

**Projet de thèse : GemRam (English below)**  
**(Sous condition suspensive d'obtention du financement)**

**Intitulé du projet : Analyse Génomique de souches d'*Enterobacter cloacae* complexe Multi résistantes et caractérisation du régulateur clé RamR.**

**Acronyme du projet : GemRam**

**Période d'exécution : Automne 2024 – Automne 2027**

**Unité de recherche : Dynamicure UMR INSERM U1311, Université de Caen Normandie.**

**École doctorale de rattachement : Ecole doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement (Ed497 N BISE)**

**Salaire : 2100-2300 €/mois**

**Candidature : Le ou la candidat.e devra être titulaire d'un diplôme d'ingénieur et/ou d'un master en Biologie ou Microbiologie.**

**Joindre, CV, lettre de motivation et les coordonnées de deux personnes référentes.**

**La date limite pour l'envoi des candidatures est le 3 juin 2024.**

**Contact : Jean-Christophe Giard, [jean-christophe.giard@unicaen.fr](mailto:jean-christophe.giard@unicaen.fr), tel : 02 31 56 82 63**

### **Contexte et Objectifs**

La résistance aux antibiotiques est un défi majeur de santé publique à l'échelle mondiale. Pour la médecine humaine, il existe trois grandes conséquences liées à l'antibiorésistance (i) une augmentation des taux de morbi-mortalité des infections secondaires aux bactéries résistantes, (ii) une augmentation de la durée de séjour et des coûts de la prise en charge de ces infections, (iii) une annulation de certains actes tels que les transplantations d'organes, les chimiothérapies ou encore certaines interventions chirurgicales pour cause de colonisations et/ou infections à bactéries résistantes. L'implication des genres et espèces bactériennes dans l'antibiorésistance est variable. Les Entérobactérales résistantes aux  $\beta$ -lactamines représentent LA nouvelle menace de l'antibiorésistance vis-à-vis desquels des systèmes de surveillance à l'échelle de la planète sont déployés (World Health Organization 2021). Parmi les Entérobactéries, les membres du complexe *Enterobacter cloacae* (ECC) sont des agents pathogènes opportunistes majeurs, en particulier chez les patients hospitalisés dans les unités de soins intensifs (USI) et de réanimation. Au sein de ce complexe, l'espèce *Enterobacter hormaechei* est principalement retrouvée à partir d'échantillons cliniques et est responsable d'infections et d'épidémies hospitalières. De plus, de nombreuses souches d'ECC sont devenues résistantes aux céphalosporines à large spectre par l'hyper production de la céphalosporinase chromosomique (AmpC) et/ou par acquisition de gènes codant pour des  $\beta$ -lactamases à spectre étendu (BLSE). Encore plus alarmante est l'émergence d'entérobactéries productrices de carbapénémase (CPE), qui a accru l'attention portée aux souches d'ECC. Parallèlement à ces mécanismes enzymatiques bien connus, les pompes à efflux (en particulier celles appartenant à la famille des Résistances Nodulation-Division cellulaire [RND]) et la diminution de la perméabilité membranaire (due aux modifications de la concentration en porines) jouent un rôle majeur dans la résistance des bactéries à Gram négatif à une large gamme d'antibiotiques. En plus de mutations dans les effecteurs (pompes d'efflux et porines) des altérations des gènes impliqués dans leur régulation peuvent également contribuer à l'adaptation des souches à leur environnement et à leur échappement au système immunitaire de l'hôte. Parmi ces gènes régulateurs, RamA ajuste la perméabilité membranaire en modulant les concentrations de la pompe à efflux AcrAB-TolC ainsi que la porine OmpF. L'expression de RamA est elle-même contrôlée négativement par le régulateur RamR. Chez plusieurs espèces d'entérobactéries, il a été décrit des mutations dans le gène *ramR* qui entraînent

une surexpression de RamA, ce qui conduit à un phénotype de résistance croisée avec une augmentation des concentrations minimales inhibitrices pour quatre classes d'antibiotiques : les  $\beta$ -lactamines, les fluoroquinolones, la tigécycline et le chloramphénicol.

Le premier objectif du travail de thèse sera d'évaluer **la prévalence des mutations au sein de l'opéron ramAR** associées à des phénotypes de résistance au sein d'une population d'Entérobactérales productrices résistantes aux céphalosporines de troisième génération (ECC-C3GR) isolées dans différentes structures de soins de la région Normandie : CHU de Caen et Rouen, centres hospitaliers généraux, laboratoires de biologie médicale de ville. Deux approches seront réalisées. Des études génomiques permettront de caractériser les populations bactériennes circulantes, leur résistome, mais également de révéler la **diversité des différents éléments constituant l'opéron ramAR** ainsi que les autres régulateurs impliqués dans l'expression des pompes RND. Simultanément, une **caractérisation phénotypique des souches** sera menée par la détermination des phénotypes de résistance aux antibiotiques tels que la témocilline, la ciprofloxacine, le chloramphénicol et la tigécycline.

L'étude du « régulon RamAR » (ensemble des gènes dont l'expression est contrôlée par cet opéron) sera réalisée par des **analyses transcriptomiques globales** (RNAseq) et RT-qPCR à partir des isolats montrant des niveaux de résistances plus importants. Les analyses de RNAseq utiliseront les dernières technologies de séquençage comme celle proposée par Oxford Nanopore permettant un séquençage direct des ARN. Ces données apporteront des informations sur les cascades de régulation impliquées dans cette acquisition de « sur-résistance » chez ECC. A noter qu'il n'existe aucune donnée dans la littérature disponible sur ce sujet. L'évaluation et la compréhension des mécanismes qui sous-tendent l'adaptation et l'émergence de bactéries d'ECC multi résistantes permettront de mieux surveiller et anticiper des épidémies hospitalières.

Bien qu'un certain nombre d'études aient été menées sur les régulateurs transcriptionnels RamA et RamR très peu d'informations sont disponibles concernant les **autres gènes qui constituent les opérons ramA et ramR**. En effet, le gène situé en aval de *ramR*, et dont les parties codantes se chevauchent, code une protéine encore inconnue. De plus, le gène localisé en amont de *ramA*, probablement cotranscrit, code pour protéine possédant un domaine  $\beta$ -lactamase. Il est légitime de penser que ces polypeptides puissent être impliqués dans les mécanismes d'action des régulateurs, voire la résistance aux  $\beta$ -lactamines. Des outils génétiques sont à notre disposition pour construire des souches mutantes de ces deux gènes encore non caractérisés. Ces bactéries seront ensuite étudiées sur leurs capacités à croître dans différentes conditions de stress (pH, oxydatif, osmotique), leur virulence (en modèle d'infection de *Galleria mellonella*) et leurs résistances aux antibiotiques (antibiogrammes). La compréhension du rôle de tous les acteurs impliqués dans la cascade de régulation impliquant RamR, plus particulièrement dans l'émergence de cellules d'ECC multirésistantes, permettra d'envisager ces enzymes comme de possibles cibles thérapeutiques.

**Thesis project: GemRam (English below)**  
**(Subject to suspensive condition of obtaining financing)**

**Project title: Genomic analysis of multi-resistant *Enterobacter cloacae* complex strains and characterization of the key regulator RamR.**

**Project acronym: GemRam**

**Execution period: Fall 2024 – Fall 2027**

**Research unit: Dynamicure UMR INSERM U1311, University of Caen Normandy.**

**Attached doctoral school: Normandy Doctoral School Integrative Biology, Health, Environment (Ed497 N BISE)**

**Salary: 2100-2300 €/month**

**Application: The candidate must hold an engineering degree and/or a master's degree in Biology or Microbiology.**

**Attach, CV, cover letter and contact details of two referees.**

**The deadline for sending applications is June 3, 2024.**

**Contact: Jean-Christophe Giard, jean-christophe.giard@unicaen.fr, tel: 02 31 56 82 63**

### **Context and Objectives**

Antibiotic resistance is a major public health challenge globally. For human medicine, there are three major consequences linked to antibiotic resistance (i) an increase in morbidity and mortality rates from secondary infections by resistant bacteria, (ii) an increase in the length of stay and the costs of treatment. burden of these infections, (iii) a cancellation of certain procedures such as organ transplants, chemotherapy or even certain surgical interventions due to colonization and/or infections with resistant bacteria. The involvement of bacterial genera and species in antibiotic resistance varies. Enterobacterales resistant to  $\beta$ -lactams represent THE new threat of antibiotic resistance against which surveillance systems on a planetary scale are deployed (World Health Organization 2021). Among *Enterobacteriaceae*, members of the *Enterobacter cloacae* complex (ECC) are major opportunistic pathogens, particularly among patients hospitalized in intensive care units (ICU). Within this complex, the species *Enterobacter hormaechei* is mainly found from clinical samples and is responsible for hospital infections and epidemics. Furthermore, many ECC strains have become resistant to broad-spectrum cephalosporins through hyperproduction of chromosomal cephalosporinase (AmpC) and/or acquisition of genes encoding extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs). Even more alarming is the emergence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (CPE), which has increased attention to ECC strains. Alongside these well-known enzymatic mechanisms, efflux pumps (in particular those belonging to the Resistance Nodulation-Division [RND] family) and the decrease in membrane permeability (due to changes in porin concentration) play a major role in the resistance of Gram-negative bacteria to a wide range of antibiotics. In addition to mutations in effectors (efflux pumps and porins), alterations in genes involved in their regulation can also contribute to the adaptation of strains to their environment and their escape from the host's immune system. Among these regulatory genes, RamA adjusts membrane permeability by modulating the concentrations of the efflux pump AcrAB-TolC as well as the porin OmpF. RamA expression is itself negatively controlled by the RamR regulator. In several species of *Enterobacteriaceae*, mutations in the *ramR* gene have been described which result in overexpression of RamA, which leads to a cross-resistance phenotype with an increase in minimum inhibitory concentrations for four classes of antibiotics:  $\beta$ -lactams, fluoroquinolones, tigecycline and chloramphenicol.

The first objective of the thesis work will be to **evaluate the prevalence of mutations** within the *ramAR* operon associated with resistance phenotypes within a population of producer Enterobacterales resistant

to third generation cephalosporins (ECC-C3GR) isolated in different healthcare structures in the Normandy region: Caen and Rouen University Hospitals, general hospitals, city medical biology laboratories. Two approaches will be carried out. Genomic studies will make it possible to characterize circulating bacterial populations, their resistome, but also to reveal the diversity of the different elements constituting the *ramAR* operon as well as the other regulators involved in the expression of RND pumps. Simultaneously, **phenotypic characterization** of the strains will be carried out by determining resistance phenotypes to antibiotics such as temocillin, ciprofloxacin, chloramphenicol and tigecycline. The study of the “RamAR regulon” (set of genes whose expression is controlled by this operon) will be carried out **by global transcriptomic analyzes** (RNAseq) and RT-qPCR from isolates showing higher levels of resistance. RNAseq analyzes will use the latest sequencing technologies such as that offered by Oxford Nanopore allowing direct RNA sequencing. These data will provide information on the regulatory cascades involved in this acquisition of “over-resistance” in ECC. Note that there is no data in the literature available on this subject. The evaluation and understanding of the mechanisms underlying the adaptation and emergence of multi-resistant ECC bacteria will make it possible to better monitor and anticipate hospital epidemics.

Although a number of studies have been carried out on the RamA and RamR transcriptional regulators, very little information is available regarding **the other genes that constitute the *ramA* and *ramR* operons**. Indeed, the gene located downstream of *ramR*, and whose coding parts overlap, encodes a still unknown protein. In addition, the gene located upstream of *ramA*, probably cotranscribed, encodes a protein possessing a  $\beta$ -lactamase domain. It is legitimate to think that these polypeptides may be involved in the mechanisms of action of regulators, or even resistance to  $\beta$ -lactams. Genetic tools are at our disposal to construct mutant strains of these two still uncharacterized genes. These bacteria will then be studied on their ability to grow under different stress conditions (pH, oxidative, osmotic), their virulence (in a *Galleria mellonella* infection model) and their resistance to antibiotics (antibiograms). Understanding the role of all the players involved in the regulatory cascade involving RamR, more particularly in the emergence of multiresistant ECC cells, will allow us to consider these enzymes as possible therapeutic targets.