B (Lupien et al., manuscript submitted). In contrast, the efflux pump inhibitor reserpine had no effect on the TC, MI and TGC resistance levels of *S. pneumoniae* R6M1TGC-6 and R6M2TGC-6.

Whole genome sequencing of TGC mutants

The genome of the *S. pneumoniae* R6M1TGC-6 and R6M2TGC-6 mutants was sequenced by next-generation 454 pyrosequencing to identify mutations putatively implicated in TGC resistance. The genome sequences of each of the five intermediate selection step mutants leading to either R6M1TGC-6 or R6M2TGC-6 were also produced for determining the order of appearance of mutations during the selection of TGC resistance. Each of these mutants were cloned on plate prior to sequencing to avoid consensus calls coming from population heterogeneity (the selection of TGC resistance having been conducted in liquid broth), and two clones were sequenced for each mutant. A total of 16 mutated loci were detected in the genomes of the *S. pneumoniae* R6M1TGC-1-6 mutants compared to 24 loci for the R6M2TGC-1-6 mutants (Table 2). Among these

mutated loci, 12 were common to the R6M1TGC and R6M2TGC series of mutants (Table 2).

The only mutation selected at the first selection step in both mutants occurred at position 178 of the gene spr0187 (rpsJ) coding for ribosomal protein S10 (Table 2). Mutations in genes spr0062, spr0825, spr1945 and spr1991 were also detected in both mutants but while these occurred at the first selection step in the case of R6M1TGC, they appeared later in R6M2TGC or were only sporadically detected in one of the two clones sequenced at a given selection step (Table 2). S. pneumoniae contains four gene copies for the 16S ribosomal RNA (rRNA) [50] and a total of four different mutations distributed among the four 16S rRNA gene copies occurred during the selection of the R6M1TGC and R6M2TGC mutants (Table 1). Interestingly, the number of 16S rRNA mutations correlated with the level of TGC resistance (Table 2). The selection of R6M1TGC was associated with the early acquisition of a T1057A transversion in all 16S rRNA copies, followed by a shift towards T1057G variants (Table 2). In contrast, the T1057G was selected at once in the case of R6M2TGC (Table 2). The penultimate and/or last selection steps of both mutants were associated with the gain of a C1049T transition in at least three 16S rRNA gene copies (Table 2). Finally, a transition affecting a purine located 23 nucleotides upstream of the second 16S rRNA gene occurred in both most resistant mutants (Table 2).

The gene spr1784 codes for a putative DNA methyltransferase and suffered from a number of mutations depending on the selection step and/or sequenced clone in the R6M1TGC and R6M2TGC mutants (Table 2). Interestingly, each of these mutations invariably translated into a truncated version of the protein and occurred after the appearance of *rpsJ* and 16S rRNA mutations (Table 2). Finally, both mutants acquired a mutation in the gene spr0195 (*rpsC*) coding for ribosomal protein S3 at the last and penultimate selection step for R6M1TGC and R6M2TGC, respectively, but the position mutated differed between the two mutants (Table 2). Other mutations occurred in R6M1TGC and R6M2TGC but these were of lesser interest owing to the fact that they were selected in only one of the two mutants, were less conserved between clones or were silent

at the protein level (Table 2). Nevertheless, it is intriguing that R6M2TGC specifically accumulated mutations in four of the five gene copies of tRNA-Glu (Table 2).

Genes involved in TGC resistance

Recurrent mutations in independent mutants are the most likely to contribute to resistance and the role of the mutations in *rpsJ*, 16S rRNA, spr1784 and *rpsC* was thus further studied by resistance reconstruction [51]. Resistance reconstruction involves the transformation of sensitive *S. pneumoniae* recipients with PCR fragments harboring mutations putatively implicated in resistance. Each reconstructed strain was then tested for resistance to TGC and TC.

The introduction of the rpsJ G178T mutation derived from R6M1TGC-6 into S. pneumoniae R6 WT conferred a 4-fold increase in resistance to TGC and TC to the resulting S. pneumoniae R6^{rpsJ(R6M1TGC-6)} transformant (Table 3). The TGC resistance level of R6M1TGC-1 and R6M2TGC-1 can thus be fully explained by the early acquisition of the G178T rpsJ allele (Tables 1 and 2). Despite several attempts, it proved impossible to target the 16S rRNA locus by transformation of PCR fragments for assessing the role of 16S rRNA mutations in TGC resistance. Instead, we used whole genome transformation, an approach whereby genomic DNA (gDNA) instead of PCR fragments is transformed for assessing the role of mutations in resistance [51-53]. The T1057G and C1049T mutations could be introduced in the four gene copies of 16S rRNA by two successive rounds of transformation of S. pneumoniae R6^{rpsJ(R6M1TGC-6)} recipients with gDNA derived from S. pneumoniae R6M1TGC-6 (Table 3). The acquisition of two mutated rRNA gene copies in the first round of transformation increased the TGC MIC of the T1-R6^{rpsJ(R6M1TGC-6)-} ^{16SrRNA_1_4(R6M1TGC-6)} and T1-R6^{rpsJ(R6M1TGC-6)-16SrRNA_1_3(R6M1TGC-6)} transformants to 1µg/ml (Table 3). This represents a 8-fold increase compared to S. pneumoniae R6^{rpsJ(R6M1TGC-6)}. The second round of transformation enabled recovering transformants T2-R6^{rpsJ(R6M1TGC-6)-} ^{16SrRNA_1_3_4(R6M1TGC-6)} and T2-R6^{rpsJ(R6M1TGC-6)-16SrRNA_1_2_3_4(R6M1TGC-6)} harboring three and four mutated 16S rRNA copies respectively. Each additional mutated copy conferred a 2fold increase in TGC resistance (Table 3). Conventional sequencing of PCR fragments confirmed that every transformants harbored WT alleles of the genes spr1784 and *rpsC*.

The role of the mutations in spr1784 and *rpsC* in resistance to TGC was assessed by replacing the mutated genes with their WT native version in the endpoint *S. pneumoniae* R6M1TGC-6 and R6M2TGC-6 mutants. This was achieved by co-transforming a *rpsL*+ PCR fragment conferring resistance to streptomycin that was used as a surrogate marker for the selection of transformants (see Methods). The *rpsL*+ allele had no impact on TGC and TC susceptibility levels when transformed alone (Table 3). The introduction of a WT allele of spr1784 in *S. pneumoniae* R6M1TGC-6 and R6M2TGC-6 conferred a 4-fold increase in TGC sensitivity to the *S. pneumoniae* R6M1TGC^{spr1784(R6)-rpsL+} and R6M2TGC^{spr1784(R6)-rpsL+} transformants (Table 3). The reversion of the *rpsC* allele of *S. pneumoniae* R6M1TGC-6 and R6M2TGC-6 to a WT version also decreased their susceptibility to TGC, with the K4R substitution of R6M1TGC-6 being more potent at conferring resistance than the H175D substitution of R6M2TGC-6 (see R6M1TGC^{rpsC(R6)-rpsL+} and R6M2TGC^{rpsC(R6)-rpsL+} in Table 3).

While mutations in the genes spr0062, spr0825, spr1945 and spr1991 were found in both mutants, a role in resistance could not be attributed to any of these by transformation into *S. pneumoniae* R6 WT (data not shown).
Discussion

Resistance to TGC is frequently associated with the overexpression of efflux pumps of the RND family in Gram-negative bacteria [54]. While TGC resistance is uncommon in Gram-positive bacteria, the selection for TGC resistance among MRSA also implicated efflux in resistance in this Gram-positive species [44]. In contrast, we show here that efflux had no role in TGC resistance in *S. pneumoniae* R6 which instead occurred through the acquisition of mutations in ribosomal constituents and in a putative RNA methyltransferase.

Ribosomal proteins were shown not to be involved in the binding of TC to the ribosome, still three of these (i.e. ribosomal proteins S3, S10 and S13) exhibit interactions very close to the TC-binding pocket [55]. Low level TGC resistance among S. pneumoniae R6M1TC-1 and R6M2TC-1 mutants was correlated with the early selection of a D60Y substitution in ribosomal protein S10. This substitution had been previously implicated in resistance to TC in S. pneumoniae (Lupien and al. manuscript submitted). The aspartic acid at position 60 of ribosomal protein S10 is located three residues away from lysine 57 for which a substitution to a glutamic acid has been implicated in TC resistance in Neisseria gonorrhoeae [56] and more recently in resistance to TGC in K. pneumoniae [39]. Lysine 57 is found at the vertex of a conserved loop composed of amino acids 50-60 in ribosomal protein S10 that is located near the primary binding site of TGC and TC in the 30S ribosomal subunit [55]. Substitutions in residues in the vicinity of this site might thus decrease the affinity of the antibiotic for the ribosome by altering its structure near the TC and TGC binding site [55] or by disturbing the coordination of Mg^{2+} ions implicated in TGC docking [17]. Mutations also occurred in ribosomal protein S3 in our S. pneumoniae TGC-resistant mutants but these only appeared late during the selection process (Table 2). Ribosomal protein S3 mutations A11 and H175 detected in R6M1TGC-6 and R6M2TGC-5 and -6 are located relatively far from the loop formed by residues 155-165 which was found to be located 8.8 Å away from the TC binding site on the ribosome [55]. Ribosomal protein S3 has been shown to be important for the integrity of the TC-binding pocket however [57] and it is thus possible that the contribution of these mutations in resistance to TGC be explained by structural modifications imposed to the protein.

The binding site of TGC comprises nucleotides located within helix 31 (h31) and helix 34 (h34) of the 16S rRNA [17, 18]. The polar edge of TGC contains many hydrophilic functional groups involved in direct interactions with the phosphate-oxygen backbone of nucleotides C1195 and U1196 in h34 as well as indirect interactions with nucleotides G1197, G1198 and C1054 via a coordinated Mg2⁺ ion [17]. The primary binding site of TC is similar to that of TGC except for the stacking interactions between the 9-t-butylglycylamido moiety at position C9 of TGC and the π -orbital of nucleobase C1054 which explain the enhanced affinity for the ribosome of TGC compared to other TC derivatives [17, 58]. In addition, ring A of TGC is coordinating a second Mg2⁺ ion to facilitate indirect interactions with the phosphate backbone of nucleotide G966 in h31 [17]. Mutations affecting the structure of either h31 or h34 of 16S rRNA should thus decrease the affinity of TC and TGC for the ribosome and possibly lead to resistance. This was previously reported for mutations A965U, G966U, A967C on h31 and mutation G1058C on h34 (E. coli nomenclature) that were implicated in resistance to TC in H. pylori and Propionibacterium acnes, respectively [59, 60]. For both of our S. pneumoniae TGC resistant mutants, a C1049T transversion occurred late during the selection process, at the last and penultimate selection steps for R6M1TGC and R6M2TGC, respectively (Table 2). This position is homologous to the C1054 position on E. coli 16s rRNA [55] and the C1049T mutation should thus translate into substantially reduced ribosome binding affinities for TGC [17]. Mutations were also observed at position T1057 (T1062 on E. coli nomenclature) of the 16S rRNA in mutants R6M1TGC and R6M2TGC (Table 2). While this base is not directly part of the primary binding-site of TC and TGC, it is 8 nucleotides away and its mutation might possibly interfere with TGC-ribosome interactions around C1054, as previously proposed for a G1058C transversion (E. coli nomenclature) involved in resistance to TC in *P. acnes* [60].

The gene spr1784 encodes a putative methyltransferase that suffered from nonsense mutations in both *S. pneumoniae* TGC-resistant mutants (Table 2). Gene ontology analyses for this enzyme revealed activities related to ribosomal RNA methylation. This putative methyltransferase also contains a conserved S-adenosymethionine-dependent methyltransferase class I domain (CD NCBI: 02440) which uses S-adenosyl-L-methionine as carbon source for methylation. Interestingly, inactivating mutations in a putative SAM-dependent methyltransferase had previously been implicated in resistance to TGC in *A. baumanni* [47]. Blast analysis of the spr1784 protein and other 16S rRNA methyltransferases revealed that it is related to the 16S rRNA methyltransferase RsmD of *E. coli* (protein sequence identity: 28%). RsmD specifically methylates position N(2) of guanine 966 on helix 31 of 16s rRNA in *E. coli* [61]. This nucleotide is part of the TGC and TC primary binding site on the 16S rRNA [17, 18, 55] and the absence of a methyl group at position 966 resulting from the non-sense spr1784 mutations in R6M1TGC-6 and R6M2TGC-5 might thus impair TGC and TC binding. It will thus be interesting to test experimentally that G966 on 16S rRNA is indeed the methylation site for this enzyme.

In conclusion, whole genome sequencing of *S. pneumoniae* R6 selected for resistance to TGC revealed several mutations of which four could been linked to resistance. While efflux represents a major determinant of resistance to TGC in Gram-negative bacteria, TGC resistance mutations in *S. pneumoniae* were specifically restricted to constituents of the ribosomes, i.e. ribosomal proteins, 16S rRNA and a putative rRNA methyltransferase. While TGC resistance remains scarce in Gram-positive bacteria, it will be interesting to see if similar mutations occur in clinical isolates resistant to TGC.

Methods

Selection of S. pneumoniae tigecycline-resistant mutants

TGC resistant mutants were selected from *S. pneumoniae* R6 by successive passages in BHI broth containing an increasing concentration of TGC. On day one, 10 mL (culture 1) of BHI containing two-fold the TGC MIC of *S. pneumoniae* R6 WT (MIC 0.031 μ g/mL) were inoculated with 1 mL of a pre-culture of *S. pneumoniae* R6 WT grown in BHI to an OD_{600nm} of 0.12 and incubated at 35°C in the presence of 5% CO₂. On the second day, 1 mL of culture-1 was used for inoculating fresh BHI cultures supplemented with TGC at a concentration equivalent to two-fold (culture-2) and four-fold (culture-3) MIC of *S. pneumoniae* R6 WT. These rounds of selection were performed by increasing the concentration of TGC at each passage until the R6 mutants grew at 128-fold the TIG MIC of *S. pneumoniae* R6 WT. At each step, cultures were frozen at -80°C in the presence of 15% glycerol. The selection was performed in duplicates from two clones of *S. pneumoniae* R6 WT.

MIC determination

MICs were determined to chloramphenicol (CHL; Sigma Aldrich), ciprofloxacin (CIP; Sigma Aldrich), erythromycin (EM; Sigma Aldrich), linezolid (Lz, Pfizer), minocycline (MI; Sigma Aldrich), penicillin (PG; Sigma Aldrich), tetracycline (TC, Sigma Aldrich), tigecycline (TGC; Abcam) and vancomycin (VA) using E-test (Lz, PG, VA: Biomérieux) and by microdilution (CHL, CIP, EM, MI, TC, TGC) according to the CLSI and FDA guidelines [49]. MICs to TC and TGC were also determined in presence of the efflux pump inhibitor reserpine (20 µg/mL; Sigma Aldrich).

Whole-genome sequencing

Genomic DNAs were extracted using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. The genomes of R6M1TGC-6 and R6M2TGC-6 were sequenced using a 454 Life Sciences GS-FLX system (Roche). Genome sequencing, assemblies and comparative analyses were performed at the McGill University Genome Ouébec Innovation Center (http://gqinnovationcenter.com/index.aspx). R6M1TGC-6 and R6M2TGC-6 generated aggregated genome size of 2017028 bps, 2017040 bps, respectively, at a mean 23X coverage. Genome sequence were also produced for the intermediate selection step mutants R6M1TGC-1, R6M1TGC-2, R6M1TGC-3, R6M1TGC-4, R6M2TGC-5 R6M2TGC-1, R6M2TGC-2, R6M2TGC-3, R6M2TGC-4 and R6M2TGC-5 using an Illumina MiSeq system and a 250-nucleotides paired-end reads protocol. This generated genome assemblies covering at least 99% of the S. pneumoniae R6 genome at a mean 120X coverage. Sequence reads from each strain were filtered based on quality score using Trimmomatic [62] and aligned to the genome of S. pneumoniae R6 using the software bwa (bwa aln, version 0.5.9) with default parameters [63]. The maximum number of mismatches was 4, the seed length was 32 and 2 mismatches were allowed within the seed. The detection of single nucleotide polymorphisms was performed using samtools (version 0.1.18), beftools (distributed with samtools) and vefutils.pl (distributed with samtools) [64], with a minimum of three reads in both orientation to call a potential variation prior to further analysis. Mutations deduced from massively parallel sequencing were confirmed by PCR amplification and conventional DNA sequencing.

DNA transformation

Transformation of PCR fragments in *S. pneumoniae* was performed as previously described [51-53]. When required, long PCR fragments containing the mutations of interest were transformed in *S. pneumoniae* along with a short PCR derived from the *rpsL*+ allele of ribosomal protein S12 that confers selectable resistance to streptomycin as previously described [51]. All reconstructed strains and primers used to introduce the mutations are listed in supplementary files 2 and 3. Transformation of whole genomic DNA was conducted as previously described to introduce mutations at the level of the 16S rRNA locus [52, 53]. Genomic DNA derived from *S. pneumoniae* R6M1TGC was used as donor

DNA for the transformants of *S. pneumoniae* R6 WT recipients. Transformants were selected using CAT plates supplemented with 1.6µg/mL and 25.6µg/mL TGC. Introduction of the 16S rRNA mutations was confirmed PCR and conventional sequencing using primers specific for each of the four alleles of *S. pneumoniae* R6 16S rRNA.

Data access

The sequencing data has been deposited at the EBI SRA database (http://www.ebi.ac.uk/) under the study accession number _.

Acknowledgement

This work was funded by a CIHR grant to MO. AL received a studentship from Laval University and MO holds the Canada Research Chair in Antimicrobial Resistance. We thank the McGill University Genome Quebec Innovation Centre for performing the sequencing of the R6M1TGC-6 and R6M2TGC-6 mutants.

Authors contributions

AL, PL and MO conceived and designed the experiments. AL and HG performed the experiments. AL and PL conducted the bioinformatics analyses of the data. AL and PL wrote the paper (with contributions from all of the authors). All authors have read and approved the manuscript for publication.

Disclosure declaration

The authors declare that they have no disclosure declaration.

References

- 1. Mera R, Miller LA, Fritsche TR, Jones RN: Serotype replacement and multiple resistance in *Streptococcus pneumoniae* after the introduction of the conjugate pneumococcal vaccine. *Microb Drug Resist* 2008, 14:101-107.
- 2. Song JH, Dagan R, Klugman KP, Fritzell B: The relationship between pneumococcal serotypes and antibiotic resistance. *Vaccine* 2012, **30**:2728-2737.
- 3. Song JH, Jung SI, Ko KS, Kim NY, Son JS, Chang HH, Ki HK, Oh WS, Suh JY, Peck KR, et al: High prevalence of antimicrobial resistance among clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asia (an ANSORP study). *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**:2101-2107.
- 4. Hackel M, Lascols C, Bouchillon S, Hilton B, Morgenstern D, Purdy J: Serotype prevalence and antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates among global populations. *Vaccine* 2013, **31**:4881-4887.
- McGee L, McDougal L, Zhou J, Spratt BG, Tenover FC, George R, Hakenbeck R, Hryniewicz W, Lefevre JC, Tomasz A, Klugman KP: Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. J Clin Microbiol 2001, 39:2565-2571.
- Izdebski R, Sadowy E, Fiett J, Grzesiowski P, Gniadkowski M, Hryniewicz W: Clonal diversity and resistance mechanisms in tetracycline-nonsusceptible Streptococcus pneumoniae isolates in Poland. Antimicrob Agents Chemother 2007, 51:1155-1163.
- 7. Johnson JR: **Doxycycline for treatment of community-acquired pneumonia.** *Clin Infect Dis* 2002, **35:**632; author reply 632-633.
- 8. Mokabberi R, Haftbaradaran A, Ravakhah K: **Doxycycline vs. levofloxacin in the treatment of community-acquired pneumonia.** *J Clin Pharm Ther* 2010, **35:**195-200.
- 9. Lederman ER, Gleeson TD, Driscoll T, Wallace MR: **Doxycycline sensitivity of** *S. pneumoniae* isolates. *Clin Infect Dis* 2003, **36**:1091.
- 10. Biedenbach DJ, Beach ML, Jones RN: In vitro antimicrobial activity of GAR-936 tested against antibiotic-resistant gram-positive blood stream infection isolates and strains producing extended-spectrum beta-lactamases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001, 40:173-177.
- 11. Edlund C, Nord CE: In-vitro susceptibility of anaerobic bacteria to GAR-936, a new glycylcycline. *Clin Microbiol Infect* 2000, 6:159-163.
- 12. Frampton JE, Curran MP: **Tigecycline.** *Drugs* 2005, **65**:2623-2635; discussion 2636-2627.
- 13. File TM, Jr.: *Streptococcus pneumoniae* and community-acquired pneumonia: a cause for concern. *Am J Med* 2004, **117** Suppl 3A:39S-50S.
- 14. Sum PE, Lee VJ, Testa RT, Hlavka JJ, Ellestad GA, Bloom JD, Gluzman Y, Tally FP: Glycylcyclines. 1. A new generation of potent antibacterial agents through modification of 9-aminotetracyclines. *J Med Chem* 1994, 37:184-188.
- 15. Hoellman DB, Pankuch GA, Jacobs MR, Appelbaum PC: Antipneumococcal activities of GAR-936 (a new glycylcycline) compared to those of nine other

agents against penicillin-susceptible and -resistant pneumococci. Antimicrob Agents Chemother 2000, 44:1085-1088.

- 16. Murphy TM, Deitz JM, Petersen PJ, Mikels SM, Weiss WJ: Therapeutic efficacy of GAR-936, a novel glycylcycline, in a rat model of experimental endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 2000, 44:3022-3027.
- 17. Jenner L, Starosta AL, Terry DS, Mikolajka A, Filonava L, Yusupov M, Blanchard SC, Wilson DN, Yusupova G: Structural basis for potent inhibitory activity of the antibiotic tigecycline during protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, 110:3812-3816.
- 18. Bauer G, Berens C, Projan SJ, Hillen W: Comparison of tetracycline and tigecycline binding to ribosomes mapped by dimethylsulphate and drugdirected Fe2+ cleavage of 16S rRNA. J Antimicrob Chemother 2004, 53:592-599.
- 19. Bergeron J, Ammirati M, Danley D, James L, Norcia M, Retsema J, Strick CA, Su WG, Sutcliffe J, Wondrack L: Glycylcyclines bind to the high-affinity tetracycline ribosomal binding site and evade Tet(M)- and Tet(O)-mediated ribosomal protection. *Antimicrob Agents Chemother* 1996, 40:2226-2228.
- 20. Rose WE, Rybak MJ: Tigecycline: first of a new class of antimicrobial agents. *Pharmacotherapy* 2006, **26**:1099-1110.
- 21. Petersen PJ, Jacobus NV, Weiss WJ, Sum PE, Testa RT: In vitro and in vivo antibacterial activities of a novel glycylcycline, the 9-t-butylglycylamido derivative of minocycline (GAR-936). Antimicrob Agents Chemother 1999, 43:738-744.
- 22. Doan TL, Fung HB, Mehta D, Riska PF: **Tigecycline: a glycylcycline** antimicrobial agent. *Clin Ther* 2006, **28**:1079-1106.
- 23. Fluit AC, Florijn A, Verhoef J, Milatovic D: Presence of tetracycline resistance determinants and susceptibility to tigecycline and minocycline. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:1636-1638.
- 24. Brandon M, Dowzicky MJ: Antimicrobial susceptibility among Gram-positive organisms collected from pediatric patients globally between 2004 and 2011: results from the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. *J Clin Microbiol* 2013, 51:2371-2378.
- 25. Jones RN, Castanheira M, Hu B, Ni Y, Lin SS, Mendes RE, Wang Y: Update of contemporary antimicrobial resistance rates across China: reference testing results for 12 medical centers (2011). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013, 77:258-266.
- 26. Pillar CM, Draghi DC, Dowzicky MJ, Sahm DF: In vitro activity of tigecycline against gram-positive and gram-negative pathogens as evaluated by broth microdilution and Etest. *J Clin Microbiol* 2008, 46:2862-2867.
- 27. Balode A, Punda-Polic V, Dowzicky MJ: Antimicrobial susceptibility of gramnegative and gram-positive bacteria collected from countries in Eastern Europe: results from the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.) 2004-2010. Int J Antimicrob Agents 2013, 41:527-535.
- 28. Kanj SS, Whitelaw A, Dowzicky MJ: In vitro activity of tigecycline and comparators against Gram-positive and Gram-negative isolates collected from the Middle East and Africa between 2004 and 2011. Int J Antimicrob Agents 2014, 43:170-178.

- 29. Norskov-Lauritsen N, Marchandin H, Dowzicky MJ: Antimicrobial susceptibility of tigecycline and comparators against bacterial isolates collected as part of the TEST study in Europe (2004-2007). *Int J Antimicrob Agents* 2009, 34:121-130.
- 30. Bouchillon SK, Hoban DJ, Johnson BM, Johnson JL, Hsiung A, Dowzicky MJ: In vitro activity of tigecycline against 3989 Gram-negative and Gram-positive clinical isolates from the United States Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST Program; 2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005, 52:173-179.
- 31. Arya SC, Agarwal N: Emergence of tigecycline resistance amongst multi-drug resistant gram negative isolates in a multi-disciplinary hospital. J Infect 2010, 61:358-359.
- 32. Hoban DJ, Bouchillon SK, Johnson BM, Johnson JL, Dowzicky MJ: In vitro activity of tigecycline against 6792 Gram-negative and Gram-positive clinical isolates from the global Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST Program, 2004). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005, 52:215-227.
- 33. Visalli MA, Murphy E, Projan SJ, Bradford PA: AcrAB multidrug efflux pump is associated with reduced levels of susceptibility to tigecycline (GAR-936) in *Proteus mirabilis.* Antimicrob Agents Chemother 2003, 47:665-669.
- 34. Dean CR, Visalli MA, Projan SJ, Sum PE, Bradford PA: Efflux-mediated resistance to tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, 47:972-978.
- 35. Hornsey M, Ellington MJ, Doumith M, Hudson S, Livermore DM, Woodford N: **Tigecycline resistance in** *Serratia marcescens* associated with up-regulation of the SdeXY-HasF efflux system also active against ciprofloxacin and cefpirome. *J Antimicrob Chemother* 2010, 65:479-482.
- 36. Hornsey M, Ellington MJ, Doumith M, Thomas CP, Gordon NC, Wareham DW, Quinn J, Lolans K, Livermore DM, Woodford N: AdeABC-mediated efflux and tigecycline MICs for epidemic clones of *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother 2010, 65:1589-1593.
- 37. Keeney D, Ruzin A, McAleese F, Murphy E, Bradford PA: MarA-mediated overexpression of the AcrAB efflux pump results in decreased susceptibility to tigecycline in *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother 2008, 61:46-53.
- Rosenblum R, Khan E, Gonzalez G, Hasan R, Schneiders T: Genetic regulation of the ramA locus and its expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents* 2011, 38:39-45.
- 39. Villa L, Feudi C, Fortini D, Garcia-Fernandez A, Carattoli A: Genomics of KPCproducing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 512 clone highlights the role of RamR and ribosomal S10 protein mutations in conferring tigecycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2014, 58:1707-1712.
- 40. Lin MF, Lin YY, Yeh HW, Lan CY: **Role of the BaeSR two-component system in the regulation of** *Acinetobacter baumannii* **adeAB** genes and its correlation with **tigecycline susceptibility.** *BMC Microbiol* 2014, **14:**119.
- 41. Akiyama T, Presedo J, Khan AA: The tetA gene decreases tigecycline sensitivity of *Salmonella enterica* isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2013, **42**:133-140.
- 42. Hentschke M, Christner M, Sobottka I, Aepfelbacher M, Rohde H: Combined ramR mutation and presence of a Tn1721-associated tet(A) variant in a clinical isolate of Salmonella enterica serovar Hadar resistant to tigecycline. Antimicrob Agents Chemother 2010, 54:1319-1322.

- 43. Tuckman M, Petersen PJ, Projan SJ: Mutations in the interdomain loop region of the tetA(A) tetracycline resistance gene increase efflux of minocycline and glycylcyclines. *Microb Drug Resist* 2000, 6:277-282.
- 44. McAleese F, Petersen P, Ruzin A, Dunman PM, Murphy E, Projan SJ, Bradford PA: A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived *Staphylococcus aureus* mutants to tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:1865-1871.
- 45. Moore IF, Hughes DW, Wright GD: Tigecycline is modified by the flavindependent monooxygenase TetX. *Biochemistry* 2005, 44:11829-11835.
- 46. Volkers G, Palm GJ, Weiss MS, Wright GD, Hinrichs W: Structural basis for a new tetracycline resistance mechanism relying on the TetX monooxygenase. *FEBS Lett* 2011, 585:1061-1066.
- 47. Chen Q, Li X, Zhou H, Jiang Y, Chen Y, Hua X, Yu Y: Decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter baumannii* mediated by a mutation in trm encoding SAM-dependent methyltransferase. J Antimicrob Chemother 2014, 69:72-76.
- 48. Linkevicius M, Sandegren L, Andersson DI: Mechanisms and fitness costs of tigecycline resistance in *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother 2013, 68:2809-2819.
- 49. **Tygacil® product insert** [http://www.pfizerpro.com/hcp/tygacil]
- 50. Kilian M, Poulsen K, Blomqvist T, Havarstein LS, Bek-Thomsen M, Tettelin H, Sorensen UB: Evolution of *Streptococcus pneumoniae* and its close commensal relatives. *PLoS One* 2008, **3**:e2683.
- 51. Lupien A, Billal DS, Fani F, Soualhine H, Zhanel GG, Leprohon P, Ouellette M: Genomic characterization of ciprofloxacin resistance in a laboratory-derived mutant and a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013, **57**:4911-4919.
- 52. Billal DS, Feng J, Leprohon P, Legare D, Ouellette M: Whole genome analysis of linezolid resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals resistance and compensatory mutations. *BMC Genomics* 2011, **12:**512.
- 53. Fani F, Brotherton MC, Leprohon P, Ouellette M: Genomic analysis and reconstruction of cefotaxime resistance in *Streptococcus pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 2013, 68:1718-1727.
- 54. Sun Y, Cai Y, Liu X, Bai N, Liang B, Wang R: The emergence of clinical resistance to tigecycline. *Int J Antimicrob Agents* 2013, **41**:110-116.
- 55. Brodersen DE, Clemons WM, Jr., Carter AP, Morgan-Warren RJ, Wimberly BT, Ramakrishnan V: The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell* 2000, 103:1143-1154.
- 56. Hu M, Nandi S, Davies C, Nicholas RA: **High-level chromosomally mediated** tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* results from a point mutation in the rpsJ gene encoding ribosomal protein S10 in combination with the mtrR and penB resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49:**4327-4334.
- 57. Buck MA, Cooperman BS: Single protein omission reconstitution studies of tetracycline binding to the 30S subunit of Escherichia coli ribosomes. *Biochemistry* 1990, **29:**5374-5379.

- 58. Olson MW, Ruzin A, Feyfant E, Rush TS, 3rd, O'Connell J, Bradford PA: Functional, biophysical, and structural bases for antibacterial activity of tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**:2156-2166.
- 59. Trieber CA, Taylor DE: Mutations in the 16S rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline. *J Bacteriol* 2002, **184:**2131-2140.
- 60. Ross JI, Eady EA, Cove JH, Cunliffe WJ: 16S rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium. *Antimicrob Agents Chemother* 1998, **42**:1702-1705.
- 61. Lesnyak DV, Osipiuk J, Skarina T, Sergiev PV, Bogdanov AA, Edwards A, Savchenko A, Joachimiak A, Dontsova OA: Methyltransferase that modifies guanine 966 of the 16 S rRNA: functional identification and tertiary structure. *J Biol Chem* 2007, 282:5880-5887.
- 62. Bolger AM, Lohse M, Usadel B: Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 2014, **30**:2114-2120.
- 63. Li H, Durbin R: Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009, 25:1754-1760.
- 64. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R: **The Sequence Alignment/Map format and SAMtools.** *Bioinformatics* 2009, **25**:2078-2079.
- 65. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S: **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0.** *Mol Biol Evol* 2013, **30:**2725-2729.

Tables

 Table 1. Susceptibility levels of S. pneumoniae TGC-resistant mutants to different antibiotics.

04								3				
Strains							MIC(µg/	/mL)				
	EM	CHL	CIP	LZ	PG	VA	MI	MI+R	TC	TC+R	TGC	TGC+R
R6	0.063	2	0.5	1	0.031	0.19	0.063	0.063	0.125	0.125	0.031	0.031
R6M1TGC-1	0.063	2	0.5	1	0.031	0.19	0.5	0.5	1	1	0.125	0.125
R6M1TGC-2	0.063	2	0.5	1	0.031	0.19	1-2	1-2	2	2	0.25-0.5	0.25-0.5
R6M1TGC-3	0.063	2	0.5	1	0.031	0.19	2	2	4	4	1	1
R6M1TGC-4	0.063	2	0.5	1	0.031	0.19	4	4	8	8	2	2
R6M1TGC-5	0.063	2	0.5	1	0.031	0.19	4-8	4-8	8	8	1-2	1-2
R6M1TGC-6	0.063	2	0.5	1	0.031	0.19	16	16	16	16	8	8
R6M2TGC-1	0.063	2	0.5	1	0.031	0.19	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5
R6M2TGC-2	0.063	2	0.5	1	0.031	0.19	1	1	1	1	0.5	0.5
R6M2TGC-3	0.063	2	0.5	1	0.031	0.19	2	2	2	2	1	1
R6M2TGC-4	0.063	2	0.5	1	0.031	0.19	2-4	2-4	2-4	2-4	1	1
R6M2TGC-5	0.063	2	0.5	1	0.031	0.19	8	8	8	8	2	2
R6M2TGC-6	0.063	2	0.5	1	0.031	0.19	16	16	16	16	8	8

^a Two clones were tested for antibiotic resistance except for R6M1TGC-6 and R6M2TGC-6 for which only one clone was tested. A single MIC value indicates that both clones had the same MIC to the antibiotic. Abbreviations: EM, erythromycin; CIP, ciprofloxacin; CHL, chloramphenicol; LZ, linezolid; PG, penicillin; VA, vancomycin; MI, minocycline; TC, tetracyclin; TGC, tigecyclin, R, Reserpine (20 µg/mL).

Table 2. Chronological appearance of mutations in the S. pneumoniae R6M1TGC andR6M2TGC mutants

						R6M1TGC					R6M2TGC		
Locus spr0062	Gene ID PTS system IID compone nt	1 G74T* (R25M)	2 G74T* (R25M)	3 G74T* (R25M)	4 G74T* (R25M)	5 G74T* (R25M)	6 G74T (R25M)	-	-	-	4 G74T* (R25M)	-	-
spr0187	30S ribosom al protein S10	G178T* (D60Y)	G178T* (D60Y)	G178T* (D60Y)	G178T* (D60Y)	G178T* (D60Y) G113C* (G38A)	G178T (D60Y)	G178T* (D60Y)	G178T* (D60Y)	G178T* (D60Y)	G178T* (D60Y)	G178T* (D60Y)	G178T (D60Y)
spr0195	30S ribosom al protein S3	-	-	-	-	-	A11G (K4R)	-	-	-	-	C523G* (H175D)	C523G (H175D)
spr0318	hypotheti cal protein	-	-	-	-	-	-	-	-	C94T (P32S)	-	C94T (P32S)	-
spr0368	MutS2 family protein	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C2022T* (Syn)	-
spr0494	cell filamenta tion protein Fic- related protein	-	-	-	-	-	-	Δ-105- 106*		Δ-105- 106*	-	-	-
spr0565	beta- galactosi dase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	C3972T (Syn)
spr0755	glycerol- 3- phosphat e acyltrans ferase PlsY	-	-	-	-	T428G* (V143G)	-	-	-	-	-	-	-
spr0825	hypothet ical protein	G-61A*	G-61A*	G-61A*	G-61A*	G-61A*	G-61A	-	-	-	-	G-62A*	-
spr0884	foldase PrsA	-	-	-	-	-		insertion <u>A 128bps</u>	-	-	· -	i <u>nsertion</u> <u>A 128bps</u>	· -
spr1038	transposa se	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G5A (W2Stop)
spr1431	1,4-beta- N- acetylmu ramidase	-	-	-	-	-		-	-	A973G* (K325E)	A973G* (K325E)	-	-
spr1684	iron- compoun d ABC transport er, permease	-	-	-	-	-	T-63G	-	-	-	-	-	-
spr1707	ABC transport er substrate- binding protein - oligopept ide transport	-		-	-	Δ17*	-		-		-	-	-
spr1776	DNA- directed RNA polymera se subunit beta'	-	-	-	T1590G (Syn)	T1590G* (Syn)	T1590G (Syn)	-	-	-	-	T1590G* (Syn)	-
spr1784	type II DNA modifica tion methyltr ansferas	-		C316T (Q106Sto p) C117A (Y39Stop)	T415 insertion * (S140 Stop	T415 insertion * (S140 Stop	T415 insertion (S140 Stop)	-	-	-	C214T (R72Stop)	T415 insertion * (S140 Stop)	∆407- 408 (S140 Stop)

	e	•	-		•	-				-		-	-
spr1854	acetate kinase		-	-	-	-	-	-		G151A (E51K)	G151A (E51K)	-	-
spr1945	choline binding protein PcpA	∆47-73*	∆47 -73 *	∆47-73*	∆ 47-73 *	∆47-73*	∆47-73*	 -	-	-	-	∆47-73*	-
spr1961	hypotheti cal protein	-	-	-	-	-	C281G (A94G)	-	-	-	-	-	-
spr1991	glycerol kinase	1168 insertion 11bps*	1168 insertion 11bps*	1168 insertion 11bps*	1168 insertion 11bps*	1168 insertion 11bps*	1168 insertion 11bps*	-	C7T (Q3Stop)	-	G1087A (G363S)	1168 insertion 11bps*	-
sprt01	tRNA- Glu1	-	-	-	-	-	-	A-55 insertion	-	G-35A G-9A <u>TCA-</u> <u>GTT</u> (13-15) <u>G19A</u> <u>A50G</u>	<u>TCA-</u> <u>GTT</u> (13-15) <u>G19A</u> <u>A50G</u>	-	-
sprt30	tRNA- Glu2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A-55 insertion	-
sprt42	tRNA- Glu3	-	-	-	-	-	-	-	<u>TCA-</u> <u>GTT</u> (13-15)* <u>G19A</u> * <u>A50G*</u>	G-9A <u>TCA-</u> <u>GTT</u> (<u>13-15)</u> <u>G19A</u> <u>A50G</u>	G-9A* <u>TCA-</u> <u>GTT</u> (<u>13-15)</u> * <u>G19A</u> * <u>A50G</u> *	-	G-9A <u>TCA-</u> <u>GTT</u> (13-15) <u>G19A</u> <u>A50G</u>
sprt55	tRNA- Glu4	-	-	-	- -	-	-	A-55 insertion	-	-	-	A-55 insertion	<u>TCA-</u> <u>GTT</u> (<u>13-15)</u> <u>G19A</u> <u>A50G</u>
sprr01	16S ribosom al RNA _1	-	T1057A*	T1057A*	T1057G*	T1057G*	T1057G C1049T	-	-	T1057G*	T1057G*	T1057G* C1049T	T1057G C1049T
sprr06	16S ribosom al RNA _2	T1057A or T1057T	T1057A*	T1057A*	T1057G*	T1057G*	A-23G T1057G C1049T	-	T1057G*	T1057G*	T1057G*	T1057G*	A-23G T1057G C1049T
sprr09	16S ribosom al RNA _3	T1057A or T1057T	T1057A or T1057T	T1057A*	T1057G*	T1057G*	T1057G C1049T	-	T1057G*	T1057G*	T1057G*	T1057G*	T1057G
sprr12	16S ribosom al RNA_4	T1057A*	T1057A*	T1057A*	T1057G*	T1057G*	T1057G C1049T	-	T1057G*	T1057G*	T1057G*	T1057G* C1049T	G-23A T1057G C1049T

The same clones tested for antimicrobial susceptibility were sequenced. Unique mutations are listed below. ^a R6M1TGC 1 cl.1: spr0958(T263A); spr1269(C46A); spr1453(C-183T).

R6M1TGC 2 cl.3: spr0032 (T2264G); spr0701 (G529A); spr0794(C230A); spr0972(T-197G);

spr1323(G328T); spr1802(T336G).

R6M1TGC 3 cl.1: spr1453(C-183T).

R6M1TGC 4 cl.2: spr1022 (G782A); spr1327 (C90T); spr1891(T356G).

R6M1TGC 5 cl.3: spr0445(C-417G).

R6M1TGC 5 cl.5: spr1452(A-49G).

^bR6M2TGC-1 cl.1: spr0607(insertion T 420).

R6M2TGC-1 cl.2: spr0969(A1099T G1110T).

R6M2TGC-2 spr0119a(C85T).

R6M2TGC-2 cl.4: spr0051(C309T).

R6M2TGC-3 cl.1: spr0556(805bps dwns 840bps dwn), spr0627(A402C), spr1610(A246T), spr1976(C475T), spr1995(C1737T).

R6M2TGC4 cl.1: spr0110(77bps dwn T-C), spr1272(A520T).

R6M2TGC-5 cl.1: spr0505(C1295T), spr1329(G756A).

R6M2TGC-5 cl.2: spr0668(G644A), spr1179(A-35G C-41G), spr1732(C184T).

*Indicated that the mutation was present in both clones sequenced

<u>Underlines mutations</u> are located downstream of the genes listed.

A hyphen (-) before the mutation indicates that the mutation is located upstream of the gene of interested.

Genes and mutations in **bold** were further studied by resistance reconstruction.

Strains ^a	Mutated all	eles						MIC (µ	g/mL) ^b
	16srRNA_ 1	16srRNA 2	16srRNA _3	16srRNA 4	rpsJ	rpsC	spr1784	TGC	TC
R6	R6	R6	R6	R6	R6	R6	R6	0.031	0.125
R6 ^{rpsL+}	R6	0.031	0.125						
R6 ^{rpsJ(R6M1TGC6)}	R6	R6	R6	R6	R6M1T GC-6	R6	R6	0.125	0.5
R6M1TGC ^{rpsC(R6)-rpsL+}	R6M1TGC -6	R6M1TG C-6	R6M1T GC-6	R6M1TG C-6	R6M1T GC-6	R6	R6M1T GC-6	1	2
R6M1TGC ^{spr1784(R6)-rpsL+}	R6M1TGC -6	R6M1TG C-6	R6M1T GC-6	R6M1TG C-6	R6M1T GC-6	R6M1T GC-6	R6	2	4
R6M2TGC ^{rpsC(R6)-rpsL+}	R6M2TGC -6	R6M2TG C-6	R6M2T GC-6	R6M2TG C-6	R6M2T GC-6	R6	R6M2T GC-6	4	8
R6M2TGC ^{spr1784(R6)-rpsL+}	R6M2TGC -6	R6M2TG C-6	R6M2T GC-6	R6M2TG C-6	R6M2T GC-6	R6M2T GC-6	R6	2	4
T1-R6 ^{rpsJ} (R6M1TGC-6)- 16SrRNA_1_4(R6M1TGC-6)	R6M1TGC -6	R6	R6	R6M1TG C-6	R6M1T GC-6	R6	R6	1	2
T1-R6 ^{rpsJ(R6M1TGC-6)-} 16SrRNA_1_3(R6M1TGC-6)	R6M1TGC -6	R6	R6M1T GC-6	R6	R6M1T GC-6	R6	R6	1	2
T2-R6 ^{rpsJ} (R6M1TGC-6)- 16SrRNA_1_3_4(R6M1TGC-6)	R6M1TGC -6	R6	R6M1T GC-6	R6M1TG C-6	R6M1T GC-6	R6	R6	2	8
T2-R6 ^{rpsJ} (R6M1TGC-6)- 16SrRNA_1_2_3_4(R6M1TGC-6)	R6M1TGC -6	R6M1TG C-6	R6M1T GC-6	R6M1TG C-6	R6M1T GC-6	R6	R6	4	8

Table 3. Resistance reconstruction of TGC mutants

^a*rpsL*+ indicates that an allele conferring resistance to streptomycin was co-transformed along with the PCR fragment of interest for selection purposes.

^b MICs in bold are at least 2 fold different from the parent strain without the mutation.

Supplementary data



Supplementary file 1: Selection of TGC mutants from the *S. pneumoniae* **R6** for (A) R6M1TGC and (B) R6M2TGC. Gray boxes represent the passages that were sequenced and the asterisk.

* Selection that required 48h incubation prior to the next passage.

Primers ^a	Primer sequences
Mutants reconstruction	
<i>rpsJ</i> (L)-F	AGTATCCAGTCCTTCAGCAAAAT
<i>rpsJ</i> (L)-R	GTGTGGGTGATCGTTAGGGTTC
rpsJ-F	ATGGCAAACAAAAAAATCCGTATCC
rpsJ-R	TTAAAGTTTGATTTCTACGT
16s-R	CGAAAACCTTCTTCACTCAC
16s_1-F	GGTCTAGTCTTGTCGAATGC
16s_2-F	AGCGAAATGCTAAAAGAATG
16s_3-F	TCGAAACACACCAAATGTTA
16s_4-F	AGAAGCAGAAGATGGACAAA
<i>rpsC</i> (L)-F_1	AACAAAGCTGCTGAAATCAT
<i>rpsC</i> (L)-R_1	TGTAATATCTGCCACACCTG
<i>rpsC</i> (L)-F_2	CATCTGGTAGTACCCAAGGA
<i>rpsC</i> (L)-R_2	CTGTTTTGATACGAGCGATT
up- <i>rpsC</i> -F	AAGTTTTGAACTCAGCTGTAG
<i>rpsC</i> -R	TTATTTACCTCCTTTAGTGT
spr1784(L)-F	TGCGATTTGTAAAGAATTTGGAGC
spr1784(L)-R	GCCTTTTGTTCAACTCGGGC
spr1784-F	ATGAAAATCGTATCAGGAATC
spr1784-R	TTATCTGACATAGACTGTCAC
spr0062(L)-F	CAGAAACCGTATGGATGGTC
spr0062(L)-R	TTGAGGTTGCCGGATAAGACTG
spr0062-F	GGGAAATCGAAGATGACGAA
spr0062-R	GTGACCAAGGGCAGAAAGAG
spr1945(L)-F	CTGAGAGAAATCGAGACAGA
spr1945(L)-R	TATTCGTGAAGAAATCCAAAGTCG
spr1945-F	ACTACAGCTGCGGTTATTTT
spr1945-R	CTATCCTACCCACTCACCGT
up-spr0825-F	AAAGCTTGAGACTAATTGAT
spr0825-R	TTAAAATCTCGCAGCACTTCC
spr0825(L)-F	ATCCATAGCGATGGTCAAGG
spr0825(L)-R	ACGACATCACCCTCTTGGAC
spr1991(L)-F	GGTATCAGCGACGGTGATAATA
spr1991(L)-R	CATTTCCTAGAAGAATCAGGAT
spr1991-F	GGGATGATGAGATTTTGGAAATCC
spr1991-R	TTAGTCGTCTACTTCCGCAAAG

Supplementary file 2. Primers used in this study

 a (L); primers designed to amplified long PCR fragment containing the locus of interest for resistance reconstruction.

Supplementary file 3. Strains used in this study.

Strains	Description	References
R6	Wild-type	ATCC
		BAA 255
R6M1TGC 1-6	R6 laboratory-derived mutants resistant to	This work
	TGC	
R6M2TGC 1-6	R6 laboratory derived mutants resistant to	This work
	TC	
R6 ^{rpsJ(R6M1TGC-6)}	R6 transformed with <i>rpsJ</i> (spr0187) PCR	This work
	fragment amplified from R6M1TGC-6	
R6M1TGC ^{rpsC(R6)-rpsL+}	R6M1TGC-6 transformed with <i>rpsC</i>	This work
	(spr0187) PCR fragment amplified from	
	R6	
R6M2TGC ^{rpsC(R6)-rpsL+}	R6M2TGC-6 transformed with <i>rpsC</i>	This work
	(spr0187) PCR fragment amplified from	
	R6	
R6M1TGC ^{spr1784(R6)-}	R6M1TGC-6 transformed with spr1784	This work
rpsL+	PCR fragment amplified from R6	
R6M2TGC ^{spr1784(R6)-}	R6M2TGC-6 transformed with spr1784	This work
rpsL+	PCR fragment amplified from R6	
T1-R6M1TGC-1	R6 transformed with genomic DNA of	This work
	R6M1TGC-6 selected on 1.6ug/mL TGC	
	(cl.1)	
T1-R6M1TGC -3	R6 transformed with genomic DNA of	This work
	R6M1TGC-6 selected on 1.6ug/mL TGC	
	(cl.3)	
T2-R6M1TGC3-1	T1-R6M1TGC -3 transformed with	This work
	genomic DNA of R6M1TGC-6 selected	
	on 25.6 ug/mL TGC (cl.1)	
T2-R6M1TGC3-4	T1-R6M1TGC -3 transformed with	This work
	genomic DNA of R6M1TGC-6 selected	
	on 25.6 ug/mL TGC (cl.4)	

Chapitre XI : Discussion générale

11.1 Les mutants résistants à la CIP, TC et TGC

L'étude génomique des mécanismes de résistance repose principalement sur la comparaison entre des souches résistantes et sensibles à un antibiotique donné. Chez S. pneumoniae, sa capacité à introduire naturellement de l'ADN exogène augmente le polymorphisme entre les souches (97), ce qui complique grandement l'analyse comparative des souches cliniques de S. pneumoniae. En effet, le séquençage de souches cliniques résistantes aux antibiotiques peut révéler la présence de plusieurs centaines voire milliers de mutations, ce qui rend l'analyse fonctionnelle de ces changements difficile dû au nombre élevé de cibles à étudier. Bien que l'analyse de plusieurs souches résistantes pourrait faciliter l'analyse des mutations par consensus des mécanismes communs entre les souches étudiées, tel qu'il a été démontré pour l'acquisition de PLPs mosaïques chez des souches de S. pneumoniae résistantes aux β-lactamines (45), des événements plus rares pourraient être manqués par cette méthode d'analyse. L'utilisation de souches isogéniques est une façon de contrecarrer le biais dû au polymorphisme entre les souches. Bien que l'utilisation de souches isogéniques facilite grandement l'analyse des résultats de séquençage, l'utilisation de souches sélectionnées en laboratoire peut entraîner l'apparition de mécanismes de résistance qui ne sont pas cliniquement pertinents. Néanmoins, il est possible de vérifier la présence de ces altérations dans des souches cliniques. Une alternative à cette approche consiste en la transformation de l'ADNg d'une souche donneur (ex : souche clinique résistante à un antibiotique) dans une souche réceptrice sensible, dont on sélectionne les transformants en présence de l'antibiotique à l'étude. Cette technique, nommée « whole genome transformation » constitue une bonne alternative afin de déterminer les allèles mutés impliqués dans la résistance aux antibiotiques chez les souches cliniques, tel que démontré dans notre laboratoire lors de l'étude des mécanismes de résistance clinique à la PG (75).

Dans le cadre de cette thèse, la sélection de souches résistantes à la CIP et à la TC par la méthode de gradient sur gélose s'est avérée être une technique efficace de sélection afin de générer nos mutants, tel qu'il a été décrit précédemment chez *S. pneumoniae* pour la résistance à la PG (74), à la céfotaxime (73) et la LZD (77). Également, la méthode en bouillon s'est avérée être une excellente alternative dans le cas des mutants TGC, pour lesquels la technique en gélose a malheureusement échoué. Combinées avec les techniques de profilage d'ARN, ces techniques nous ont permis de décrire de nouveaux mécanismes aux antibiotiques chez *S. pneumoniae*. La reconstruction de la résistance par l'introduction de fragments PCR contenant les mutations d'intérêt s'est avérée être une technique efficace, bien que fastidieuse, afin d'évaluer le rôle de chacune des mutations dans la résistance chez l'ensemble de nos mutants. La présence de mutations qui ne sont pas responsables directement de la résistance à la CIP chez nos mutants a peut-être un rôle compensatoire à jouer dans la résistance à ces drogues, tel qu'observé pour la LZD (29).

11.1.1 Les mutants résistants à la CIP

Nous avons généré un mutant résistant à la CIP (R6M2B) dont nous avons reconstruit la résistance par cinq étapes successives de transformation d'ADNg chez la souche sauvage sensible R6, jusqu'à l'obtention du transformant T5-R6M2B démontrant un niveau de résistance équivalent à celui du mutant R6M2B. Les souches R6M2B et T5-R6M2B présentent un haut niveau de résistance à la CIP (MIC 128 μ g/mL) et sont sensibilisées par la réserpine (MIC 32 μ g/mL), un inhibiteur de pompes d'efflux en mesure d'interférer avec l'activité du transporteur ABC PatA/PatB chez le pneumocoque (87). Cette sensibilisation est attribuable à la surexpression du transporteur PatA/PatB, tel que démontré par inactivation génique. R6M2B et T5-R6M2B démontrent également une résistance croisée à la LVX (MIC 32 μ g/mL) et au colorant Etbr (MIC 16 μ g/mL). Le séquençage du transformant T5-R6M2B a révélé la présence de cinq gènes mutés dont quatre (*parC, gyrA*, spr1902 et spr0335) ont été liés à la résistance à la CIP. Les mutations pour trois de ces gènes (spr0335, spr1902 et mutations en amont de spr1544) n'étaient pas présentes chez la souche parente R6M2B et S5-R6M2B sur géloses contenant de la CIP. Chez

R6M2B, la séquence du génome a révélé la présence de quatre mutations, dont deux (au niveau des gènes *parC* et *gyrA*) ont été démontrées comme responsables de la résistance partielle (MIC 32 μ g/mL) lorsqu'introduits séquentiellement dans la souche R6.

La technique de WGT pour la reconstruction de la résistance de faible niveau à la CIP chez la souche clinique 60827 n'a requis qu'une seule étape de transformation d'ADNg dérivée de la souche 60827 afin d'obtenir le transformant T1-60827 qui démontre la même CMI à la CIP (2 µg/mL) que la souche parente 60827. Quinze régions de recombinaison, nommées RSS, ont été identifiées dans le génome de T1-60827. Huit de ces régions ne comprenaient qu'un seul gène, alors que les sept autres RSS englobaient les mutations observées au niveau de deux à quatre gènes adjacents. La taille des RSS contenant plus d'un gène (RSS1, RSS3, RSS8, RSS10, RSS13, RSS14 et RSS15) variait d'environ 1,9 kb (RSS3) à 4,5 kb (RSS14) pour une taille moyenne de 2,5 kb. Bien que nous ne puissions affirmer avec certitude que la technique de WGT chez T1-60827 n'ait pas sélectionné d'événements spontanés, le nombre de sites polymorphiques entre 60827 et la souche réceptrice R6 pour chaque RSS rend cette possibilité peu probable. Le segment de recombinaison RSS10 contenant les régions codantes de *patA* et *patB* ainsi que la région promotrice de *patA* est responsable de la résistance à la CIP chez T1-60827. Ces mutations étaient présentes chez la souche parente 60827 ce qui confirme que les mutations ont effectivement été acquises par transformation de la souche parente 60827 chez R6.

11.1.2 Les mutants résistants à la TC

L'acquisition des gènes *tet*(M) et *tet*(O) sont les seuls mécanismes de résistance à la TC décrits chez le pneumocoque (93, 265). Nous avons voulu déterminer si le pneumocoque peut devenir résistant à la TC en l'absence de ces mécanismes de résistance transposables. La présence de mutations impliquées dans la résistance à la TC chez d'autres genres bactériens (*H. pylori* et *N. gonorrhoeae*) laissait en effet présager que la résistance en l'absence de *tet*(M) et *tet*(O) est également possible chez les bactéries à Gram positif. Ceci a été confirmé par la sélection de deux séries de mutants *S. pneumoniae* R6 résistants

à la TC (MIC 8 µg/mL), nommées R6M1TC-5 et R6M2TC-4, pour qui la résistance à la TC sans tet(M) et tet(O) s'accompagne d'une résistance croisée à la CIP et à l'Etbr. La résistance à la TC et la CIP est atténuée en présence de réserpine chez les deux mutants, suggérant que des mécanismes d'efflux sont impliqués dans la résistance à ces deux antibiotiques. Les mutations potentiellement impliquées dans la résistance à la TC chez R6M1TC-5 et R6M2TC-4 ont été identifiées par NGS, le séquençage des intermédiaires de sélection s'étant avéré très utile afin de déterminer l'ordre d'apparition de celles-ci pour les expériences subséquentes de reconstruction de la résistance à la TC. Bien que nos mutants aient été sélectionnés en gélose présentant un gradient, la sélection de deux clones à chacune des étapes de passage nous a permis d'avoir une idée globale de l'apparition des mutations chez ces mutants. Nous nous sommes ensuite intéressés aux mutations récurrentes entre les clones aux différents passages de sélection en présence de TC. Chez R6M1TC-4 et R6M2TC-5, douze locus mutés ont été identifiés dont trois (rpsJ, patA, patB) ont été impliqués dans la résistance. Néanmoins, l'utilisation seule du séquençage ne nous a pas permis de reconstruire complètement la résistance à la TC et la CIP de nos mutants. L'utilisation de techniques de transcriptomique, telles le ARN-seq et le qRT-PCR, combinées à la validation fonctionnelle par inactivation génique se sont avérées essentielles pour expliquer(?) complètement la résistance chez nos mutants. En effet, une fraction de la résistance à la TC et à la CIP reposait sur la surexpression du transporteur PatA/PatB ainsi que sur la surexpression de gènes de la voie de biosynthèse de la thiamine.

11.1.3 Les mutants résistants à la TGC

La résistance à la TGC n'est pas documentée chez le pneumocoque et les mécanismes qui pourraient potentiellement causer la résistance sont inconnus à ce jour. Nous avons généré les souches R6M1TGC-6 et R6M2TGC-6 par croissance de *S. pneumoniae* R6 en présence de concentrations croissantes de TGC en milieu liquide. Les mutants R6M1TGC-6 et R6M2TGC-6 sont hautement résistants à la TGC (MIC 8 μ g/mL) et présentent une résistance croisée à la TC (16 μ g/mL) et à la MI (16 μ g/mL). La réserpine n'a aucun effet sur la sensibilité des mutants, excluant ainsi un rôle pour le transporteur PatA/PatB dans la résistance. Le séquençage des intermédiaires de sélection s'est avéré

nécessaire à la reconstruction de la résistance à la TC et à la TGC. Bien que nous ayons utilisé deux technologies pour notre séquençage (454 : étape finale, Illumina : étapes intermédiaires), les résultats étaient cohérents d'une technologie à l'autre. Le génome des mutants R6M1TGC-6 et R6M2TGC-6 a révélé différentes mutations au niveau de plusieurs loci dont sept (*rpsJ, rpsC*, spr1784 et quatre dans les gènes ARNr 16s) ont été confirmées de façon fonctionnelle par reconstruction de la résistance à la TGC par transformation de fragments PCR et par WGT.

11.2 Mutations dans les gènes parC et gyrA

Les mutations dans les gènes codant pour les sous-unités des topoisomérases de type II sont les mécanismes primaires de résistance aux fluoroquinolones chez les bactéries (40, 59, 191). Chez S. pneumoniae, l'acquisition séquentielle de mutations dans le gène parC puis dans le gène gyrA permet d'obtenir de hauts niveaux de résistance à la CIP. En effet, des niveaux de résistance faibles à la CIP (MIC≤ 16 µg/mL) requierent le plus souvent la présence de mutations dans la région QRDR de parC (118, 191, 240) alors que le haut niveau de résistance à cette fluoroquinolone nécessite la présence de mutations additionnelles dans gyrA (118, 191, 240). Dans cette étude, des mutations dans les régions QRDR des gènes parC et gyrA ont été détectées dans le génome des souches R6M2B et T5-R6M2B hautement résistantes à la CIP (MIC 128 µg/mL). La substitution Ser79Phe, codée par l'allèle *parC* des deux souches résistantes R6M2B et T5-R6M2B, a été transférée chez S. pneumoniae R6 sauvage lors de la première étape de transformation (T1-R6M2B), causant une augmentation de la CMI à la CIP d'un facteur quatre (CMI 2 µg/mL). La mutation Glu85Lys de GyrA a été introduite chez le transformant T2-R6M2B (deuxième étape de transformation) et est responsable d'une augmentation de huit fois de la CMI à la CIP en présence de la substitution Ser79Phe chez ParC. Les substitutions détectées chez nos deux mutants (parC Ser79Phe; gyrA Glu85Lys) ont déjà été observées dans des souches non sensibles à la CIP et à la LVX issues du Canada, des États-Unis et de l'Europe chez qui l'acquisition séquentielle de mutations au niveau de parC et gyrA avait été mise de l'avant comme mécanisme de résistance élevée à la CIP (215, 274), à la lévofloxacine (215, 263) et à plusieurs autres fluoroquinolones respiratoires (20).

11.3 Glycérol-3-phosphate déshydrogénase dépendante du NADPH et la protection contre les ROS induits par la CIP chez *S. pneumoniae*

Les antibiotiques bactéricides, peu importe leurs cibles, tueraient les bactéries en induisant des altérations dans l'homéostasie du fer, ce qui conduirait à l'accumulation de radicaux hydroxyles par la réaction de Fenton et ultimement à la mort cellulaire (141). Cette affirmation reste contestée, entre autres, dû au fait que l'utilisation des antibiotiques en condition anaérobique, où les ROS ne sont pas produits, cause la mort cellulaire (135, 154). Cependant, l'utilisation de la CIP en condition aérobique est souvent liée à une augmentation des niveaux de ROS (7, 22, 188).

Le modèle suggéré par Kohanski et al. est difficilement applicable au pneumocoque, dû à l'absence de plusieurs éléments considérés par ce modèle comme importants à l'induction de la mort cellulaire. En effet, S. pneumoniae ne possède pas la plupart des enzymes du cycle des acides tricarboxyliques et ne possède pas de système classique de réponse au stress et de réparation de l'ADN (réponse SOS), à l'exception de la recombinase RecA (33, 113). Néanmoins, le pneumocoque peut produire une grande quantité de ROS en condition aérobique (jusqu'à 2 mM) qui sont contrés par un système de protection endogène contre le stress oxydatif (196). Il serait ainsi important, pour des études futures, de déterminer le mécanisme de protection contre les ROS induits par les antibiotiques spécifiquement chez le pneumocoque. Des études de transcriptomique sont présentement en cours dans notre laboratoire afin de déterminer la réponse de S. pneumoniae au stress causé par les antibiotiques bactéricides et bactériostatiques dans le temps. Ces études pourront sans doute nous éclairer quant à la réponse de S. pneumoniae au stress causé par les antibiotiques. Néanmoins, les travaux décrits dans cette thèse ont permis d'observer la présence d'une mutation Thr83Ile au niveau d'une glycérol-3phosphate déshydrogénase dépendante du NADPH dans les souches T5-R6M2B, T1-60827

et 60827 résistantes à la CIP. Cette mutation conférerait une protection significative (valeur $p \le 0,05$) contre les dérivés réactifs de l'oxygène en présence des mutations Ser79Phe dans le gène *parC* et Glu85Lys dans le gène *gyrA*. La mutation Thr81le apparaît lors de la première étape de sélection chez T1-60827. Il est possible que l'apparition de cette mutation favorise l'émergence d'autres mutations, telles que *parC* et *gyrA*, responsables de la résistance à la CIP.

Le gène spr1902 code pour une glycérol-3-phosphate déshydrogénase dépendante du NADPH qui permet la conversion du glycérone-phosphate en sn-glycérol-phosphate (glycérol-3-phosphate) par l'oxydation d'une molécule de NADPH (69). L'énantiomère du glycérol-3-phosphate (L-glycérol-3-phosphate) est la forme biologiquement active de la molécule qui entre dans la composition des phosphoglycérides. Chez le pneumocoque, la modulation de la production des acides gras insaturés a déjà été démontrée comme étant dépendante de la présence d'oxygène (197). En effet, en condition anaérobique, où les ROS ne sont pas produits, le contenu membranaire en acides gras insaturés est plus élevé qu'en condition aérobique (197). Ainsi, il serait intéressant de quantifier le contenu en acides gras de la membrane chez nos mutants afin de déterminer si un changement dans le contenu membranaire constiturait une réponse adaptative permettant de mieux résister aux ROS induits par la CIP. De plus, plusieurs molécules présentes de façon constitutive aident à maintenir le potentiel oxydo-réducteur intracellulaire ou à capturer chimiquement les ROS. De ces molécules, on retrouve les antioxydants non-enzymatiques comme le patrimoine intracellulaire de NADPH et NADH, la β -carotène, l'acide ascorbique, l' α -tocophérole et le glutathion (39). Il est possible que la mutation Thr83Ile cause un changement dans le pool de NADPH favorisant la protection contre les ROS causée par la CIP, bien que cette affirmation reste à confirmer.

11.4 Le transporteur PatA/PatB et la multirésistance aux antibiotiques chez *S. pneumoniae*

La multirésistance médiée par l'efflux est un important facteur de résistance intrinsèque ou acquise aux antibiotiques chez les bactéries (voir Introduction Section 3.2.6). Chez *S. pneumoniae*, le transporteur PatA/PatB a déjà été impliqué dans la résistance au EtBr, à la berbérine, à la novobiocine, à l'acriflavine, à l'EM, aux fluoroquinolones, au CM, à la LZD (77, 220) et possiblement à l'oxyTC (bien que ce phénotype n'ait pas été confirmé par des techniques quantitatives) (248). Dans les travaux de cette thèse, le transporteur PatA/PatB a été impliqué dans la résistance chez le deux mutants résistants à la CIP *S. pneumoniae* R6M2B et T1-60827, de même que chez les deux mutants résistants à la TC *S. pneumoniae* R6M1TC-5 et R6M2TC-4. Chez les quatre souches, on a pu observer une sensibilisation en présence de réserpine et la surexpression du transporteur était requise pour la résistance. Bien que la réversion de la résistance en présence de réserpine ne soit pas uniquement liée à l'expression de PatA/PatB chez le pneumocoque (198), mais il semble néanmoins être un bon indicateur de sa surexpression tel que démontré chez des souches cliniques de *S. pneumoniae* résistantes aux fluoroquinolones (86).

11.4.1 La surexpression du transporteur PatA/PatB

La surexpression du transporteur PatA/PatB est un mécanisme important de résistance aux fluoroquinolones. La présence de mutations dans la région régulatrice du gène *patA* a déjà été démontrée comme pouvant augmenter l'expression du gène chez des mutants résistants à la LZD (77). Chez les mutants résistants à la TC R6M1TC-5 et R6M2TC-4, nous avons observé les mutations G-35A et G-48A en amont de *patA* (Figure 11.1). Ces mutations, lorsque introduites dans la souche R6, augmentent l'expression de *patA* à un niveau similaire à celui observé chez les mutants et augmentent de deux fois le niveau de résistance à la TC. La résistance à la TC induite par la surexpression de *patA* et *patB* chez ces mutations dans la région 5' non transcrites de *patA*. Une diminution de l'accumulation de TC diminue la quantité d'antibiotique disponible pour interagir avec sa cible, le ribosome, ce qui augmente la résistance. Dans le cas de la résistance à la CIP, bien que le rôle de la mutation A-33C chez le transformant T1-60827 démontrant un faible niveau de résistance n'ait pas été étudié de façon spécifique, nous pouvons spéculer que

cette mutation puisse également être responsable de la surexpression du transporteur PatA/PatB chez cette souche.

Il a été récemment proposé que des mutations en amont de *patA* puissent conduire à sa surexpression en altérant la force de liaison (ΔG) d'une structure tige-boucle dans la région 5' non traduite de patA (54). L'analyse de la séquence en amont de patA par l'algorithme de prédiction Ribex (2) suggère en effet la présence de trois structures tigeboucle chez S. pneumoniae R6, soit un terminateur transcriptionnel, un antiterminateur et une structure anti-antiterminatrice. La présence des mutations G-35A et G-46A diminuerait le ΔG de la structure du terminateur transcriptionnel, ce qui affaiblirait la structure et augmenterait la transcription. De petites délétions empêchant la formation d'un terminateur transcriptionnel en amont du gène tet(M) et augmentant son expression ont déjà été décrites chez des souches cliniques de S. pneumoniae résistantes à la TC (93). Ainsi, la résistance à la TC médiée par des mécanismes de protection du ribosome comme Tet(M) pourrait causer un excès de TC libre dans la cellule et la surexpression de patA/PatB pourrait diminuer cet excès en expulsant la TC libre à l'extérieur de la cellule. Il serait ainsi intéressant de déterminer si des souches cliniques résistantes à la TC surexpriment le transporteur en présence d'éléments de la famille Tn916. Plus récemment, la présence de trois structures tige-boucles ont été retrouvé en amont du gène du transporteur BmrCD responsable de la multi-résistance chez B. subtilis (213). Des mutations dans la structure du terminateur transcriptionnel et la présence de CM, d'EM et de lincomycine augmentaient la transcription des gènes *bmrCD* (213). Il semble donc possible que l'altération de structures à trois tiges-boucles constitue un mécanisme commun afin de réguler l'expression de transporteurs impliqués dans la multi-résistance aux antibiotiques chez les bactéries.

Chez *S. pneumoniae*, la surexpression du transporteur ABC PatA/PatB n'est pas toujours associée à la présence de mutations dans la région promotrice. En effet, chez des souches générées en laboratoire résistantes aux fluoroquinolones et chez des souches cliniques (70, 86, 87), la surexpression de PatA/PatB s'effectue sans la présence de mutations. De façon similaire, le mutant R6M2B et son transformant T5-R6M2B décrits à la section 8 surexpriment le transporteur en absence de mutations. Bien que le mécanisme

responsable de la surexpression demeure inconnu, on peut supposer quelques possibilités. Les ARN non codants sont des molécules d'ARN capables de lier les protéines et les ARNm afin d'en modifier la fonction (protéines) ou de réguler l'expression d'un transcrit (ARNm). Chez les bactéries, les petits ARNs sont impliqués dans la régulation de la synthèse des acides nucléiques et des acides aminés, le maintien de l'intégrité de l'enveloppe, le renouvellement de la paroi cellulaire et la régulation de l'expression de transporteurs membranaires (174). L'altération de l'activité d'un ARN non-codant peut perturber les fonctions biologiques régulées par ce petit ARN et causer la résistance aux antibiotiques (147). En effet, la surexpression de DsrA, un petit ARN régulant le facteur sigma alternatif RpoS, cause la résistance multiple aux antibiotiques par la surexpression de la pompe d'efflux MdtEF chez E. coli (183). L'analyse du génome de S. pneumoniae TIGR4 a permis d'identifier quatre-vingt-huit ARN non codants. Il est possible que l'un de ceux-ci, codés en *cis* ou en *trans* de *patA* et *patB* régule l'expression du transporteur (3). Il est également possible que chez les mutants R6M2B et T5-R6M2B, la duplication en tandem du locus patA/patB soit responsable de la résistance, tel que récemment démontré chez la souche S. pneumoniae M168 (21), un mutant sélectionné en laboratoire à partir de la souche clinique M4 en présence de réserpine (87). Le mutant M168 est résistant à la réserpine, la CIP, à la norfloxacine, à la LVX, à l'Etbr, à l'acriflavine et aux centrimides (21).

11.4.2 Mutations dans la région codante de patA et patB

Dans cette étude, nous avons démontré que des mutations dans les régions codantes des gènes *patA* et *patB* peuvent induire un faible niveau de résistance à la CIP, à la TC et au Etbr. Contrairement à la surexpression du transporteur PatA/PatB, l'implication de mutations dans la région codante de ces gènes dans la résistance n'a jamais été décrite chez *S. pneumoniae*. Un total de six mutations ont été observées chez les mutants résistants à la CIP (souche 60827 et son transformant T1-60827) et à la TC (mutants R6M1TC-5 et R6M2TC-6) (Figure 11.1).

Chez le transformant T1-60827 démontrant une résistance à la CIP de bas niveau, la mutation Arg112Leu chez PatA et les mutations Ser48Ala et Ala503Thr chez PatB ont été observées. Bien que la substitution Arg112Leu n'ait pas pu être caractérisée de façon spécifique l'acquisition de la mutation A-33C en amont de *patA* combinée à la substitution Arg112Leu cause une augmentation de la résistance à la CIP d'un facteur deux. L'acquisition des mutations Ser48Ala et Ala503Thr chez PatB augmente également de deux fois la résistance à la CIP lorsque introduites dans la souche S. pneumoniae R6 sauvage. Selon la structure de SAV1866, un transporteur ABC de S. aureus responsable de la multi-résistance aux antibiotiques, la mutation Arg112Leu chez PatA serait localisée dans la première hélice cytoplasmique, entre la deuxième et troisième hélice transmembranaire. Cette hélice cytoplasmique serait importante pour l'activité du transporteur en participant au changement de conformation causé par la liaison et l'hydrolyse de l'ATP qui est ensuite transmis du domaine liant l'ATP vers le domaine transmembranaire pour la translocation du substrat (60). Pour PatB, la substitution Ser48Ala est prédite au niveau de la première hélice transmembranaire, alors que la substitution Ala503Thr serait localisée au niveau de la queue carboxyle-terminale hydrophile de la protéine. Dans le transporteur MDR1 humain, la première hélice transmembranaire participerait à l'interaction du transporteur avec le substrat (60).

Chez les mutants TC, nous avons observé trois mutations impliquées dans la résistance à la TC conférant une résistance croisée à la CIP et à l'Etbr. Celles-ci sont retrouvées dans la région codante de *patA* (Met170Ile; Gly287Glu et Arg295Ser) uniquement. La mutation Gly265Glu présente dans *patB* n'a pu être reliée à la résistance chez le mutant R6M2TC-4. Les mutations Met170Ile et Arg295Ser augmentent le phénotype de résistance à la TC, à la CIP et à l'Etbr, alors que la mutation Gly287Glu ne semble causer de la résistance qu'à la CIP et à l'Etbr. L'ensemble des mutations dans le gène *patA* serait retrouvé dans les hélices transmembranaires et, selon la structure de SAV1866 chez *S. aureus*, la mutation Met170Ile serait présente dans la quatrième hélice transmembranaire, alors que Gly287Glu et Arg295Ser seraient localisées au niveau de la sixième hélice (60). Les résidus des hélices un, quatre à six et dix à douze dans le transporteur homologue humain MDR1 participent à l'interaction entre le transporteur et

son substrat (155). Cependant, aucun site de liaison du substrat n'a été défini jusqu'à maintenant pour les transporteurs ABC exportateurs chez les bactéries, ce qui complique la spéculation quant au rôle précis de ces mutations dans la résistance (106, 107).



Figure 11.1. Schéma des mutations dans l'opéron *patA-patB* impliquées dans la résistance dans cette étude. Les mutations en bleu ont été répertoriées chez les mutants TC, alors que les mutations en rouge ont été trouvées chez les mutants CIP. Les mutations en noirs ont déjà été décrites.

L'acquisition de mutations dans les régions codantes de *patA* et *patB*, ainsi que dans la région promotrice de patA causent la résistance de faible niveau à la TC, à la CIP et à l'Etbr chez *S. pneumoniae*. Ces mutations peuvent causer une diminution de la sensibilité à d'autres agents antimicrobiens auxquels la bactérie n'a pas été exposée. Chez les bactéries, l'acquisition de mécanismes causant de faible niveau de résistance peut favoriser l'émergence de souches résistances ayant un intérêt clinique (166). Il est possible que la diminution de la sensibilité aux antibiotiques par l'acquisition de mécanismes de résistance plus efficace, tel les mutations dans les gènes des topoisomérases de type II en présence de fluoroquinolones. Ainsi, il serait intéressant de déterminer si, chez des souches cliniques, les mutations dans les régions codantes de *patA* et *patB* et dans la région promotrice de *patA* contribuent à l'émergence de la résistance aux antibiotiques chez le pneumocoque.

11.5 Utilisation de l'ARN-seq pour l'étude de la résistance chez le pneumocoque

Chez les mutants R6M1TC-5 et R6M2TC-4, l'introduction d'allèles mutés n'a pas permis de reconstruire complètement la résistance à la TC (et à la CIP). L'utilisation du séquençage de l'ARN, une technique globale de profilage du transcriptome, combinée à des études fonctionnelles par inactivation génique s'est avérée essentielle pour reconstruire complètement la résistance chez nos mutants. Nous avons ainsi déterminé le profil d'expression des gènes chez les mutants R6M1TC-5 et R6M2TC-4 et l'avons comparé à la souche parente R6 sauvage. Puisque nous avons utilisé des souches isogéniques dérivées de *S. pneumoniae* R6, nous avons utilisé l'algorithme Cufflinks (250) qui permet l'assemblage des transcriptomes selon un génome de référence en se basant sur le génome annoté de R6. L'analyse des transcrits du génome de *S. pneumoniae* R6 a démontré que chez R6M1TC-5, quarante-trois gènes étaient surexprimés et trente-et-un étaient sous-exprimés (valeur $p \le 0.015$). Chez R6M2TC-4, soixante gènes étaient surexprimés et vingt-six étaient significativement sous-exprimés. Pour les deux souches résistantes, une surexpression des gènes *patA* et *patB* a été observée et la confirmation de la surexpression de *patA* par PCR quantitative en temps réel corrélait avec le niveau de surexpression mesuré par ARN-seq.

Déterminer les fonctions altérées lors d'études transcriptomiques comparatives peut s'avérer une tâche complexe puisqu'une simple analyse de la liste des gènes dont l'expression est altérée ne donne généralement pas une vue d'ensemble des processus et des fonctions modifiées. L'ontologie de gènes (GO) est une base de données destinée à structurer la description des gènes et des produits géniques selon une ontologie commune pour toutes les espèces (15). Dans le cadre de GO, les propriétés des produits géniques sont décrites selon trois axes : les composants cellulaires auxquels ils participent, les fonctions moléculaires réalisées et les processus biologiques impliqués. Nous avons utilisé la classification GO pour déterminer les compartiments cellulaires, les fonctions moléculaires et les processus biologiques significativement enrichis (valeur p ≤ 0.015) chez les gènes modulés de R6M1TC-5 et R6M2TC-4. Chez R6M1TC, les gènes surexprimés par ARN-

seq étaient principalement enrichis en processus biologiques liés au métabolisme de la thiamine, alors que chez R6M2TC-4 les processus et fonctions biologiques enrichis étaient liés aux métabolismes des carbohydrates et au transport, mais pas directement liés au métabolisme de la thiamine. Cependant, une analyse plus approfondie des résultats d'ARNseq a démontré que l'expression de plusieurs gènes du métabolisme de thiamine était également augmentée chez R6M2TC-4 lorsque le seuil de la valeur p était augmenté à $p \le p$ 0,05. La PCR quantitative des gènes spr0632, spr0634, spr0637 et spr0638, qui sont tous impliqués dans la voie de biosynthèse et de récupération de la thiamine, a confirmé que l'expression de ceux-ci était en effet augmentée chez les deux mutants. Chez R6M1TC-5 et R6M2TC-4, l'inactivation du gène spr0632 codant pour la sous-unité ATPase d'un transporteur ABC potentiellement responsable de l'import de l'HMP, un précurseur de la biosynthèse de la thiamine, à partir du milieu extracellulaire diminue la résistance à la TC. De plus, chez R6M2TC-4, l'inactivation des gènes spr0634, codant pour une thiaminase, et spr0638, codant pour une phosphométhylpyrimidine kinase, diminue la résistance à la TC. Il est intéressant de noter que la surexpression du gène spr0632 a également été observée chez deux des cinq souches S. pneumoniae cliniques résistantes à la TC que nous avons caractérisées, alors qu'aucune des cinq souches cliniques sensibles testées ne surexprime ce gène. Une augmentation du métabolisme de la thiamine pourrait donc également avoir une importance clinique dans la résistance à la TC. Pour les gènes sous-exprimés, nous avons pu observer un enrichissement des processus biologiques liés aux métabolismes des alcool/polyol/glycérol et des organophosphates.

La surexpression de plusieurs gènes de la voie de récupération et de biosynthèse de la thiamine chez les souches résistantes à la TC sous-entend que la voie de récupération de l'HMP pourrait agir en tant que réponse adaptative au stress causé par la TC. Cette réponse permettrait à la bactérie de résister davantage à la TC, soit en augmentant le métabolisme de certaines enzymes utilisant la thiamine pyrophosphate comme substrat (pyruvate déshydrogénase, 2-oxoglutarate déshydrogénase et les transkétolases) (67) ou en produisant des alarmones lui permettant de réagir au stress causé par l'antibiotique (27, 81, 129, 142, 146, 211, 252). Pendant un état de carence en acides aminés, *E. coli* accumule un dérivé triphosphorylé de la vitamine B1, la thiamine triphosphate, qui agit en tant qu'alarmone et

permet l'adaptation de la bactérie à ce changement d'état nutritionnel par l'activation d'une cascade d'événements. Puisque l'inhibition de la traduction par la TC peut reproduire un état de carence en acides aminés, nous croyons que la surexpression des gènes liés à la voie de la thiamine chez les mutants R6M1TC-5 et R6M2TC-4 permet l'adaptation de nos mutants face à ce stress (27, 146). Ainsi, des études de métabolomique sur les souches R6M1TC5 et R6M2TC-4 seraient intéressantes afin de mieux comprendre les changements survenant dans la voie de biosynthèse de la thiamine chez nos mutants.

11.6 Mécanismes de résistance à la TGC chez le pneumocoque

La caractérisation génomique des mutants R6M1TGC-6 et R6M2TGC-6 résistants à la TGC suivie d'expériences de reconstruction de la résistance a démontré que l'acquisition de mutations au niveau de protéines ribosomales (S3 et S10) associées à la sous-unité 30S du ribosome, au niveau de l'ARNr 16S et au niveau d'une potentielle méthyltransférase de l'ARNr 16S étaient responsables de la résistance à la TGC, à la TC et à la MI chez les deux mutants. Il est intéressant de noter que des mutations au niveau de la protéine ribosomale S10 ont également été impliquées dans la résistance à la TC chez les mutants S. pneumoniae R6M1TC-5 et R6M1TC-4 décrits à la section 9. Chez les mutants résistants à la TGC (R6M1TGC-6 et R6M2TGC-6) ou à la TC (R6M1TC-5 et R6M1TC-4), l'acquisition de mutations dans la protéine ribosomale S10 constitue la première modification à apparaître lors de la sélection et à être impliquée dans la résistance par reconstructions phénotypiques. Les substitutions Lys57Glu, Asp60Tyr ainsi que la délétion des nucléotides 175-180 diminuent de quatre à huit fois la sensibilité à la TC, alors que la mutation Asp60Tyr diminue la sensibilité à la TGC de quatre fois comparativement à S. pneumoniae R6 sauvage. Des mutations à la position Lys57 avaient déjà été observées chez des souches de N. gonorrhoeae résistantes à la TC (115) et chez des souches de K. pneumoniae résistantes à la TGC (257). Bien qu'aucune protéine ribosomale n'ait été impliquée directement dans la liaison de la TC et de la TGC au site primaire sur le ribosome (35, 119), l'ensemble des mutations au niveau de la protéine ribosomale S10 observées chez nos mutants sont présentes dans une boucle conservée constituée des acides aminés 50 à 60 (35) et qui est située à 8.5 Ångström du site de liaison de la TC et de la TGC (35). Il est donc possible que les substitutions observées chez nos mutants altèrent de façon locale la structure du ribosome pour ainsi diminuer l'affinité de la TC et de la TGC pour celui-ci. Des mutations similaires à celles observées chez nos mutants au niveau de la boucle conservée de RpsJ pourraient servir d'outil de diagnostic advenant l'émergence de résistance à la TGC chez le pneumocoque. Cependant, des études préalables quant à la pertinence clinique de ce mécanisme de résistance chez le pneumocoque seraient nécessaires.

Contrairement aux mutations RpsJ, les substitutions Lys4Arg et His175Asp au niveau de la protéine ribosomale S3 sont apparues tardivement lors de la sélection des mutants R6M1TGC-6 et R6M2TGC-5. Bien que les changements observés dans *rpsC* soient relativement éloignés des résidus 155 à 165 qui forment une boucle située à 8.8 Ångström du site de liaison de la TC (35), il est possible que les modifications observées dans la protéine ribosomale S3 diminuent l'affinité des TCs pour le ribosome en altérant la conformation du site de liaison de la TC et de la TGC (35). De plus, dans le cas de la TGC, ces mutations pourraient interférer avec la coordination des ions magnésium permettant la liaison de la TGC, ce qui causerait la résistance à la TGC (119).

Chez R6M1TGC-6 et R6M2TGC-6, le séquençage des génomes des mutants et des intermédiaires a révélé la présence de trois mutations situées dans l'H34 de l'ARNr 16S (voir Introduction Section 5.2). Les mutations T1057A et T1057G sont toutes deux acquises tôt lors de la sélection des mutants, comparativement à C1049G qui est acquise tardivement. Néanmoins, il est intéressant de noter que l'acquisition des mutations T1057G et C1049G au niveau des quatre copies de l'ARNr 16S chez *S. pneumoniae* se fait de façon graduelle et que plus le nombre de copies mutées est élevé, plus la résistance à la TGC augmente. La position C1049 est homologue de la position C1054 chez *E. coli* qui est importante pour la liaison de la partie 9-tert-butylaminoacétamido de la TGC (119). Cette interaction explique l'affinité accrue de la TGC pour le ribosome en comparaison aux autres (119) TCs et une mutation de cette base pourrait donc grandement diminuer l'affinité de la TGC pour le ribosome (119). Bien que les mutations à la position T1057 (T1062
nomenclature *E.coli*) ne soient pas directement impliquées dans la liaison de la TC et la TGC, elles sont situées à huit nucléotides du site C1054. Ceci pourrait possiblement interférer avec la liaison de la TGC au site C1054, comme il a déjà été démontré pour la transversion C1058G (nomenclature *E.coli*) impliquée dans la résistance à la TC chez *P. acnes* (223).

Finalement, l'acquisition de la mutation non-sens Ser140Stop dans une méthyltransférase (spr1784) chez les mutants R6M1TGC-6 et R6M2TGC-5 engendre un faible niveau de résistance à la TGC. Cette potentielle méthyltransférase de l'ARNr 16S ne possède qu'une faible similarité avec la séquence en acides aminés de *trm* (24%), une méthyltransférase dépendante de SAM qui cause la résistance à la TGC lorsque inactivée par des mutations non-sens chez *A. baumannii* (44). L'analyse par BLAST de spr1784 démontre une homologie avec la méthyltransférase RsmD de *E. coli* qui méthyle spécifiquement la position N(2) de la Guanine 966 de l'H31 de l'ARNr 16s (149), mais il sera nécessaire de vérifier expérimentalement que la position G966 est également le site de méthylation du produit du gène spr1784.

Conclusion

Dans cette étude, nous avons voulu mettre en évidence de nouveaux marqueurs de la résistance aux antibiotiques chez *S. pneumoniae* en profitant des avantages offerts par les techniques de génomiques et de transciptomiques de nouvelle génération. Les techniques de séquençage et de transcriptomique à haut débit combinées à une validation fonctionnelle se sont avérées utiles afin de caractériser des mécanismes de résistance déjà connus chez le pneumocoque, mais également pour découvrir de nouveaux gènes impliqués dans la résistance et dans la multi-résistance aux antibiotiques chez *S. pneumoniae*.

En conclusion de ce travail, nous avons démontré que *S. pneumoniae* peut acquérir des mécanismes secondaires de résistance en réponse à une pression de sélection antibiotique. Par exemple, la résistance de haut niveau à la CIP chez les souches que nous avons étudiées nécessite la protection contre les ROS conférée par l'acquisition d'une mutation dans une glycérol-3-phosphate déshydrogénase dépendante du NADPH. La surexpression du transporteur ABC PatA/PatB, un des systèmes de détoxification de la bactérie en réponse à un stress qui entraîne la multi-résistance chez le pneumocoque, peut causer la résistance à la TC en diminuant son accumulation dans la cellule. Nous avons également démontré que l'acquisition de mutations dans les régions codantes des gènes *patA* et *patB* contribue à une résistance de faible niveau à la CIP et à la TC chez *S. pneumoniae*. Enfin, la surexpression de la voie de récupération de l'HMP semble causer un avantage sélectif chez le pneumocoque en réponse à la TC. Finalement, la résistance à la TGC chez *S. pneumoniae* repose sur l'acquisition de mutations (*rpsJ, rpsC* et l'ARNr 16s) à proximité du site primaire de liaison de la TGC sur la sous-unité 30S du ribosome ou dans une méthyltransférase pouvant possiblement modifier le site de liaison de la TGC.

Dans cette thèse, nous avons mis en lumière de nouveaux marqueurs impliqués dans la résistance à la CIP et aux TCs chez *S. pneumoniae*. Également, nous avons décrit pour la première fois les mécanismes de résistance à la TGC chez le pneumocoque. Il serait intéressant de poursuivre avec des études fonctionnelles plus poussées impliquant par

exemple des méthodes de métabolomique et de protéomique afin de complémenter les études effectuées et d'ainsi déterminer les changements biochimiques et cellulaires associés à la sélection de ces nouveaux marqueurs.

Bibliographie

- 1. 2007. Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization--WHO position paper, p. 93-104, Releve epidemiologique hebdomadaire / Section d'hygiene du Secretariat de la Societe des Nations = Weekly epidemiological record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations, 2007/03/27 ed, vol. 82.
- 2. Abreu-Goodger, C., and E. Merino. 2005. RibEx: a web server for locating riboswitches and other conserved bacterial regulatory elements. Nucleic acids research 33:W690-692.
- 3. Acebo, P., A. J. Martin-Galiano, S. Navarro, A. Zaballos, and M. Amblar. 2012. Identification of 88 regulatory small RNAs in the TIGR4 strain of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. RNA 18:530-546.
- 4. Ada, G. 2001. Vaccines and vaccination. The New England journal of medicine 345:1042-1053.
- Adam, H. J., K. N. Schurek, K. A. Nichol, C. J. Hoban, T. J. Baudry, N. M. Laing, D. J. Hoban, and G. G. Zhanel. 2007. Molecular characterization of increasing fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates in Canada, 1997 to 2005. Antimicrobial agents and chemotherapy 51:198-207.
- 6. Adrian, P. V., D. Bogaert, M. Oprins, S. Rapola, M. Lahdenkari, T. Kilpi, R. de Groot, H. Kayhty, and P. W. Hermans. 2004. Development of antibodies against pneumococcal proteins alpha-enolase, immunoglobulin A1 protease, streptococcal lipoprotein rotamase A, and putative proteinase maturation protein A in relation to pneumococcal carriage and Otitis Media. Vaccine 22:2737-2742.
- 7. Aiassa, V., A. I. Barnes, and I. Albesa. 2010. Resistance to ciprofloxacin by enhancement of antioxidant defenses in biofilm and planktonic Proteus mirabilis. Biochemical and biophysical research communications **393**:84-88.
- 8. Akiyama, T., J. Presedo, and A. A. Khan. 2013. The tetA gene decreases tigecycline sensitivity of Salmonella enterica isolates. International journal of antimicrobial agents 42:133-140.
- 9. **Al-Hamad, A., M. Upton, and J. Burnie.** 2009. Molecular cloning and characterization of SmrA, a novel ABC multidrug efflux pump from Stenotrophomonas maltophilia. The Journal of antimicrobial chemotherapy **64:**731-734.
- Albert, T. J., D. Dailidiene, G. Dailide, J. E. Norton, A. Kalia, T. A. Richmond, M. Molla, J. Singh, R. D. Green, and D. E. Berg. 2005. Mutation discovery in bacterial genomes: metronidazole resistance in Helicobacter pylori. Nature methods 2:951-953.
- 11. Alekshun, M. N., and S. B. Levy. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell **128**:1037-1050.
- Antti, H., A. Fahlgren, E. Nasstrom, K. Kouremenos, J. Sunden-Cullberg, Y. Guo, T. Moritz, H. Wolf-Watz, A. Johansson, and M. Fallman. 2013. Metabolic profiling for detection of Staphylococcus aureus infection and antibiotic resistance. PloS one 8:e56971.

- 13. **Appelbaum, P. C.** 2002. Resistance among *Streptococcus pneumoniae*: Implications for drug selection. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America **34**:1613-1620.
- 14. **Arya, S. C., and N. Agarwal.** 2010. Emergence of tigecycline resistance amongst multi-drug resistant gram negative isolates in a multi-disciplinary hospital. The Journal of infection **61:**358-359.
- Ashburner, M., C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, M. A. Harris, D. P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J. C. Matese, J. E. Richardson, M. Ringwald, G. M. Rubin, and G. Sherlock. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nature genetics 25:25-29.
- 16. **Austrian, R.** 1976. The quellung reaction, a neglected microbiologic technique. The Mount Sinai journal of medicine, New York **43**:699-709.
- 17. Avery, O. T., C. M. Macleod, and M. McCarty. 1944. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types : Induction of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type Iii. The Journal of experimental medicine **79:**137-158.
- Avrain, L., M. Garvey, N. Mesaros, Y. Glupczynski, M. P. Mingeot-Leclercq, L. J. Piddock, P. M. Tulkens, R. Vanhoof, and F. Van Bambeke. 2007. Selection of quinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* exposed in vitro to subinhibitory drug concentrations. The Journal of antimicrobial chemotherapy 60:965-972.
- 19. **Balode, A., V. Punda-Polic, and M. J. Dowzicky.** 2013. Antimicrobial susceptibility of gram-negative and gram-positive bacteria collected from countries in Eastern Europe: results from the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.) 2004-2010. International journal of antimicrobial agents **41**:527-535.
- Bast, D. J., D. E. Low, C. L. Duncan, L. Kilburn, L. A. Mandell, R. J. Davidson, and J. C. de Azavedo. 2000. Fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: contributions of type II topoisomerase mutations and efflux to levels of resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy 44:3049-3054.
- 21. **Baylay, A. J.** 2013. Regulation of the PatAB efflux pump in *Streptococcus pneumoniae*. University of Birmingham.
- 22. Becerra, M. C., and I. Albesa. 2002. Oxidative stress induced by ciprofloxacin in *Staphylococcus aureus*. Biochemical and biophysical research communications 297:1003-1007.
- 23. Becker, P., R. Hakenbeck, and B. Henrich. 2009. An ABC transporter of *Streptococcus pneumoniae* involved in susceptibility to vancoresmycin and bacitracin. Antimicrobial agents and chemotherapy **53**:2034-2041.
- 24. Bentley, S. D., D. M. Aanensen, A. Mavroidi, D. Saunders, E. Rabbinowitsch, M. Collins, K. Donohoe, D. Harris, L. Murphy, M. A. Quail, G. Samuel, I. C. Skovsted, M. S. Kaltoft, B. Barrell, P. R. Reeves, J. Parkhill, and B. G. Spratt. 2006. Genetic analysis of the capsular biosynthetic locus from all 90 pneumococcal serotypes. PLoS genetics 2:e31.
- 25. Bergmann, S., and S. Hammerschmidt. 2006. Versatility of pneumococcal surface proteins. Microbiology 152:295-303.

- 26. **Bermingham, A., and J. P. Derrick.** 2002. The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: evaluation of potential for antibacterial drug discovery. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology **24:**637-648.
- Bettendorff, L., B. Wirtzfeld, A. F. Makarchikov, G. Mazzucchelli, M. Frederich, T. Gigliobianco, M. Gangolf, E. De Pauw, L. Angenot, and P. Wins. 2007. Discovery of a natural thiamine adenine nucleotide. Nature chemical biology 3:211-212.
- 28. **Biedenbach, D. J., M. A. Toleman, T. R. Walsh, and R. N. Jones.** 2006. Characterization of fluoroquinolone-resistant beta-hemolytic Streptococcus spp. isolated in North America and Europe including the first report of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). Diagnostic microbiology and infectious disease **55**:119-127.
- 29. Billal, D. S., J. Feng, P. Leprohon, D. Legare, and M. Ouellette. 2011. Whole genome analysis of linezolid resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals resistance and compensatory mutations. BMC genomics 12:512.
- 30. Bisson, G. P., C. Mehaffy, C. Broeckling, J. Prenni, D. Rifat, D. S. Lun, M. Burgos, D. Weissman, P. C. Karakousis, and K. Dobos. 2012. Upregulation of the phthiocerol dimycocerosate biosynthetic pathway by rifampin-resistant, rpoB mutant *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of bacteriology 194:6441-6452.
- 31. Boncoeur, E., C. Durmort, B. Bernay, C. Ebel, A. M. Di Guilmi, J. Croize, T. Vernet, and J. M. Jault. 2012. PatA and PatB Form a Functional Heterodimeric ABC Multidrug Efflux Transporter Responsible for the Resistance of *Streptococcus pneumoniae* to Fluoroquinolones. Biochemistry **51**:7755-7765.
- 32. Bouchillon, S. K., D. J. Hoban, B. M. Johnson, J. L. Johnson, A. Hsiung, and M. J. Dowzicky. 2005. In vitro activity of tigecycline against 3989 Gram-negative and Gram-positive clinical isolates from the United States Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST Program; 2004). Diagnostic microbiology and infectious disease 52:173-179.
- 33. Boutry, C., B. Delplace, A. Clippe, L. Fontaine, and P. Hols. 2013. SOS response activation and competence development are antagonistic mechanisms in *Streptococcus thermophilus*. Journal of bacteriology **195**:696-707.
- 34. **Brochet, M., E. Couve, M. Zouine, C. Poyart, and P. Glaser.** 2008. A naturally occurring gene amplification leading to sulfonamide and trimethoprim resistance in *Streptococcus agalactiae*. Journal of bacteriology **190:**672-680.
- 35. Brodersen, D. E., W. M. Clemons, Jr., A. P. Carter, R. J. Morgan-Warren, B. T. Wimberly, and V. Ramakrishnan. 2000. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. Cell 103:1143-1154.
- Brown, J. S., A. D. Ogunniyi, M. C. Woodrow, D. W. Holden, and J. C. Paton. 2001. Immunization with components of two iron uptake ABC transporters protects mice against systemic *Streptococcus pneumoniae* infection. Infection and immunity 69:6702-6706.
- 37. Browne, F. A., C. Clark, B. Bozdogan, B. E. Dewasse, M. R. Jacobs, and P. C. Appelbaum. 2002. Single and multi-step resistance selection study in *Streptococcus pneumoniae* comparing ceftriaxone with levofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin. International journal of antimicrobial agents **20**:93-99.

- 38. Bruckner, R., M. Nuhn, P. Reichmann, B. Weber, and R. Hakenbeck. 2004. Mosaic genes and mosaic chromosomes-genomic variation in *Streptococcus pneumoniae*. International journal of medical microbiology : IJMM **294:**157-168.
- 39. **Cabiscol, E., J. Tamarit, and J. Ros.** 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology **3:**3-8.
- 40. **Canton, R., M. Morosini, M. C. Enright, and I. Morrissey.** 2003. Worldwide incidence, molecular epidemiology and mutations implicated in fluoroquinolone-resistant *Streptococcus pneumoniae*: data from the global PROTEKT surveillance programme. The Journal of antimicrobial chemotherapy **52**:944-952.
- 41. Cash, P., E. Argo, L. Ford, L. Lawrie, and H. McKenzie. 1999. A proteomic analysis of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Electrophoresis 20:2259-2268.
- Cassone, M., M. M. D'Andrea, F. Iannelli, M. R. Oggioni, G. M. Rossolini, and G. Pozzi. 2006. DNA microarray for detection of macrolide resistance genes. Antimicrobial agents and chemotherapy 50:2038-2041.
- 43. CDC. Pneumococcal Disease, [Online]. http://www.cdc.gov/pneumococcal/clinicians/streptococcus-pneumoniae.html (October 3rd 2014)
- 44. Chen, Q., X. Li, H. Zhou, Y. Jiang, Y. Chen, X. Hua, and Y. Yu. 2014. Decreased susceptibility to tigecycline in *Acinetobacter baumannii* mediated by a mutation in trm encoding SAM-dependent methyltransferase. The Journal of antimicrobial chemotherapy **69**:72-76.
- 45. Chewapreecha, C., P. Marttinen, N. J. Croucher, S. J. Salter, S. R. Harris, A. E. Mather, W. P. Hanage, D. Goldblatt, F. H. Nosten, C. Turner, P. Turner, S. D. Bentley, and J. Parkhill. 2014. Comprehensive identification of single nucleotide polymorphisms associated with beta-lactam resistance within pneumococcal mosaic genes. PLoS genetics 10:e1004547.
- 46. Choi, C. W., S. H. Yun, S. O. Kwon, S. H. Leem, J. S. Choi, C. Y. Yun, and S. I. Kim. 2010. Analysis of cytoplasmic membrane proteome of *Streptococcus pneumoniae* by shotgun proteomic approach. J Microbiol **48**:872-876.
- 47. Choi, S. C., J. Parker, V. P. Richards, K. Ross, B. Jilly, and J. Chen. 2014. Draft Genome Sequence of an Atypical Strain of *Streptococcus pneumoniae* Isolated from a Respiratory Infection. Genome announcements **2**.
- 48. Cochetti, I., E. Tili, M. Mingoia, P. E. Varaldo, and M. P. Montanari. 2008. erm(B)-carrying elements in tetracycline-resistant pneumococci and correspondence between Tn1545 and Tn6003. Antimicrobial agents and chemotherapy **52**:1285-1290.
- 49. **Courvalin, P., and C. Carlier.** 1986. Transposable multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Molecular & general genetics : MGG **205**:291-297.
- 50. Coyne, S., N. Rosenfeld, T. Lambert, P. Courvalin, and B. Perichon. 2010. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy **54**:4389-4393.
- 51. Crook, D. W., and B. G. Spratt. 1998. Multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. British medical bulletin **54**:595-610.

- 52. Croucher, N. J., C. Chewapreecha, W. P. Hanage, S. R. Harris, L. McGee, M. van der Linden, J. H. Song, K. S. Ko, H. de Lencastre, C. Turner, F. Yang, R. Sa-Leao, B. Beall, K. P. Klugman, J. Parkhill, P. Turner, and S. D. Bentley. 2014. Evidence for soft selective sweeps in the evolution of pneumococcal multidrug resistance and vaccine escape. Genome biology and evolution 6:1589-1602.
- 53. Croucher, N. J., S. R. Harris, L. Barquist, J. Parkhill, and S. D. Bentley. 2012. A high-resolution view of genome-wide pneumococcal transformation. PLoS pathogens 8:e1002745.
- 54. Croucher, N. J., A. M. Mitchell, K. A. Gould, D. Inverarity, L. Barquist, T. Feltwell, M. C. Fookes, S. R. Harris, J. Dordel, S. J. Salter, S. Browall, H. Zemlickova, J. Parkhill, S. Normark, B. Henriques-Normark, J. Hinds, T. J. Mitchell, and S. D. Bentley. 2013. Dominant role of nucleotide substitution in the diversification of serotype 3 pneumococci over decades and during a single infection. PLoS genetics 9:e1003868.
- 55. Cui, L., H. M. Neoh, M. Shoji, and K. Hiramatsu. 2009. Contribution of vraSR and graSR point mutations to vancomycin resistance in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial agents and chemotherapy **53**:1231-1234.
- 56. Cvitkovitch, D. G., Y. H. Li, and R. P. Ellen. 2003. Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. The Journal of clinical investigation 112:1626-1632.
- 57. **Dahl, E. L., J. L. Shock, B. R. Shenai, J. Gut, J. L. DeRisi, and P. J. Rosenthal.** 2006. Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Antimicrobial agents and chemotherapy **50**:3124-3131.
- 58. Dailidiene, D., M. T. Bertoli, J. Miciuleviciene, A. K. Mukhopadhyay, G. Dailide, M. A. Pascasio, L. Kupcinskas, and D. E. Berg. 2002. Emergence of tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*: multiple mutational changes in 16S ribosomal DNA and other genetic loci. Antimicrobial agents and chemotherapy 46:3940-3946.
- 59. Davies, T. A., R. Goldschmidt, S. Pfleger, M. Loeloff, K. Bush, D. F. Sahm, and A. Evangelista. 2003. Cross-resistance, relatedness and allele analysis of fluoroquinolone-resistant US clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* (1998-2000). The Journal of antimicrobial chemotherapy 52:168-175.
- 60. **Dawson, R. J., and K. P. Locher.** 2006. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. Nature **443**:180-185.
- 61. **Dean, C. R., M. A. Visalli, S. J. Projan, P. E. Sum, and P. A. Bradford.** 2003. Efflux-mediated resistance to tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Antimicrobial agents and chemotherapy **47:**972-978.
- 62. Doan, T. L., H. B. Fung, D. Mehta, and P. F. Riska. 2006. Tigecycline: a glycylcycline antimicrobial agent. Clinical therapeutics **28**:1079-1106.
- 63. **Dobrindt, U., and J. Hacker.** 2001. Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. Current opinion in microbiology **4**:550-557.
- 64. **Doern, G. V.** 2006. Macrolide and ketolide resistance with *Streptococcus pneumoniae*. The Medical clinics of North America **90**:1109-1124.
- 65. Donhofer, A., S. Franckenberg, S. Wickles, O. Berninghausen, R. Beckmann, and D. N. Wilson. 2012. Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109:**16900-16905.

- 66. Drlica, K., M. Malik, R. J. Kerns, and X. Zhao. 2008. Quinolone-mediated bacterial death. Antimicrobial agents and chemotherapy **52**:385-392.
- 67. **Du, Q., H. Wang, and J. Xie.** 2011. Thiamin (vitamin B1) biosynthesis and regulation: a rich source of antimicrobial drug targets? International journal of biological sciences **7:**41-52.
- 68. Dwyer, D. J., P. A. Belenky, J. H. Yang, I. C. MacDonald, J. D. Martell, N. Takahashi, C. T. Chan, M. A. Lobritz, D. Braff, E. G. Schwarz, J. D. Ye, M. Pati, M. Vercruysse, P. S. Ralifo, K. R. Allison, A. S. Khalil, A. Y. Ting, G. C. Walker, and J. J. Collins. 2014. Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111:E2100-2109.
- 69. Edgar, J. R., and R. M. Bell. 1978. Biosynthesis in Escherichia coli fo sn-glycerol 3-phosphate, a precursor of phospholipid. The Journal of biological chemistry 253:6348-6353.
- 70. El Garch, F., A. Lismond, L. J. Piddock, P. Courvalin, P. M. Tulkens, and F. Van Bambeke. 2010. Fluoroquinolones induce the expression of patA and patB, which encode ABC efflux pumps in *Streptococcus pneumoniae*. The Journal of antimicrobial chemotherapy **65**:2076-2082.
- 71. **Fabrega, A., S. Madurga, E. Giralt, and J. Vila.** 2009. Mechanism of action of and resistance to quinolones. Microbial biotechnology **2:**40-61.
- 72. **Facklam, R.** 2002. What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. Clinical microbiology reviews **15:**613-630.
- 73. Fani, F., M. C. Brotherton, P. Leprohon, and M. Ouellette. 2013. Genomic analysis and reconstruction of cefotaxime resistance in *Streptococcus pneumoniae*. The Journal of antimicrobial chemotherapy **68**:1718-1727.
- 74. Fani, F., P. Leprohon, D. Legare, and M. Ouellette. 2011. Whole genome sequencing of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* reveals mutations in penicillin-binding proteins and in a putative iron permease. Genome biology **12:**R115.
- 75. **Fani, F., P. Leprohon, G. G. Zhanel, M. G. Bergeron, and M. Ouellette.** 2014. Genomic analyses of DNA transformation and penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. Antimicrobial agents and chemotherapy **58**:1397-1403.
- 76. Feng, J., D. S. Billal, A. Lupien, G. Racine, E. Winstall, D. Legare, P. Leprohon, and M. Ouellette. 2011. Proteomic and transcriptomic analysis of linezolid resistance in Streptococcus pneumoniae. Journal of proteome research 10:4439-4452.
- 77. Feng, J., A. Lupien, H. Gingras, J. Wasserscheid, K. Dewar, D. Legare, and M. Ouellette. 2009. Genome sequencing of linezolid-resistant *Streptococcus pneumoniae* mutants reveals novel mechanisms of resistance. Genome research 19:1214-1223.
- 78. Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, J. M. Merrick, and et al. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. Science 269:496-512.

- 79. Fluit, A. C., A. Florijn, J. Verhoef, and D. Milatovic. 2005. Presence of tetracycline resistance determinants and susceptibility to tigecycline and minocycline. Antimicrobial agents and chemotherapy **49**:1636-1638.
- 80. Fritsche, T. R., H. S. Sader, M. G. Stilwell, M. J. Dowzicky, and R. N. Jones. 2005. Antimicrobial activity of tigecycline tested against organisms causing community-acquired respiratory tract infection and nosocomial pneumonia. Diagnostic microbiology and infectious disease 52:187-193.
- 81. **Fukui, K., T. Wakamatsu, Y. Agari, R. Masui, and S. Kuramitsu.** 2011. Inactivation of the DNA repair genes mutS, mutL or the anti-recombination gene mutS2 leads to activation of vitamin B1 biosynthesis genes. PloS one **6**:e19053.
- 82. Fuller, J. D., and D. E. Low. 2005. A review of *Streptococcus pneumoniae* infection treatment failures associated with fluoroquinolone resistance. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America **41**:118-121.
- 83. Garcia-Rodriguez, J. A., and M. J. Fresnadillo Martinez. 2002. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. The Journal of antimicrobial chemotherapy **50 Suppl S2:**59-73.
- 84. Garcia, P., A. C. Martin, and R. Lopez. 1997. Bacteriophages of *Streptococcus pneumoniae*: a molecular approach. Microb Drug Resist **3**:165-176.
- 85. Garrison, M. W., R. Mutters, and M. J. Dowzicky. 2009. In vitro activity of tigecycline and comparator agents against a global collection of Gram-negative and Gram-positive organisms: tigecycline Evaluation and Surveillance Trial 2004 to 2007. Diagnostic microbiology and infectious disease **65**:288-299.
- 86. Garvey, M. I., A. J. Baylay, R. L. Wong, and L. J. Piddock. 2011. Overexpression of patA and patB, which encode ABC transporters, is associated with fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrobial agents and chemotherapy **55**:190-196.
- 87. Garvey, M. I., and L. J. Piddock. 2008. The efflux pump inhibitor reserpine selects multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains that overexpress the ABC transporters PatA and PatB. Antimicrobial agents and chemotherapy **52**:1677-1685.
- 88. Gasc, A. M., L. Kauc, P. Barraille, M. Sicard, and S. Goodgal. 1991. Gene localization, size, and physical map of the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. Journal of bacteriology **173**:7361-7367.
- 89. Gianfaldoni, C., S. Censini, M. Hilleringmann, M. Moschioni, C. Facciotti, W. Pansegrau, V. Masignani, A. Covacci, R. Rappuoli, M. A. Barocchi, and P. Ruggiero. 2007. *Streptococcus pneumoniae* pilus subunits protect mice against lethal challenge. Infection and immunity 75:1059-1062.
- 90. Gill, M. J., N. P. Brenwald, and R. Wise. 1999. Identification of an efflux pump gene, pmrA, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrobial agents and chemotherapy **43**:187-189.
- 91. **Grebe, T., and R. Hakenbeck.** 1996. Penicillin-binding proteins 2b and 2x of *Streptococcus pneumoniae* are primary resistance determinants for different classes of beta-lactam antibiotics. Antimicrobial agents and chemotherapy **40**:829-834.
- 92. Griffith, F. 1928. The Significance of Pneumococcal Types. The Journal of hygiene 27:113-159.

- 93. Grohs, P., P. Trieu-Cuot, I. Podglajen, S. Grondin, A. Firon, C. Poyart, E. Varon, and L. Gutmann. 2012. Molecular basis for different levels of tet(M) expression in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. Antimicrobial agents and chemotherapy **56**:5040-5045.
- 94. Haas, W., J. Sublett, D. Kaushal, and E. I. Tuomanen. 2004. Revising the role of the pneumococcal vex-vncRS locus in vancomycin tolerance. Journal of bacteriology 186:8463-8471.
- 95. Hackel, M., C. Lascols, S. Bouchillon, B. Hilton, D. Morgenstern, and J. Purdy. 2013. Serotype prevalence and antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates among global populations. Vaccine **31**:4881-4887.
- 96. **Hakenbeck, R.** 2000. Transformation in *Streptococcus pneumoniae*: mosaic genes and the regulation of competence. Research in microbiology **151**:453-456.
- 97. Hakenbeck, R., N. Balmelle, B. Weber, C. Gardes, W. Keck, and A. de Saizieu. 2001. Mosaic genes and mosaic chromosomes: intra- and interspecies genomic variation of *Streptococcus pneumoniae*. Infection and immunity **69**:2477-2486.
- 98. Hakenbeck, R., and S. Chhatwal. 2007. Molecular Biology of Streptococci. Horizon Bioscience.
- 99. Hakenbeck, R., T. Grebe, D. Zahner, and J. B. Stock. 1999. beta-lactam resistance in Streptococcus pneumoniae: penicillin-binding proteins and non-penicillin-binding proteins. Molecular microbiology **33**:673-678.
- 100. Hakenbeck, R., K. Kaminski, A. Konig, M. van der Linden, J. Paik, P. Reichmann, and D. Zahner. 1999. Penicillin-binding proteins in beta-lactamresistant *streptococcus pneumoniae*. Microb Drug Resist **5**:91-99.
- 101. **Harder, K. J., H. Nikaido, and M. Matsuhashi.** 1981. Mutants of Escherichia coli that are resistant to certain beta-lactam compounds lack the ompF porin. Antimicrobial agents and chemotherapy **20**:549-552.
- 102. Hauser, R., M. Sabri, S. Moineau, and P. Uetz. 2011. The proteome and interactome of *Streptococcus pneumoniae* phage Cp-1. Journal of bacteriology 193:3135-3138.
- 103. **Hawkey, P. M.** 2008. The growing burden of antimicrobial resistance. The Journal of antimicrobial chemotherapy **62 Suppl 1:**i1-9.
- 104. **Hawkey, P. M.** 2003. Mechanisms of quinolone action and microbial response. The Journal of antimicrobial chemotherapy **51 Suppl 1:**29-35.
- 105. Henriques-Normark, B., and E. I. Tuomanen. 2013. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. Cold Spring Harbor perspectives in medicine **3**.
- 106. **Higgins, C. F.** 2007. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. Nature **446**:749-757.
- 107. **Higgins, C. F., and K. J. Linton.** 2004. The ATP switch model for ABC transporters. Nature structural & molecular biology **11**:918-926.
- 108. Highlander, S. K., K. G. Hulten, X. Qin, H. Jiang, S. Yerrapragada, E. O. Mason, Jr., Y. Shang, T. M. Williams, R. M. Fortunov, Y. Liu, O. Igboeli, J. Petrosino, M. Tirumalai, A. Uzman, G. E. Fox, A. M. Cardenas, D. M. Muzny, L. Hemphill, Y. Ding, S. Dugan, P. R. Blyth, C. J. Buhay, H. H. Dinh, A. C. Hawes, M. Holder, C. L. Kovar, S. L. Lee, W. Liu, L. V. Nazareth, Q. Wang, J. Zhou, S. L. Kaplan, and G. M. Weinstock. 2007. Subtle genetic changes enhance

virulence of methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus*. BMC microbiology 7:99.

- 109. Hiller, N. L., B. Janto, J. S. Hogg, R. Boissy, S. Yu, E. Powell, R. Keefe, N. E. Ehrlich, K. Shen, J. Hayes, K. Barbadora, W. Klimke, D. Dernovoy, T. Tatusova, J. Parkhill, S. D. Bentley, J. C. Post, G. D. Ehrlich, and F. Z. Hu. 2007. Comparative genomic analyses of seventeen *Streptococcus pneumoniae* strains: insights into the pneumococcal supragenome. Journal of bacteriology 189:8186-8195.
- 110. Himmelreich, U., R. Malik, T. Kuhn, H. M. Daniel, R. L. Somorjai, B. Dolenko, and T. C. Sorrell. 2009. Rapid etiological classification of meningitis by NMR spectroscopy based on metabolite profiles and host response. PloS one 4:e5328.
- 111. Hoban, D. J., S. K. Bouchillon, B. M. Johnson, J. L. Johnson, and M. J. Dowzicky. 2005. In vitro activity of tigecycline against 6792 Gram-negative and Gram-positive clinical isolates from the global Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST Program, 2004). Diagnostic microbiology and infectious disease 52:215-227.
- 112. Hornsey, M., M. J. Ellington, M. Doumith, S. Hudson, D. M. Livermore, and N. Woodford. 2010. Tigecycline resistance in *Serratia marcescens* associated with up-regulation of the SdeXY-HasF efflux system also active against ciprofloxacin and cefpirome. The Journal of antimicrobial chemotherapy **65**:479-482.
- 113. Hoskins, J., W. E. Alborn, Jr., J. Arnold, L. C. Blaszczak, S. Burgett, B. S. DeHoff, S. T. Estrem, L. Fritz, D. J. Fu, W. Fuller, C. Geringer, R. Gilmour, J. S. Glass, H. Khoja, A. R. Kraft, R. E. Lagace, D. J. LeBlanc, L. N. Lee, E. J. Lefkowitz, J. Lu, P. Matsushima, S. M. McAhren, M. McHenney, K. McLeaster, C. W. Mundy, T. I. Nicas, F. H. Norris, M. O'Gara, R. B. Peery, G. T. Robertson, P. Rockey, P. M. Sun, M. E. Winkler, Y. Yang, M. Young-Bellido, G. Zhao, C. A. Zook, R. H. Baltz, S. R. Jaskunas, P. R. Rosteck, Jr., P. L. Skatrud, and J. I. Glass. 2001. Genome of the bacterium *Streptococcus pneumoniae* strain R6. Journal of bacteriology 183:5709-5717.
- 114. Howden, B. P., T. P. Stinear, D. L. Allen, P. D. Johnson, P. B. Ward, and J. K. Davies. 2008. Genomic analysis reveals a point mutation in the two-component sensor gene graS that leads to intermediate vancomycin resistance in clinical *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial agents and chemotherapy **52**:3755-3762.
- 115. Hu, M., S. Nandi, C. Davies, and R. A. Nicholas. 2005. High-level chromosomally mediated tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* results from a point mutation in the rpsJ gene encoding ribosomal protein S10 in combination with the mtrR and penB resistance determinants. Antimicrobial agents and chemotherapy **49**:4327-4334.
- 116. Huda, N., E. W. Lee, J. Chen, Y. Morita, T. Kuroda, T. Mizushima, and T. Tsuchiya. 2003. Molecular cloning and characterization of an ABC multidrug efflux pump, VcaM, in Non-O1 *Vibrio cholerae*. Antimicrobial agents and chemotherapy 47:2413-2417.
- 117.Illumina.Next-GenerationSequencing (NGS),[Online].http://technology.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html?sciid=2014107IBN1(October 3rd 2014)

- 118. Janoir, C., V. Zeller, M. D. Kitzis, N. J. Moreau, and L. Gutmann. 1996. Highlevel fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in parC and gyrA. Antimicrobial agents and chemotherapy **40**:2760-2764.
- 119. Jenner, L., A. L. Starosta, D. S. Terry, A. Mikolajka, L. Filonava, M. Yusupov, S. C. Blanchard, D. N. Wilson, and G. Yusupova. 2013. Structural basis for potent inhibitory activity of the antibiotic tigecycline during protein synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110:3812-3816.
- 120. Johnsborg, O., V. Eldholm, and L. S. Havarstein. 2007. Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. Research in microbiology 158:767-778.
- 121. Johnsborg, O., P. E. Kristiansen, T. Blomqvist, and L. S. Havarstein. 2006. A hydrophobic patch in the competence-stimulating Peptide, a pneumococcal competence pheromone, is essential for specificity and biological activity. Journal of bacteriology **188**:1744-1749.
- 122. Johnston, C., N. Campo, M. J. Berge, P. Polard, and J. P. Claverys. 2014. *Streptococcus pneumoniae*, le transformiste. Trends in microbiology 22:113-119.
- Jones, C. H., and P. J. Petersen. 2005. Tigecycline: a review of preclinical and clinical studies of the first-in-class glycylcycline antibiotic. Drugs Today (Barc) 41:637-659.
- 124. Jones, M. E., D. F. Sahm, N. Martin, S. Scheuring, P. Heisig, C. Thornsberry, K. Kohrer, and F. J. Schmitz. 2000. Prevalence of gyrA, gyrB, parC, and parE mutations in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* with decreased susceptibilities to different fluoroquinolones and originating from Worldwide Surveillance Studies during the 1997-1998 respiratory season. Antimicrobial agents and chemotherapy 44:462-466.
- 125. Jones, R. N., and L. A. Mandell. 2002. Fluoroquinolones for the treatment of outpatient community-acquired pneumonia. Diagnostic microbiology and infectious disease 44:69-76.
- 126. Jones, R. N., H. S. Sader, G. J. Moet, and D. J. Farrell. 2010. Declining antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in the United States: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-2009). Diagnostic microbiology and infectious disease **68**:334-336.
- 127. Jorgensen, J. H., L. M. Weigel, M. J. Ferraro, J. M. Swenson, and F. C. Tenover. 1999. Activities of newer fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoni*ae clinical isolates including those with mutations in the gyrA, parC, and parE loci. Antimicrobial agents and chemotherapy **43**:329-334.
- 128. Jumbe, N. L., A. Louie, M. H. Miller, W. Liu, M. R. Deziel, V. H. Tam, R. Bachhawat, and G. L. Drusano. 2006. Quinolone efflux pumps play a central role in emergence of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrobial agents and chemotherapy 50:310-317.
- 129. Jung, I. L., and I. G. Kim. 2003. Thiamine protects against paraquat-induced damage: scavenging activity of reactive oxygen species. Environmental toxicology and pharmacology 15:19-26.
- 130. Kadioglu, A., J. N. Weiser, J. C. Paton, and P. W. Andrew. 2008. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. Nature reviews. Microbiology **6**:288-301.

- 131. Kanj, S. S., A. Whitelaw, and M. J. Dowzicky. 2014. In vitro activity of tigecycline and comparators against Gram-positive and Gram-negative isolates collected from the Middle East and Africa between 2004 and 2011. International journal of antimicrobial agents **43**:170-178.
- 132. Keeney, D., A. Ruzin, F. McAleese, E. Murphy, and P. A. Bradford. 2008. MarA-mediated overexpression of the AcrAB efflux pump results in decreased susceptibility to tigecycline in *Escherichia coli*. The Journal of antimicrobial chemotherapy **61**:46-53.
- 133. Keller, L. E., J. C. Thomas, X. Luo, M. H. Nahm, L. S. McDaniel, and D. A. Robinson. 2013. Draft Genome Sequences of Five Multilocus Sequence Types of Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae*. Genome announcements 1.
- 134. Kellogg, J. A., D. A. Bankert, C. J. Elder, J. L. Gibbs, and M. C. Smith. 2001. Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited. Journal of clinical microbiology **39:**3373-3375.
- 135. Keren, I., Y. Wu, J. Inocencio, L. R. Mulcahy, and K. Lewis. 2013. Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species. Science **339**:1213-1216.
- 136. Kim, S. H., J. H. Song, D. R. Chung, V. Thamlikitkul, Y. Yang, H. Wang, M. Lu, T. M. So, P. R. Hsueh, R. M. Yasin, C. C. Carlos, H. V. Pham, M. K. Lalitha, N. Shimono, J. Perera, A. M. Shibl, J. Y. Baek, C. I. Kang, K. S. Ko, and K. R. Peck. 2012. Changing trends in antimicrobial resistance and serotypes of Streptococcus pneumoniae isolates in Asian countries: an Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens (ANSORP) study. Antimicrobial agents and chemotherapy 56:1418-1426.
- 137. Kimaro Mlacha, S. Z., S. Romero-Steiner, J. C. Hotopp, N. Kumar, N. Ishmael, D. R. Riley, U. Farooq, T. H. Creasy, L. J. Tallon, X. Liu, C. S. Goldsmith, J. Sampson, G. M. Carlone, S. K. Hollingshead, J. A. Scott, and H. Tettelin. 2013. Phenotypic, genomic, and transcriptional characterization of Streptococcus pneumoniae interacting with human pharyngeal cells. BMC genomics 14:383.
- 138. **Klaassen, C. H., and J. W. Mouton.** 2005. Molecular detection of the macrolide efflux gene: to discriminate or not to discriminate between mef(A) and mef(E). Antimicrobial agents and chemotherapy **49**:1271-1278.
- 139. Ko, K. S., S. Park, W. S. Oh, J. Y. Suh, T. Oh, S. Ahn, J. Chun, and J. H. Song. 2006. Comparative analysis of growth-phase-dependent gene expression in virulent and avirulent *Streptococcus pneumoniae* using a high-density DNA microarray. Molecules and cells 21:82-88.
- 140. Kohanski, M. A., D. J. Dwyer, and J. J. Collins. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. Nature reviews. Microbiology 8:423-435.
- 141. Kohanski, M. A., D. J. Dwyer, B. Hayete, C. A. Lawrence, and J. J. Collins. 2007. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. Cell 130:797-810.
- 142. Kowalska, E., M. Kujda, N. Wolak, and A. Kozik. 2012. Altered expression and activities of enzymes involved in thiamine diphosphate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* under oxidative and osmotic stress. FEMS yeast research 12:534-546.
- 143. Kumar, A., and H. P. Schweizer. 2005. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. Advanced drug delivery reviews 57:1486-1513.

- 144. Lacks, S. A. 1997. Cloning and expression of pneumococcal genes in *Streptococcus pneumoniae*. Microb Drug Resist **3**:327-337.
- 145. Laiakis, E. C., G. A. Morris, A. J. Fornace, and S. R. Howie. 2010. Metabolomic analysis in severe childhood pneumonia in the Gambia, West Africa: findings from a pilot study. PloS one **5**.
- 146. Lakaye, B., B. Wirtzfeld, P. Wins, T. Grisar, and L. Bettendorff. 2004. Thiamine triphosphate, a new signal required for optimal growth of *Escherichia coli* during amino acid starvation. The Journal of biological chemistry **279**:17142-17147.
- Lalaouna, D., A. Eyraud, S. Chabelskaya, B. Felden, and E. Masse. 2014. Regulatory RNAs Involved in Bacterial Antibiotic Resistance. PLoS pathogens 10:e1004299.
- 148. Laponogov, I., M. K. Sohi, D. A. Veselkov, X. S. Pan, R. Sawhney, A. W. Thompson, K. E. McAuley, L. M. Fisher, and M. R. Sanderson. 2009. Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. Nature structural & molecular biology 16:667-669.
- 149. Lesnyak, D. V., J. Osipiuk, T. Skarina, P. V. Sergiev, A. A. Bogdanov, A. Edwards, A. Savchenko, A. Joachimiak, and O. A. Dontsova. 2007. Methyltransferase that modifies guanine 966 of the 16 S rRNA: functional identification and tertiary structure. The Journal of biological chemistry 282:5880-5887.
- 150. Levine, C., H. Hiasa, and K. J. Marians. 1998. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. Biochimica et biophysica acta 1400:29-43.
- 151. Li, X. Z., and H. Nikaido. 2004. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. Drugs 64:159-204.
- 152. Lin, M. F., Y. Y. Lin, H. W. Yeh, and C. Y. Lan. 2014. Role of the BaeSR twocomponent system in the regulation of *Acinetobacter baumannii* adeAB genes and its correlation with tigecycline susceptibility. BMC microbiology **14**:119.
- 153. Linkevicius, M., L. Sandegren, and D. I. Andersson. 2013. Mechanisms and fitness costs of tigecycline resistance in *Escherichia coli*. The Journal of antimicrobial chemotherapy **68**:2809-2819.
- 154. Liu, Y., and J. A. Imlay. 2013. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species. Science **339**:1210-1213.
- 155. Loo, T. W., and D. M. Clarke. 2005. Recent progress in understanding the mechanism of P-glycoprotein-mediated drug efflux. The Journal of membrane biology **206**:173-185.
- 156. Lopez, E., A. Domenech, M. J. Ferrandiz, M. J. Frias, C. Ardanuy, M. Ramirez, E. Garcia, J. Linares, and A. G. de la Campa. 2014. Induction of prophages by fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*: implications for emergence of resistance in genetically-related clones. PloS one 9:e94358.
- 157. Lopez, R., and E. Garcia. 2004. Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. FEMS microbiology reviews 28:553-580.
- 158. Luo, P., H. Li, and D. A. Morrison. 2003. ComX is a unique link between multiple quorum sensing outputs and competence in *Streptococcus pneumoniae*. Molecular microbiology **50**:623-633.

- 159. Mahadevan, S., S. L. Shah, T. J. Marrie, and C. M. Slupsky. 2008. Analysis of metabolomic data using support vector machines. Analytical chemistry 80:7562-7570.
- 160. Mann, B., T. van Opijnen, J. Wang, C. Obert, Y. D. Wang, R. Carter, D. J. McGoldrick, G. Ridout, A. Camilli, E. I. Tuomanen, and J. W. Rosch. 2012. Control of virulence by small RNAs in *Streptococcus pneumoniae*. PLoS pathogens 8:e1002788.
- 161. Margulies, M., M. Egholm, W. E. Altman, S. Attiya, J. S. Bader, L. A. Bemben, J. Berka, M. S. Braverman, Y. J. Chen, Z. Chen, S. B. Dewell, L. Du, J. M. Fierro, X. V. Gomes, B. C. Godwin, W. He, S. Helgesen, C. H. Ho, G. P. Irzyk, S. C. Jando, M. L. Alenquer, T. P. Jarvie, K. B. Jirage, J. B. Kim, J. R. Knight, J. R. Lanza, J. H. Leamon, S. M. Lefkowitz, M. Lei, J. Li, K. L. Lohman, H. Lu, V. B. Makhijani, K. E. McDade, M. P. McKenna, E. W. Myers, E. Nickerson, J. R. Nobile, R. Plant, B. P. Puc, M. T. Ronan, G. T. Roth, G. J. Sarkis, J. F. Simons, J. W. Simpson, M. Srinivasan, K. R. Tartaro, A. Tomasz, K. A. Vogt, G. A. Volkmer, S. H. Wang, Y. Wang, M. P. Weiner, P. Yu, R. F. Begley, and J. M. Rothberg. 2005. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature 437:376-380.
- 162. **Marioni, J. C., C. E. Mason, S. M. Mane, M. Stephens, and Y. Gilad.** 2008. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. Genome research **18**:1509-1517.
- 163. Marrer, E., K. Schad, A. T. Satoh, M. G. Page, M. M. Johnson, and L. J. Piddock. 2006. Involvement of the putative ATP-dependent efflux proteins PatA and PatB in fluoroquinolone resistance of a multidrug-resistant mutant of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrobial agents and chemotherapy **50**:685-693.
- 164. **Martin, B., P. Garcia, M. P. Castanie, and J. P. Claverys.** 1995. The recA gene of *Streptococcus pneumoniae* is part of a competence-induced operon and controls lysogenic induction. Molecular microbiology **15**:367-379.
- 165. Martinez-Martinez, L., I. Garcia, S. Ballesta, V. J. Benedi, S. Hernandez-Alles, and A. Pascual. 1998. Energy-dependent accumulation of fluoroquinolones in quinolone-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. Antimicrobial agents and chemotherapy **42**:1850-1852.
- 166. Martinez, J. L., and F. Baquero. 2000. Mutation frequencies and antibiotic resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy 44:1771-1777.
- 167. Matsuo, T., J. Chen, Y. Minato, W. Ogawa, T. Mizushima, T. Kuroda, and T. Tsuchiya. 2008. SmdAB, a heterodimeric ABC-Type multidrug efflux pump, in *Serratia marcescens*. Journal of bacteriology **190**:648-654.
- 168. McAleese, F., P. Petersen, A. Ruzin, P. M. Dunman, E. Murphy, S. J. Projan, and P. A. Bradford. 2005. A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived *Staphylococcus aureus* mutants to tigecycline. Antimicrobial agents and chemotherapy 49:1865-1871.
- 169. McGee, L., L. McDougal, J. Zhou, B. G. Spratt, F. C. Tenover, R. George, R. Hakenbeck, W. Hryniewicz, J. C. Lefevre, A. Tomasz, and K. P. Klugman. 2001. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. Journal of clinical microbiology **39**:2565-2571.

- 170. **McMurry, L., and S. B. Levy.** 1978. Two transport systems for tetracycline in sensitive *Escherichia coli*: critical role for an initial rapid uptake system insensitive to energy inhibitors. Antimicrobial agents and chemotherapy **14**:201-209.
- 171. Mejean, V., and J. P. Claverys. 1993. DNA processing during entry in transformation of *Streptococcus pneumoniae*. The Journal of biological chemistry 268:5594-5599.
- 172. Merrill, C. W., J. M. Gwaltney, Jr., J. W. Hendley, and M. A. Sande. 1973. Rapid identification of pneumococci. Gram stain vs. the quellung reaction. The New England journal of medicine **288**:510-512.
- 173. Michalopoulos, A., and M. E. Falagas. 2010. Treatment of Acinetobacter infections. Expert opinion on pharmacotherapy 11:779-788.
- 174. Michaux, C., N. Verneuil, A. Hartke, and J. C. Giard. 2014. Physiological roles of small RNA molecules. Microbiology 160:1007-1019.
- 175. Moore, I. F., D. W. Hughes, and G. D. Wright. 2005. Tigecycline is modified by the flavin-dependent monooxygenase TetX. Biochemistry 44:11829-11835.
- 176. **Morrison, D. A., and M. S. Lee.** 2000. Regulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*: a link between quorum sensing and DNA processing genes. Research in microbiology **151**:445-451.
- 177. **Morrissey, I., D. J. Farrell, S. Bakker, S. Buckridge, and D. Felmingham.** 2003. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of fluoroquinoloneresistant or -susceptible *Streptococcus pneumoniae* from Hong Kong. Antimicrobial agents and chemotherapy **47**:1433-1435.
- 178. Mundy, L. S., E. N. Janoff, K. E. Schwebke, C. J. Shanholtzer, and K. E. Willard. 1998. Ambiguity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. Optochin, bile solubility, quellung, and the AccuProbe DNA probe tests. American journal of clinical pathology 109:55-61.
- 179. **Munoz, R., and A. G. De La Campa.** 1996. ParC subunit of DNA topoisomerase IV of *Streptococcus pneumoniae* is a primary target of fluoroquinolones and cooperates with DNA gyrase A subunit in forming resistance phenotype. Antimicrobial agents and chemotherapy **40**:2252-2257.
- 180. **Musher, D. M.** 1992. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae:* clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America **14**:801-807.
- 181. **Nikaido, H.** 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR **67:**593-656.
- 182. Nikaido, H., and E. Y. Rosenberg. 1981. Effect on solute size on diffusion rates through the transmembrane pores of the outer membrane of Escherichia coli. The Journal of general physiology 77:121-135.
- 183. Nishino, K., S. Yamasaki, M. Hayashi-Nishino, and A. Yamaguchi. 2011. Effect of overexpression of small non-coding DsrA RNA on multidrug efflux in *Escherichia coli*. The Journal of antimicrobial chemotherapy **66**:291-296.
- 184. Norskov-Lauritsen, N., H. Marchandin, and M. J. Dowzicky. 2009. Antimicrobial susceptibility of tigecycline and comparators against bacterial isolates collected as part of the TEST study in Europe (2004-2007). International journal of antimicrobial agents **34**:121-130.
- 185. Obert, C., J. Sublett, D. Kaushal, E. Hinojosa, T. Barton, E. I. Tuomanen, and C. J. Orihuela. 2006. Identification of a Candidate *Streptococcus pneumoniae* core

genome and regions of diversity correlated with invasive pneumococcal disease. Infection and immunity **74:**4766-4777.

- 186. Olson, M. W., A. Ruzin, E. Feyfant, T. S. Rush, 3rd, J. O'Connell, and P. A. Bradford. 2006. Functional, biophysical, and structural bases for antibacterial activity of tigecycline. Antimicrobial agents and chemotherapy 50:2156-2166.
- 187. Ozsolak, F., and P. M. Milos. 2011. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. Nature reviews. Genetics 12:87-98.
- 188. Paez, P. L., M. C. Becerra, and I. Albesa. 2010. Antioxidative mechanisms protect resistant strains of *Staphylococcus aureus* against ciprofloxacin oxidative damage. Fundamental & clinical pharmacology **24**:771-776.
- 189. **Pan, X. S., J. Ambler, S. Mehtar, and L. M. Fisher.** 1996. Involvement of topoisomerase IV and DNA gyrase as ciprofloxacin targets in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrobial agents and chemotherapy **40**:2321-2326.
- 190. **Pan, X. S., and L. M. Fisher.** 1997. Targeting of DNA gyrase in *Streptococcus pneumoniae* by sparfloxacin: selective targeting of gyrase or topoisomerase IV by quinolones. Antimicrobial agents and chemotherapy **41**:471-474.
- 191. Pan, X. S., G. Yague, and L. M. Fisher. 2001. Quinolone resistance mutations in Streptococcus pneumoniae GyrA and ParC proteins: mechanistic insights into quinolone action from enzymatic analysis, intracellular levels, and phenotypes of wild-type and mutant proteins. Antimicrobial agents and chemotherapy 45:3140-3147.
- 192. Pancotto, L., G. De Angelis, E. Bizzarri, M. A. Barocchi, G. Del Giudice, M. Moschioni, and P. Ruggiero. 2013. Expression of the *Streptococcus pneumoniae* pilus-1 undergoes on and off switching during colonization in mice. Scientific reports 3:2040.
- 193. Patel, S. N., A. McGeer, R. Melano, G. J. Tyrrell, K. Green, D. R. Pillai, and D. E. Low. 2011. Susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* to fluoroquinolones in Canada. Antimicrobial agents and chemotherapy 55:3703-3708.
- 194. Pelton, S. I., R. Dagan, B. M. Gaines, K. P. Klugman, D. Laufer, K. O'Brien, and H. J. Schmitt. 2003. Pneumococcal conjugate vaccines: proceedings from an interactive symposium at the 41st Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vaccine 21:1562-1571.
- 195. Perfeito, L., L. Fernandes, C. Mota, and I. Gordo. 2007. Adaptive mutations in bacteria: high rate and small effects. Science 317:813-815.
- 196. **Pericone, C. D., K. Overweg, P. W. Hermans, and J. N. Weiser.** 2000. Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. Infection and immunity **68**:3990-3997.
- 197. Pesakhov, S., R. Benisty, N. Sikron, Z. Cohen, P. Gomelsky, I. Khozin-Goldberg, R. Dagan, and N. Porat. 2007. Effect of hydrogen peroxide production and the Fenton reaction on membrane composition of *Streptococcus pneumoniae*. Biochimica et biophysica acta 1768:590-597.
- 198. **Pestova, E., J. J. Millichap, F. Siddiqui, G. A. Noskin, and L. R. Peterson.** 2002. Non-PmrA-mediated multidrug resistance in *Streptococcus pneumoniae*. The Journal of antimicrobial chemotherapy **49**:553-556.
- 199. **Pfizer**. Tygacil® product insert, [Online]. <u>http://www.pfizerpro.com/hcp/tygacil</u> (September 14th 2014)

- 200. **Philippon, A., R. Labia, and G. Jacoby.** 1989. Extended-spectrum betalactamases. Antimicrobial agents and chemotherapy **33**:1131-1136.
- Piddock, L. J., M. M. Johnson, S. Simjee, and L. Pumbwe. 2002. Expression of efflux pump gene pmrA in fluoroquinolone-resistant and -susceptible clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrobial agents and chemotherapy 46:808-812.
- 202. Pillai, D. R., D. Shahinas, A. Buzina, R. A. Pollock, R. Lau, K. Khairnar, A. Wong, D. J. Farrell, K. Green, A. McGeer, and D. E. Low. 2009. Genome-wide dissection of globally emergent multi-drug resistant serotype 19A Streptococcus pneumoniae. BMC genomics 10:642.
- 203. Polissi, A., A. Pontiggia, G. Feger, M. Altieri, H. Mottl, L. Ferrari, and D. Simon. 1998. Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. Infection and immunity **66**:5620-5629.
- 204. **Poole, K.** 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. The Journal of antimicrobial chemotherapy **56:**20-51.
- 205. Poole, K., K. Krebes, C. McNally, and S. Neshat. 1993. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. Journal of bacteriology 175:7363-7372.
- 206. Pracht, D., C. Elm, J. Gerber, S. Bergmann, M. Rohde, M. Seiler, K. S. Kim, H. F. Jenkinson, R. Nau, and S. Hammerschmidt. 2005. PavA of *Streptococcus pneumoniae* modulates adherence, invasion, and meningeal inflammation. Infection and immunity 73:2680-2689.
- 207. Procopio, R. E., I. R. Silva, M. K. Martins, J. L. Azevedo, and J. M. Araujo. 2012. Antibiotics produced by Streptomyces. The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases 16:466-471.
- 208. Prystowsky, J., F. Siddiqui, J. Chosay, D. L. Shinabarger, J. Millichap, L. R. Peterson, and G. A. Noskin. 2001. Resistance to linezolid: characterization of mutations in rRNA and comparison of their occurrences in vancomycin-resistant enterococci. Antimicrobial agents and chemotherapy 45:2154-2156.
- 209. **Quackenbush, J.** 2001. Computational analysis of microarray data. Nature reviews. Genetics **2**:418-427.
- 210. Ramirez, M., E. Severina, and A. Tomasz. 1999. A high incidence of prophage carriage among natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Journal of bacteriology 181:3618-3625.
- 211. **Rapala-Kozik, M., N. Wolak, M. Kujda, and A. K. Banas.** 2012. The upregulation of thiamine (vitamin B1) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* seedlings under salt and osmotic stress conditions is mediated by abscisic acid at the early stages of this stress response. BMC plant biology **12:**2.
- 212. Reichmann, P., A. Konig, A. Marton, and R. Hakenbeck. 1996. Penicillinbinding proteins as resistance determinants in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Microb Drug Resist 2:177-181.
- 213. **Reilman, E., R. A. Mars, J. M. van Dijl, and E. L. Denham.** 2014. The multidrug ABC transporter BmrC/BmrD of *Bacillus subtilis* is regulated via a ribosomemediated transcriptional attenuation mechanism. Nucleic acids research.
- 214. **Reinert, R. R.** 2009. The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. Clinical microbiology and infection : the official publication of the

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 15 Suppl 3:7-11.

- 215. Reinert, R. R., S. Reinert, M. van der Linden, M. Y. Cil, A. Al-Lahham, and P. Appelbaum. 2005. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in eight European countries from 2001 to 2003. Antimicrobial agents and chemotherapy **49**:2903-2913.
- 216. Richter, S. S., K. P. Heilmann, C. L. Dohrn, F. Riahi, S. E. Beekmann, and G. V. Doern. 2009. Changing epidemiology of antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States, 2004-2005. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 48:e23-33.
- 217. **Robbins, J. B., and R. Schneerson.** 1983. Planning for a second (23 valent) generation pneumococcal vaccine. With special reference to new developments in our understanding of the structure and biology of polysaccharides. Bulletin europeen de physiopathologie respiratoire **19:**215-226.
- 218. **Roberts, M. C.** Mechanism of resistance for characterized tet and otr genes, [Online]. <u>http://faculty.washington.edu/marilynr/</u> (October 3)
- 219. Roberts, M. C. 2005. Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS microbiology letters 245:195-203.
- 220. **Robertson, G. T., T. B. Doyle, and A. S. Lynch.** 2005. Use of an efflux-deficient *streptococcus pneumoniae* strain panel to identify ABC-class multidrug transporters involved in intrinsic resistance to antimicrobial agents. Antimicrobial agents and chemotherapy **49**:4781-4783.
- 221. Roche. 454 sequencing, [Online]. <u>http://www.454.com/</u> (October 3th 2014)
- 222. Rosenblum, R., E. Khan, G. Gonzalez, R. Hasan, and T. Schneiders. 2011. Genetic regulation of the ramA locus and its expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. International journal of antimicrobial agents **38**:39-45.
- 223. Ross, J. I., E. A. Eady, J. H. Cove, and W. J. Cunliffe. 1998. 16S rRNA mutation associated with tetracycline resistance in a gram-positive bacterium. Antimicrobial agents and chemotherapy 42:1702-1705.
- 224. **Ruiz, J.** 2003. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. The Journal of antimicrobial chemotherapy **51**:1109-1117.
- 225. Sabri, M., R. Hauser, M. Ouellette, J. Liu, M. Dehbi, G. Moeck, E. Garcia, B. Titz, P. Uetz, and S. Moineau. 2011. Genome annotation and intraviral interactome for the *Streptococcus pneumoniae* virulent phage Dp-1. Journal of bacteriology 193:551-562.
- 226. Schulz, C., and S. Hammerschmidt. 2013. Exploitation of physiology and metabolomics to identify pneumococcal vaccine candidates. Expert review of vaccines 12:1061-1075.
- 227. Shaw, K. J., P. N. Rather, R. S. Hare, and G. H. Miller. 1993. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiological reviews 57:138-163.
- 228. Sibold, C., Z. Markiewicz, C. Latorre, and R. Hakenbeck. 1991. Novel plasmids in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae*. FEMS microbiology letters 61:91-95.
- 229. Siqueira, J. F., Jr., A. F. Fouad, and I. N. Rocas. 2012. Pyrosequencing as a tool for better understanding of human microbiomes. Journal of oral microbiology 4.

- 230. Sirbu, A., G. Kerr, M. Crane, and H. J. Ruskin. 2012. RNA-Seq vs dual- and single-channel microarray data: sensitivity analysis for differential expression and clustering. PloS one 7:e50986.
- 231. Slupsky, C. M., A. Cheypesh, D. V. Chao, H. Fu, K. N. Rankin, T. J. Marrie, and P. Lacy. 2009. *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* pneumonia induce distinct metabolic responses. Journal of proteome research 8:3029-3036.
- 232. Slupsky, C. M., K. N. Rankin, H. Fu, D. Chang, B. H. Rowe, P. G. Charles, A. McGeer, D. Low, R. Long, D. Kunimoto, M. B. Sawyer, R. N. Fedorak, D. J. Adamko, E. J. Saude, S. L. Shah, and T. J. Marrie. 2009. Pneumococcal pneumonia: potential for diagnosis through a urinary metabolic profile. Journal of proteome research 8:5550-5558.
- 233. Smith, A. M., and K. P. Klugman. 2000. Non-Penicillin-Binding protein mediated high-level penicillin and cephalosporin resistance in a Hungarian clone of *Streptococcus pneumoniae*. Microb Drug Resist 6:105-110.
- 234. Smith, M. D., and W. R. Guild. 1980. Improved method for conjugative transfer by filter mating of *Streptococcus pneumoniae*. Journal of bacteriology 144:457-459.
- 235. Song, J. H., S. I. Jung, K. S. Ko, N. Y. Kim, J. S. Son, H. H. Chang, H. K. Ki, W. S. Oh, J. Y. Suh, K. R. Peck, N. Y. Lee, Y. Yang, Q. Lu, A. Chongthaleong, C. H. Chiu, M. K. Lalitha, J. Perera, T. T. Yee, G. Kumarasinghe, F. Jamal, A. Kamarulzaman, N. Parasakthi, P. H. Van, C. Carlos, T. So, T. K. Ng, and A. Shibl. 2004. High prevalence of antimicrobial resistance among clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates in Asia (an ANSORP study). Antimicrobial agents and chemotherapy **48**:2101-2107.
- 236. Soualhine, H., V. Brochu, F. Menard, B. Papadopoulou, K. Weiss, M. G. Bergeron, D. Legare, J. Drummelsmith, and M. Ouellette. 2005. A proteomic analysis of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals a novel role for PstS, a subunit of the phosphate ABC transporter. Molecular microbiology 58:1430-1440.
- 237. Souli, M., I. Galani, and H. Giamarellou. 2008. Emergence of extensively drugresistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin 13.
- 238. Speer, B. S., L. Bedzyk, and A. A. Salyers. 1991. Evidence that a novel tetracycline resistance gene found on two Bacteroides transposons encodes an NADP-requiring oxidoreductase. Journal of bacteriology 173:176-183.
- 239. Stassi, D. L., P. Lopez, M. Espinosa, and S. A. Lacks. 1981. Cloning of chromosomal genes in *Streptococcus pneumoniae*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **78**:7028-7032.
- 240. Stewart, B. A., A. P. Johnson, and N. Woodford. 1999. Relationship between mutations in parC and gyrA of clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* and resistance to ciprofloxacin and grepafloxacin. Journal of medical microbiology **48**:1103-1106.
- 241. Strahilevitz, J., G. A. Jacoby, D. C. Hooper, and A. Robicsek. 2009. Plasmidmediated quinolone resistance: a multifaceted threat. Clinical microbiology reviews 22:664-689.

- 242. Sui, Z., W. Zhou, K. Yao, L. Liu, G. Zhang, Y. Yang, and J. Feng. 2013. Complete Genome Sequence of *Streptococcus pneumoniae* Strain A026, a Clinical Multidrug-Resistant Isolate Carrying Tn2010. Genome announcements 1.
- 243. Suzuki, N., M. Yuyama, S. Maeda, H. Ogawa, K. Mashiko, and Y. Kiyoura. 2006. Genotypic identification of presumptive *Streptococcus pneumoniae* by PCR using four genes highly specific for S. pneumoniae. Journal of medical microbiology **55**:709-714.
- 244. **Tapsall, J. W., F. Ndowa, D. A. Lewis, and M. Unemo.** 2009. Meeting the public health challenge of multidrug- and extensively drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. Expert review of anti-infective therapy **7:**821-834.
- 245. Tarca, A. L., R. Romero, and S. Draghici. 2006. Analysis of microarray experiments of gene expression profiling. American journal of obstetrics and gynecology 195:373-388.
- 246. Tettelin, H., K. E. Nelson, I. T. Paulsen, J. A. Eisen, T. D. Read, S. Peterson, J. Heidelberg, R. T. DeBoy, D. H. Haft, R. J. Dodson, A. S. Durkin, M. Gwinn, J. F. Kolonay, W. C. Nelson, J. D. Peterson, L. A. Umayam, O. White, S. L. Salzberg, M. R. Lewis, D. Radune, E. Holtzapple, H. Khouri, A. M. Wolf, T. R. Utterback, C. L. Hansen, L. A. McDonald, T. V. Feldblyum, S. Angiuoli, T. Dickinson, E. K. Hickey, I. E. Holt, B. J. Loftus, F. Yang, H. O. Smith, J. C. Venter, B. A. Dougherty, D. A. Morrison, S. K. Hollingshead, and C. M. Fraser. 2001. Complete genome sequence of a virulent isolate of *Streptococcus pneumoniae*. Science 293:498-506.
- 247. **Tilley, S. J., E. V. Orlova, R. J. Gilbert, P. W. Andrew, and H. R. Saibil.** 2005. Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. Cell **121:**247-256.
- 248. Tocci, N., F. Iannelli, A. Bidossi, M. L. Ciusa, F. Decorosi, C. Viti, G. Pozzi, S. Ricci, and M. R. Oggioni. 2013. Functional analysis of pneumococcal drug efflux pumps associates the MATE DinF transporter with quinolone susceptibility. Antimicrobial agents and chemotherapy 57:248-253.
- 249. Tong, H. H., X. Liu, Y. Chen, M. James, and T. Demaria. 2002. Effect of neuraminidase on receptor-mediated adherence of *Streptococcus pneumoniae* to chinchilla tracheal epithelium. Acta oto-laryngologica 122:413-419.
- 250. Trapnell, C., A. Roberts, L. Goff, G. Pertea, D. Kim, D. R. Kelley, H. Pimentel, S. L. Salzberg, J. L. Rinn, and L. Pachter. 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. Nature protocols 7:562-578.
- 251. **Trieber, C. A., and D. E. Taylor.** 2002. Mutations in the 16S rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline. Journal of bacteriology **184:**2131-2140.
- 252. Tunc-Ozdemir, M., G. Miller, L. Song, J. Kim, A. Sodek, S. Koussevitzky, A. N. Misra, R. Mittler, and D. Shintani. 2009. Thiamin confers enhanced tolerance to oxidative stress in *Arabidopsis*. Plant physiology 151:421-432.
- 253. Tuomanen, E. I. 2004. The Pneumococcus. ASM Press.
- 254. van Heijenoort, J. 2001. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. Glycobiology 11:25R-36R.

- 255. Varon, E., C. Janoir, M. D. Kitzis, and L. Gutmann. 1999. ParC and GyrA may be interchangeable initial targets of some fluoroquinolones in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrobial agents and chemotherapy **43**:302-306.
- 256. Vermeeren, V., L. Michiels 2011. Evolution towards the implementation of pointof-care biosensors, p. 550. *In* P. A. Serra (ed.), Biosensors for Health, Environment and Biosecurity, vol. 1. INTECH.
- 257. Villa, L., C. Feudi, D. Fortini, A. Garcia-Fernandez, and A. Carattoli. 2014. Genomics of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 512 clone highlights the role of RamR and ribosomal S10 protein mutations in conferring tigecycline resistance. Antimicrobial agents and chemotherapy **58**:1707-1712.
- 258. Visalli, M. A., E. Murphy, S. J. Projan, and P. A. Bradford. 2003. AcrAB multidrug efflux pump is associated with reduced levels of susceptibility to tigecycline (GAR-936) in *Proteus mirabilis*. Antimicrobial agents and chemotherapy 47:665-669.
- 259. Voelkerding, K. V., S. A. Dames, and J. D. Durtschi. 2009. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. Clinical chemistry 55:641-658.
- 260. Walsh, C. 2003. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. ASM Press.
- 261. Wang, C., B. Gong, P. R. Bushel, J. Thierry-Mieg, D. Thierry-Mieg, J. Xu, H. Fang, H. Hong, J. Shen, Z. Su, J. Meehan, X. Li, L. Yang, H. Li, P. P. Labaj, D. P. Kreil, D. Megherbi, S. Gaj, F. Caiment, J. van Delft, J. Kleinjans, A. Scherer, V. Devanarayan, J. Wang, Y. Yang, H. R. Qian, L. J. Lancashire, M. Bessarabova, Y. Nikolsky, C. Furlanello, M. Chierici, D. Albanese, G. Jurman, S. Riccadonna, M. Filosi, R. Visintainer, K. K. Zhang, J. Li, J. H. Hsieh, D. L. Svoboda, J. C. Fuscoe, Y. Deng, L. Shi, R. S. Paules, S. S. Auerbach, and W. Tong. 2014. The concordance between RNA-seq and microarray data depends on chemical treatment and transcript abundance. Nature biotechnology 32:926-932.
- 262. **Wang, J. C.** 2002. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. Nature reviews. Molecular cell biology **3**:430-440.
- 263. Weigel, L. M., G. J. Anderson, R. R. Facklam, and F. C. Tenover. 2001. Genetic analyses of mutations contributing to fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrobial agents and chemotherapy **45**:3517-3523.
- 264. WHO. Pneumococcal disease, [Online]. http://www.who.int/immunization/topics/pneumococcal_disease/en/ (October 3th 2014)
- 265. Widdowson, C. A., K. P. Klugman, and D. Hanslo. 1996. Identification of the tetracycline resistance gene, tet(O), in *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrobial agents and chemotherapy 40:2891-2893.
- 266. Wieczorek, P., P. Sacha, T. Hauschild, M. Zorawski, M. Krawczyk, and E. Tryniszewska. 2008. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*--the role of AdeABC (RND family) efflux pump in resistance to antibiotics. Folia histochemica et cytobiologica / Polish Academy of Sciences, Polish Histochemical and Cytochemical Society 46:257-267.
- 267. Wierzbowski, A. K., D. Boyd, M. Mulvey, D. J. Hoban, and G. G. Zhanel. 2005. Expression of the mef(E) gene encoding the macrolide efflux pump protein increases in *Streptococcus pneumoniae* with increasing resistance to macrolides. Antimicrobial agents and chemotherapy **49**:4635-4640.

- 268. Winkelstein, J. A. 1981. The role of complement in the host's defense against *Streptococcus pneumoniae*. Reviews of infectious diseases **3**:289-298.
- 269. Wolter, N., A. M. Smith, D. J. Farrell, W. Schaffner, M. Moore, C. G. Whitney, J. H. Jorgensen, and K. P. Klugman. 2005. Novel mechanism of resistance to oxazolidinones, macrolides, and chloramphenicol in ribosomal protein L4 of the pneumococcus. Antimicrobial agents and chemotherapy 49:3554-3557.
- 270. Wu, J. Y., J. J. Kim, R. Reddy, W. M. Wang, D. Y. Graham, and D. H. Kwon. 2005. Tetracycline-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates with and without mutations in 16S rRNA-encoding genes. Antimicrobial agents and chemotherapy 49:578-583.
- 271. Wyres, K. L., L. M. Lambertsen, N. J. Croucher, L. McGee, A. von Gottberg, J. Linares, M. R. Jacobs, K. G. Kristinsson, B. W. Beall, K. P. Klugman, J. Parkhill, R. Hakenbeck, S. D. Bentley, and A. B. Brueggemann. 2012. The multidrug-resistant PMEN1 pneumococcus is a paradigm for genetic success. Genome biology 13:R103.
- 272. Yoshida, H., M. Bogaki, M. Nakamura, and S. Nakamura. 1990. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase gyrA gene of *Escherichia coli*. Antimicrobial agents and chemotherapy **34**:1271-1272.
- 273. Yoshimura, F., and H. Nikaido. 1985. Diffusion of beta-lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12. Antimicrobial agents and chemotherapy 27:84-92.
- 274. Zhanel, G. G., L. Palatnick, K. A. Nichol, T. Bellyou, D. E. Low, and D. J. Hoban. 2003. Antimicrobial resistance in respiratory tract *Streptococcus pneumoniae* isolates: results of the Canadian Respiratory Organism Susceptibility Study, 1997 to 2002. Antimicrobial agents and chemotherapy **47**:1867-1874.
- 275. Zhang, J. R., K. E. Mostov, M. E. Lamm, M. Nanno, S. Shimida, M. Ohwaki, and E. Tuomanen. 2000. The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. Cell **102**:827-837.