



HAL
open science

Intégrons de multirésistance : coût biologique et dynamique d' évolution du promoteur des cassettes

Yohann Lacotte

► **To cite this version:**

Yohann Lacotte. Intégrons de multirésistance : coût biologique et dynamique d' évolution du promoteur des cassettes. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2016. Français. NNT : 2016LIMO0068 . tel-01657881

HAL Id: tel-01657881

<https://theses.hal.science/tel-01657881>

Submitted on 7 Dec 2017

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

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

UNIVERSITE DE LIMOGES
ECOLE DOCTORALE n°524 Biologie-Santé
FACULTE de MEDECINE

Inserm UMR-S 1092

Anti-infectieux : Supports Moléculaires des Résistances et Innovations Thérapeutiques

Thèse N° [-----]

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Spécialité : Immunologie, Oncologie et Infectiologie

Présentée et soutenue par

Yohann LACOTTE

le 07 décembre 2016

**Intégrons de multirésistance : coût biologique et dynamique
d'évolution du promoteur des cassettes.**

Thèse dirigée par Mme le Dr **Sophie RAHERISON** et Mme le Pr **Marie-Cécile PLOY**

Présentée devant le jury composé de :

M. le Pr Christophe DAGOT

Président

M. le Pr Olivier TENAILLON

Rapporteur

M. le Pr Thierry NAAS

Rapporteur

M. le Dr José ESCUDERO GARCIA-CALDERO

Examineur

M. le Dr Paul-François GALLET

Examineur

Mme. le Dr Sophie RAHERISON

Directrice de thèse

Mme. le Pr Marie-Cécile PLOY

Co-directrice de thèse

A mes parents.

Remerciements

Libéréééé ♪, délivréééé ♪, je n'écrirai plus jamaiiiiiiiiis ♪♪♪ ! 3ans, c'est le temps qu'il m'aura fallu pour accoucher de ce gros bébé de 230 pages et d'un peu plus d'un kilo. Après plusieurs mois de gestation difficile, de longues heures passées en salle de travail et des séries de corrections de plus en plus rapprochées, la voilà toute belle avec son titre accrocheur et son papier si doux : ma thèse ! Heureux papa que je suis, je tenais à remercier toutes les personnes ayant contribuées de près ou de loin à ce bébé dont je suis si fier. Aussi c'est empli d'un profond sentiment de gratitude que je m'adresse à elles aujourd'hui.

Pour commencer je souhaiterais remercier les membres du jury qui m'ont honoré du titre de docteur. Je remercie tout d'abord **Christophe Dagot** pour avoir accepté de présider ce jury, **Thierry Naas** et **Olivier Tenailon**, mes deux rapporteurs, pour avoir pris le temps d'évaluer mon manuscrit en dépit de leur emploi du temps chargé et enfin **José Escudero** et **François Gallet**, mes examinateurs, qui ont contribués à faire de ma soutenance un échange scientifique enrichissant.

Je remercie également les deux personnes sans qui cette belle histoire n'aurait jamais commencé : **Marie Cécile** et **Sophie**. Merci de m'avoir donné ma chance et de m'avoir permis de rejoindre cette belle équipe. Sophie merci pour ton sourire, tes encouragements et ta bienveillance. Ce fut un véritable plaisir de travailler à tes cotés durant ces 3 années.

J'ai aussi une énorme pensée pour tous les membres du labo avec qui j'ai passé 3 merveilleuses années. Un immense merci à **Mumu** et à la **Flo** avec qui j'ai partagé tant d'éclats de rire, de discussions gênantes* mais aussi de longues soirées studieuses à rédiger et à manger comme des gros. Sans votre soutien et votre

* Top 3 des discussions gênantes : la mooncup (si si c'est trop bien pour faire la roue !), la fée des règles et le caleçon loup.

bonne humeur ma fin de thèse aurait sans doute été beaucoup moins drôle. Prochaine étape les boulettes ! Un grand merci à mes co-bureaux, **Clairounette** et **Margaux**, avec qui j'ai également partagé de nombreux rires. Claire merci pour ta gentillesse, nos discussions personnelles et/ou scientifiques, tous ces sushis/sashimis partagés et nos courses/bastons vidéoludiques survitaminées. Maman Margaux, merci pour ta bienveillance et ton sourire. Merci de m'avoir suivi, sans doute à tes dépens, dans tous mes délires cinématographiques. A quand les prochains tutos ? J'ai aussi une énorme pensée pour ma **Lelo**, mon petit rayon de soleil. Merci pour ton soutien et tous les moments partagés ensemble au détour d'un thé. J'espère à mon tour pouvoir te soutenir dans ces longs mois de rédaction à venir. Merci **Deby** pour nos instants « piscine », et ta très large contribution à l'élargissement de ma culture youtubesque (No no no no can't you feel my love 🎵🎵). Un grand merci à **Benjamin**, **Jean** et **Rémi** avec qui je partage désormais d'inoubliables souvenirs en terre nipponne. Je n'ai qu'une hâte repartir ! Un merci particulier à Ben en qui j'ai découvert bien plus qu'un compagnon de voyage et chez qui se sont déroulées quelques unes de mes soirées les plus mémorables. Merci également à **Chloé**, nouvelle (mais pas trop) doctorante, pour sa bonne humeur légendaire et l'irrésistible bruit de ses talons dans le couloir. Je remercie également **Martine** pour sa bonne humeur et ses délicieux chocolats, **Sophie Alain** pour son sourire et sa joie de vivre si communicative, **Olivier** et **Thomas** pour leurs nombreux conseils, **Fabien** pour ces nombreuses facéties, **Christian** et **Sébastien** pour leur bienveillance, **Elena** pour sa gentillesse, **Melissa** pour son énergie débordante, **Sandra** pour sa gestion rigoureuse du budget de l'équipe (et plus sérieusement sa gentillesse) et enfin **Nicolas** et **Laëtitia** nos techniciens fraîchement arrivés. J'ai aussi une pensée pour quelques uns des nombreux stagiaires passés au labo

notamment **Kévin** et **Camille** qui m'ont assisté sur quelques manips mais aussi **Claire D** pour son pep (comme le dit si bien notre ami Le Populaire), **Alex** pour toutes nos discussions, **Célin** pour sa bonne humeur et sa franchise, **Manon** ma petite mouche des îles pour sa folie et son sourire mais aussi **Ana**, **Ludivine**, **Lilian** ou encore **Thibault**. Je remercie également nos voisins de l'UMR 1094 qui contribuent aussi à la bonne ambiance du labo en particulier ma petite **Clotilde** dont la bonne humeur me réchauffe le cœur.

Je remercie également tous les gens ayant contribué à ce travail : **Emilie** et **Valentin** de la plateforme Génolim, **Cathy** et **Tan Ouk** pour leur expertise respective sur la cytométrie et les analyses HPLC, **Odile-Raya-Sandie** et **Anais** de la laverie pour leur gentillesse, leur sourire et leur efficacité en débit de mes nombreuses sollicitations et enfin l'équipe de **William Couet** à Poitiers (UMR-S 1070) pour leur aide précieuse lors des dosages de nos antibiotiques de travail.

Je remercie également ma famille pour leur patience, leur compréhension et leur soutien sans faille. Je remercie particulièrement mes parents, **Sylvie** et **Jean-Pierre**, dont les nombreux sacrifices m'ont permis d'être ici aujourd'hui. Après avoir pris soin de mon frère et moi pendant toutes ces années, j'espère qu'ils s'accorderont maintenant le temps qu'ils méritent. Je remercie également **Lucas**, mon petit frère expatrié, pour ces encouragements tous au long de ces trois années. J'ai aussi une pensée particulière pour mes **grands parents** dont certains partis trop tôt, ma **tata Véro** ainsi que mes oncles, tantes et cousins.

Enfin, j'ai une pensée pour mes amis de longues dates **Renaud**, **Anne Claire** et autres **BSiens** (Camille, Caro, Pierre, Florence, Jo, Thibault...) ainsi que **Cécile** et **Gaétane**. J'ai beaucoup de chance de tous vous connaître et j'espère pouvoir être un peu plus présent maintenant que je me suis acquitté de mes devoirs de thésard.

Je terminerai ces remerciements en m'adressant à toutes les personnes que j'aurais malencontreusement pu oublier. Ne m'en veuillez pas trop, la vieillesse me guette !

Sur ce, je vous souhaite à tous une bonne lecture !

Sommaire

Résumé	12
Abstract	13
Index des Tables	14
Index des Figures	15
Liste des annexes	19
Liste des abréviations	20
Préambule	22
I. Le miracle antibiotique	23
II. Un miracle éphémère : l'apparition de résistances	26
Etude bibliographique	30
Chapitre 1 - Mécanismes d'acquisition des gènes de résistance	32
I. Les mutations	33
A. Définition.....	33
B. Mutations et antibiorésistance.....	34
1. Mutations dans le gène de la cible de l'antibiotique.....	34
2. Mutations des régulateurs de gènes de résistance.....	35
3. Rôle des mutations dans l'évolution de la résistance.....	35
II. Les transferts horizontaux de gènes	37
A. Les mécanismes des transferts horizontaux de gènes.....	37
1. La conjugaison.....	37
2. La transduction.....	38
3. La transformation.....	39
B. Les éléments génétiques mobiles (EGM) impliqués dans la dissémination de l'antibiorésistance.....	40
1. Les plasmides.....	40
2. Les éléments intégratifs conjugatifs (ICE).....	41
3. Les séquences d'insertions (IS).....	41
4. Les transposons.....	42
5. Les intégrons.....	43

III. Implication de la réponse SOS dans l'acquisition et la dissémination de la résistance.	44
A. La réponse SOS.	44
B. L'activation de la réponse SOS suite à des dommages à l'ADN favorise l'apparition de mutations.	45
C. L'activation de la réponse SOS suite à des dommages à l'ADN favorise la dissémination de nombreux EGM.	46
D. Les antibiotiques sont capables d'induire la réponse SOS.	47
Chapitre 2 - Appréhender la propagation de la résistance aux antibiotiques au travers de l'évolution expérimentale.	49
I. La propagation de la résistance : une histoire de sélection naturelle.	50
A. La sélection naturelle : définition et concepts.	50
B. La pression de sélection antibiotique : principale responsable de la propagation de la résistance.	51
C. Qu'en est-il de la résistance dans des milieux dépourvus d'antibiotiques ?	53
II. Le coût biologique de la résistance.	56
A. Déterminer le coût d'une résistance expérimentalement.	56
B. Le coût de la résistance.	59
1. Coût de la résistance chromosomique.	59
2. Le coût de la résistance associée aux éléments génétiques mobiles (EGM).	61
III. L'évolution expérimentale : un moyen d'apporter des réponses.	65
A. Définition.	65
B. Comment propager des bactéries sur de nombreuses générations ?	66
1. Repiquage successif : culture discontinue dite en batch.	66
2. Culture continue en chemostat.	68
C. Comment faire le lien entre le phénotype et le génotype ?	70
D. Ce que nous apprend l'évolution expérimentale.	72
1. Plusieurs réponses à un stress donné.	72
2. Dynamique temporelle de l'adaptation.	75
3. Et la résistance dans tout ça ?	75
Chapitre 3 - Modèle d'étude : les intégrons de multirésistance	78
I. Les IM : une plateforme fonctionnelle contenant 3 éléments clés.	79
A. Le gène <i>intl</i> et la protéine Intl.	79
B. Le site de recombinaison <i>attI</i> .	80
C. Le promoteur Pc.	81

II.	Les cassettes : la partie variable de l'intégron.	82
A.	Les cassettes, un réservoir de gènes de résistance.	82
B.	Le site <i>attC</i> , un site indispensable à la mobilité des cassettes.	83
III.	Paramètres influençant l'expression des gènes contenus dans les cassettes.	85
A.	La force du promoteur Pc.	85
B.	La position de la cassette.	86
C.	Les signaux internes de traduction.	86
IV.	Un réseau de cassettes dynamique.	88
A.	Une dynamique reposant sur l'intégrase IntI1, une recombinase à tyrosine spécifique.	88
B.	Réactions de recombinaison catalysées par IntI.	89
1.	Recombinaison <i>attI/attC</i> : insertion de cassette.	89
2.	Recombinaison <i>attC/attC</i> : excision de cassette.	90
3.	Autres types de recombinaisons.	91
C.	Réarrangement de cassettes en réponse à un stress antibiotique.	92
D.	Paramètres influençant le potentiel recombinogène des l'intégron.	93
1.	Influence du polymorphisme du Pc.	93
2.	La structure des sites <i>attC</i> .	93
V.	Un système dynamique finement régulé.	96
A.	Régulation par la réponse SOS.	96
B.	Autres régulations connues.	96
VI.	Diversité épidémiologique des IM.	98
A.	Diversité des IM.	98
1.	Les IM1.	98
2.	Les IM2.	99
3.	Les IM3.	100
B.	Les bactéries hôtes.	101
1.	Les bactéries à Gram négatif (BGN).	101
2.	Les bactéries à Gram positif (BGP).	102
C.	Les réservoirs.	102
1.	L'homme.	102
2.	Le monde animal.	103
3.	L'environnement.	105

VII. Origine et histoire évolutive des intégrons.....	107
VIII. Coût biologique des intégrons.	109
Objectifs du travail de thèse.....	111
Résultats.....	115
Axe 1 : Etude du coût biologique des intégrons de classe 1 chez <i>E. coli</i>.....	116
Abstract	119
Introduction	120
Materials and Methods.....	123
Bacteria and plasmids	123
Construction of the MG1656 λ att::gfp strain.....	123
Determination of minimal inhibitory concentrations	123
Competition experiments	123
Flow cytometry	124
Calculating the selection coefficient.....	124
Results	126
Effect of Pc polymorphism on the cost of class 1 integrons in <i>E. coli</i>	126
The IntI1 fitness cost is related to integrase catalytic activity	127
Influence of the cassette array contents	128
Impact of subinhibitory antibiotic concentrations	128
Discussion.....	131
Acknowledgements.....	138
References.....	139
Supplementary data	145
Axe 2 : Mise au point d'un système de chemostat au laboratoire.	150
I. Matériel et Méthodes.	152
A. Souche bactérienne et plasmide.	152
B. Milieu de culture.	152
C. Dispositif expérimental.	152
D. Suivi de la densité de population.	153
E. Suivi de la concentration en glucose.	153
F. Suivi de la stérilité.	153
G. Numérations bactériennes.....	153
H. Vérification de la stabilité des antibiotiques.	154

II. Résultats	155
A. Optimisation du système.....	155
1. Bain à sec ou bain marie ?	155
2. Simplification du dispositif technique.....	155
3. Choix du débit (D) imposé au chemostat.....	156
4. Choix de la concentration en glucose dans le milieu frais.....	157
B. Validation du protocole technique.....	158
1. Une biomasse constante dans les réacteurs ?	158
2. Une source de carbone limitante ?.....	158
3. Stérilité garantie ?.....	159
4. Des antibiotiques stables chimiquement ?.....	159
Axe 3 : Dynamique d'évolution du promoteur Pc des intégrons de classe 1	161
I. Matériel et méthodes	164
A. Bactéries, plasmides, milieux de culture et antibiotiques.....	164
B. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).....	164
C. Expérience d'évolution en chemostat.....	165
D. Deep-sequencing de la région promotrice.....	165
E. Analyse des populations bactériennes évoluées.....	167
1. Détermination de la sensibilité des souches évoluées à la tobramycine.....	167
2. Détermination du fitness des populations évoluées.....	167
3. Elimination du fond chromosomique des bactéries évoluées.....	168
4. Séquençage partiel des plasmides évolués.....	168
5. Vérification de duplication de la cassette <i>aac(6)-Ib</i>	169
6. Détermination du nombre de copies de plasmides.....	169
II. Résultats	170
A. Limite de détection de la méthode de séquençage Ion Torrent™.....	170
B. Deep-sequencing de la région promotrice.....	170
C. Caractérisation des souches évoluées.....	171
Discussion	175
I. Le coût biologique des intégrons	177
II. Dynamique d'évolution du promoteur Pc	185
Conclusions – Perspectives	192

Bibliographie	197
Annexes	228
Communications scientifiques.....	231

Résumé

Les intégrons de multirésistance sont des plateformes génétiques permettant aux bactéries de s'adapter à des pressions antibiotiques. Ils leur permettent de capturer et d'exprimer des gènes de résistance sous forme de cassettes. La capture et le réarrangement des cassettes sont réalisés par une intégrase dont l'expression est régulée par la réponse SOS chez *E. coli*. L'expression des cassettes est quant à elle assurée par le promoteur Pc.

Les travaux présentés dans ce manuscrit visent à préciser deux aspects liés à la **dynamique d'évolution des intégrons**.

L'étude du **coût biologique des intégrons** a montré que ceux-ci sont des structures génétiques très peu coûteuses pour *E. coli*. Ce faible coût est notamment lié à la répression du gène de l'intégrase par la réponse SOS. Dans ces conditions de répression, le coût d'un intégron dépend de l'expression du réseau de cassettes et de son contenu. Ainsi ce coût augmente avec la force du promoteur Pc et le nombre de cassettes dans le réseau. D'autre part, le coût lié à la nature des cassettes est variable.

L'étude de la **dynamique d'évolution du promoteur Pc** visait à vérifier l'hypothèse selon laquelle des pressions antibiotiques auraient conduit à l'émergence de promoteurs forts à partir d'un variant ancestral faible. L'évolution d'une souche de *E. coli*, contenant un intégron plasmidique portant un variant faible de Pc, a été réalisée en chemostat sur 200 générations. L'analyse des populations évoluées par deep-sequencing n'a pas permis de mettre en évidence l'émergence de variants forts de Pc. Néanmoins, l'étude de ces populations évoluées révèle une part majoritaire d'évolution chromosomique. Dans ces conditions, l'absence d'évolution du Pc pourrait attester soit d'une réalité biologique ou soit d'un protocole expérimental d'évolution à optimiser.

Mots clés : Antibiorésistance – Intégron – Coût biologique – Evolution

Abstract

Resistance integrons are genetic platforms able to catch and express resistance genes embedded within gene cassettes. Capture and reshuffling of gene cassettes are mediated by the integrase whose expression is regulated by the SOS response in *E. coli*. Gene cassettes are then expressed from the Pc promoter.

This work aims to clarify the evolution dynamic of integrons.

In a first part, the **fitness cost of class 1** integron was assessed in *E. coli*. Results reveal that integrons are low cost structures and that their cost is reduced by the SOS-mediated repression system. While repressed, the cost of an integron mostly depends on cassettes array expression. The cost of an integron therefore increases with Pc strength and the number of cassettes in the array. Furthermore, different cassettes exhibit different costs.

In a second part, the **evolution dynamic of Pc promoter** was assessed in response to antibiotic pressures. An *E. coli* strain, carrying a plasmidic integron with a weak Pc promoter, was propagated in chemostat for 200 generations. The deep-sequencing of evolved populations did not reveal any mutations in the promoter region. On the other hand, evolved bacteria presented evidence of chromosomal adaptation. In these conditions, the lack of evolution within the Pc region could reveal either a biological reality or an experimental protocol to optimize.

Keywords: Antibiotic resistance – Integron – Fitness cost – Evolution

Index des Tables

Table 1 : Diminution du taux de mortalité liés aux infections bactériennes aux Etats-Unis au cours du siècle dernier.

Table 2 : Exemples d'éléments intégratifs conjugatifs (ICE) véhiculant des gènes de résistance.

Table 3 : Quelques gènes du régulon SOS et leurs fonctions.

Table 4 : Pourcentage d'identité (en rouge) et de similarité (en vert) entre les séquences protéiques des intégrases de classe 1, 2 et 3.

Table 5 : Principaux variants de promoteurs Pc des IM de classe 1.

Table 6 : Polymorphisme du Pc et activité de l'intégrase associée.

Table 7 : Richesse en sites de recombinaison secondaires pour IntI chez différentes bactéries.

Table 8 : Souche et plasmide utilisés.

Table 9 : Composition du milieu Davis minimum.

Table 10 : Souches bactériennes et plasmides utilisés.

Table 11 : CMI de la souche MG1656 $\lambda_{att::gfp}$ (pW-*aac(6')*lb) vis-à-vis de la tobramycine et de la ciprofloxacine dans deux milieux d'intérêt.

Table 12 et 13 : Mélange réactionnel et conditions d'amplification utilisés pour préparer les bibliothèques d'échantillons.

Table 14 : Amorces utilisées pour la quantification des plasmides par q-PCR.

Table 15 : Sensibilité à la tobramycine des bactéries évoluées (BE) et de bactéries non évoluées contenant les plasmides évolués (BNE +PE).

Table 16 : Sensibilité à la tobramycine et quantification des copies de plasmides dans les souches évoluées.

Table 17 : Bilan de l'analyse des populations évoluées.

Index des Figures

Figure 1 : Frise chronologique de la mise sur le marché des nouvelles classes d'antibiotiques.

Figure 2 : Dix principales causes de mortalités en 1900 et 2012.

Figure 3 : Nombre d'autorisations de mise sur le marché de nouvelles molécules antibiotiques aux Etats Unis par tranche de cinq ans.

Figure 4 : Frise chronologique de l'apparition de la résistance.

Figure 5 : Développement de shigelles multirésistantes au Japon en lien avec l'introduction de nouvelles molécules antibiotiques.

Figure 6 : Emergence de la résistance après introduction en thérapeutique.

Figure 7 : Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques.

Figure 8 : Régulation de l'expression du gène de résistance *ampC*, encodant une β -lactamase.

Figure 9 : L'opéron *marRAB* et son implication dans la résistance.

Figure 10 : La conjugaison bactérienne et le système de sécrétion de type IV.

Figure 11 : Transductions généralisée et spécialisée.

Figure 12 : Les acteurs de la transformation chez les bactéries à Gram positif et négatif.

Figure 13 : Effet « poupées russes » des éléments génétiques mobiles (EGM).

Figure 14 : Schéma de l'organisation d'un élément intégratif conjugatif (ICE).

Figure 15 : Représentation schématique d'une séquence d'insertion, d'un transposon composite et d'un transposon non composite de type Tn3.

Figure 16 : Structure de la protéine LexA

Figure 17 : La réponse SOS.

Figure 18 : Corrélation entre la consommation d'antibiotiques et la résistance dans 16 pays.

Figure 19 : Coût biologique et sélection en présence de concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques.

Figure 20 : Le coût biologique de la résistance chromosomique.

Figure 21 : Corrélation entre le coût de la résistance chromosomique et le niveau de résistance associée (augmentation de la CMI).

Figure 22 : Le coût de la résistance est fonction de son support.

Figure 23 : Le coût de la résistance plasmidique dépend du nombre de gènes de résistance portés.

Figure 24 : Coût de la résistance plasmidique et taille des plasmides.

Figure 25 : Cinétique d'une population bactérienne lors d'une culture en batch.

Figure 26 : Illustration du goulot d'étranglement inhérent à la culture discontinue en batch.

Figure 27 : Principe de fonctionnement d'un chemostat.

Figure 28 : Illustration du paysage adaptatif ou « fitness landscape » d'une bactérie.

Figure 29 : Trajectoire évolutive des bactéries résistantes dans un environnement spatialement structuré.

Figure 30 : Représentation simplifiée de la dynamique adaptative d'une population bactérienne dans un milieu homogène.

Figure 31 : Organisation fonctionnelle d'un intégron.

Figure 32 : Structure du site *attI*.

Figure 33 : Structure du site de recombinaison *attC*.

Figure 34 : Organisation de la région promotrice des IM de classe 1.

Figure 35 : Alignement des domaines C-ter de recombinases à tyrosine.

Figure 36 : Recombinaison *attI/attC*.

Figure 37 : Recombinaison *attC/attC*.

Figure 38 : Recombinaison *attI/attI*.

Figure 39 : Modèle de réarrangement du réseau de cassettes en réponse à un stress antibiotique.

Figure 40 : Motifs structuraux impactant le pouvoir recombinogène des sites *attC*.

Figure 41 : Alignements de séquences d'IM1 chromosomiques et d'IM1 associés à des Tn402.

Figure 42 : Histoire évolutive des IM1.

Figure 43 : Des chemostats de laboratoire tels que décrit dans Miller *et al.*, 2013.

Figure 44 : Schéma du dispositif de chemostat utilisé au laboratoire.

Figure 45 : Effet du débit sur différentes caractéristiques du chemostat.

Figure 46 : Photographies du dispositif de travail.

Figure 47 : Suivi de la densité bactérienne au cours du temps dans 6 chemostats indépendants.

Figure 48 : Suivi de la concentration en glucose au cours du temps dans 6 chemostats indépendants.

Figure 49 : Stabilité des trois antibiotiques d'intérêt.

Figure 50 : Modèle de co-évolution des variants de Pc et de l'intégrase Int11.

Figure 51 : Principe du séquençage Ion Torrent™.

Figure 52 : Principe de préparation des bibliothèques par PCR.

Figure 53 : Sensibilité de la méthode de séquençage Ion Torrent™.

Figure 54 : Pourcentage de mutants détectés par deep sequencing en position 2 du promoteur Pc dans les populations bactériennes évoluant en chemostat.

Figure 55 : Pourcentage de mutants détectés par deep sequencing en position 27 du promoteur Pc dans les populations bactériennes évoluant en chemostat.

Figure 56 : Fitness des BE et BNE + PE évalué par rapport à la souche ancestrale.

Figure 57 : Vérification par PCR de duplication du gène *aac(6')-Ib*.

Figure 58 : Quantification du nombre de copies de plasmides dans les bactéries évoluées.

Liste des annexes

Table 1S : Amorces utilisées pour préparer les bibliothèques d'échantillons pour le séquençage Ion Torrent™.

Liste des abréviations

°C	Degré Celsius
3'CS	Région 3' conservée
5'CS	Région 5' conservée
5'RACE	Rapid amplification of cDNA 5' ends
A	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN-sb	ADN simple brin
ARN	Acide ribonucléique
BE	Bactérie évoluée
BGN	Bactérie à Gram négatif
BGP	Bactérie à Gram positif
BNE + PE	Bactérie Non Evoluée + Plasmide Evolué
pb	Paire de base
C	Cytosine
Cip	Ciprofloxacine
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CMS	Concentration minimale sélective
D	Débit ou taux de dilution
D _{crit}	Débit critique
DM	Milieu Davis Mingioli
DM25	Milieu Davis Mingioli supplémenté en glucose à 25 µg/mL
DM250	Milieu Davis Mingioli supplémenté en glucose à 250 µg/mL
dNTP	Désoxyribonucléotide
DO	Densité optique
DO _{600nm}	Densité optique mesurée à 600 nanomètres
EGM	Elément génétique mobile
EHB	Base extra-hélicoïdale
freq	Fréquence
FSC	Forward scatter (mesure de diffraction en cytométrie)
g	Gramme
G	Guanine
GFP	Green fluorescent protein
h	Heure
ICE	Elément intégratif conjugatif
ICS	Intégron chromosomique sédentaire
IM	Intégron de multirésistance
IM1	Intégron de classe 1
IM2	Intégron de classe 2

IM3	Intégron de classe 3
IR	Séquence inversée répétée
IRL	Séquence inversée répétée gauche
IRR	Séquence inversée répétée droite
IS	Séquence d'insertion
ISCR	Insertion sequence common region
J.C.	Jésus Christ
Km	Kanamycine
λ	Longueur d'onde
L	Litre
LB	Milieu Luria Bertani
mg	Milligramme
MH	Milieu Mueller Hinton
mL	Millilitre
nm	nanomètres
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORF	Cadre ouvert de lecture
Pc	Promoteur des cassettes
PCR	Polymerase chain reaction
Pint	Promoteur de l'intégrase
PSM	Poste de sécurité microbiologique
PVC	Polychlorure de vinyle
qPCR	Quantitative PCR
R	Purine
RBS	Site de fixation au ribosome
<i>s</i>	Coefficient de sélection
SSC	Side scatter (mesure de réflexion et réfraction en cytométrie)
T	Thymine
T4SS	Système de sécrétion de type IV
TIR	Région d'initiation de la traduction
Tob	Tobramycine
μ	Taux de croissance horaire
μg	Microgramme
μL	Microlitre
μM	Micromolaire
UCS	Unpaired central spacer
UFC	Unité formant colonie
VTS	Variable terminal structure
<i>W</i>	Fitness relatif
Y	Pyrimidine

Préambule

“The future of humanity and microbes likely will unfold as episodes of [...] our wits versus their genes.”

Joshua Lederberg

I. Le miracle antibiotique.

L'Histoire est ponctuée de célèbres pandémies d'origine bactérienne. La première de ces épidémies remonte à la Grèce antique, lors de la guerre du Péloponnèse entre -430 et -426 avant J.C. Entre 70000 et 80000 athéniens décèdent du typhus des suites d'une infection par des bactéries du genre *Rickettsia* (Papagrigrakis et al., 2006). *Yersinia pestis* a elle aussi à plusieurs reprises ravagé la planète. Au VIe siècle, la peste de Justinien tue 25 millions de personnes autour du bassin méditerranéen (Harbeck et al., 2013). Au XIVe siècle, la peste noire décime entre 25 et 50 millions de personnes en Europe en l'espace de 5 ans (Haensch et al., 2010). Plus récemment au XIXe siècle, le choléra et *Vibrio cholerae* font plusieurs millions de morts en Europe, Afrique et Amérique. L'homme a longtemps été désarmé face aux bactéries pathogènes. Néanmoins la découverte des antibiotiques au début du siècle dernier va permettre de changer le cours des choses.

Le nom « antibiotique », a été défini en 1947 par Selman Waksman (Waksman, 1947). Ce terme désigne une molécule organique capable d'inhiber la croissance bactérienne (antibiotiques bactériostatiques) ou bien capable de détruire les bactéries (antibiotiques bactéricides). Les antibiotiques sont en majorité synthétisés par des microorganismes (antibiotiques d'origine naturelle) ou des dérivés de molécules produites par des microorganismes (antibiotiques hémisynthétiques). Les autres sont purement issus de la chimie et sont qualifiés d'antibiotiques synthétiques.

Le premier antibiotique a été découvert à la fin des années 20 par Alexander Fleming. De retour de congés, ce dernier découvre des moisissures de *Penicillium*

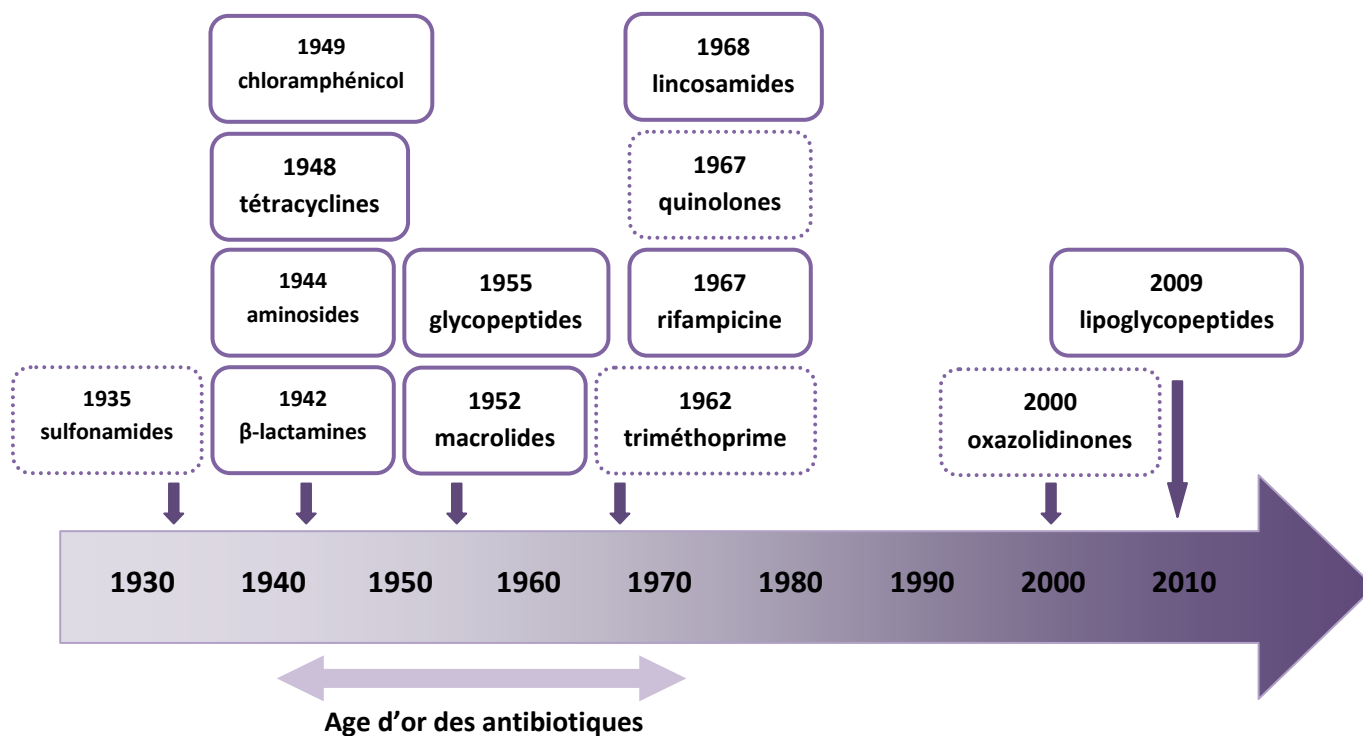


Figure 1 : Frise chronologique de la mise sur le marché des nouvelles classes d'antibiotiques.

D'après les données de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé)

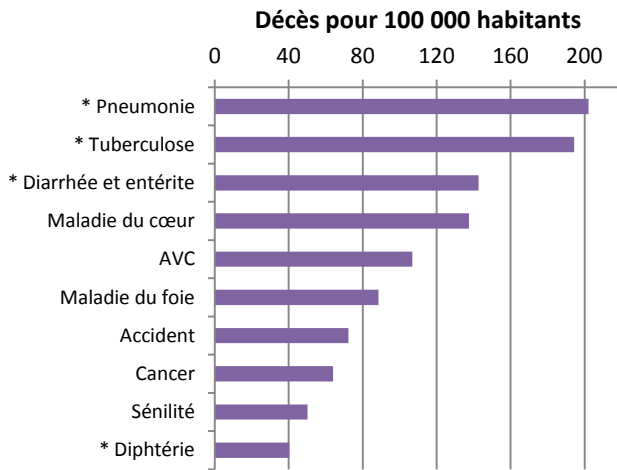
La majorité des nouveaux antibiotiques a été découverte et introduite sur le marché entre les années 40 et 70. Depuis lors la découverte de nouvelles molécules est difficile. Les cadres en trait plein représentent les antibiotiques d'origine naturelle ou hémi-synthétiques. Les cadres en pointillés représentent les antibiotiques purement synthétiques.

notatum sur des boîtes de Pétri qu'il avait laissées sur sa paillasse avant son départ. Stupeur, autour du champignon, les staphylocoquesensemencés par le chercheur ont été lysés. Le champignon produit une substance toxique pour les bactéries. Après plusieurs mois de travail, il parvient finalement à isoler la molécule responsable de cette activité, une molécule qu'il nomme pénicilline (Fleming, 1929). La pénicilline étant difficile à produire à grande échelle, il faudra attendre 1942 pour qu'elle soit testée chez l'homme et commercialisée. La pénicilline est la première β -lactamine de l'histoire des antibiotiques.

Entre temps un autre antibiotique a déjà été commercialisé : le Prontosil, le premier des sulfonamides. L'effet antimicrobien de cette molécule de synthèse a été découvert en 1931 par un bactériologiste allemand Gerhard Domagk. Il permet de traiter efficacement les infections à streptocoques chez le rat et le lapin (Domagk, 1935). S'en suivent des essais sur l'homme qui s'avèrent concluants (Colebrook and Kenny, 1936). Le Prontosil est mis sur le marché en 1935.

L'efficacité de ces deux antibiotiques a été constatée dès la Seconde Guerre mondiale. Les soldats américains disposaient par exemple de sachets de sulfonamides en poudre pour traiter leurs plaies et éviter les infections. De même, la pénicilline a permis de prévenir de nombreuses épidémies de gangrène et d'éviter nombre de septicémie durant les dernières années de la grande guerre. Les antibiotiques vont alors apparaître comme de véritables « molécules miracles » permettant de terrasser la menace bactérienne. Va alors se mettre en place une véritable course à la découverte de nouvelles molécules antibiotiques entre les années 40 et 70 (Figure 1).

A – 1900.



B -2000.

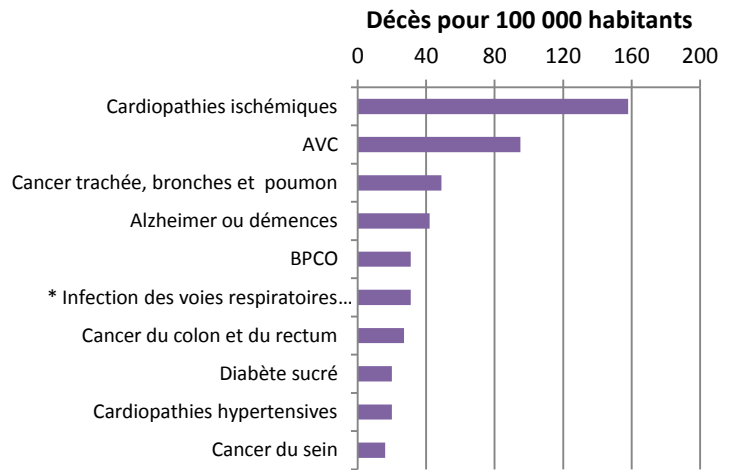


Figure 2 : Dix principales causes de mortalités en 1900 et 2012.

Les causes de décès impliquant des bactéries sont précédées d'un astérisque. AVC = Accident Cardio-Vasculaire, BPCO = BronchoPneumopathie Chronique Obstructive.

- A- Dix principales causes de mortalité en 1900 aux Etats Unis. D'après les données du National Office of Vital Statistics.
- B- Dix principales causes de mortalité en 2012 dans les pays à revenu élevé. D'après les données de l'Organisation Mondiale de la Santé.

Table 1 : Diminution du taux de mortalité liés aux infections bactériennes aux Etats-Unis au cours du siècle dernier. D'après les données du National Office of Vital Statistics

Année	Décès pour 100 000 habitants dus à des infections bactériennes
1930	247.7
1936	216.3
1950	59.7
1960	50.4
2002	38.1

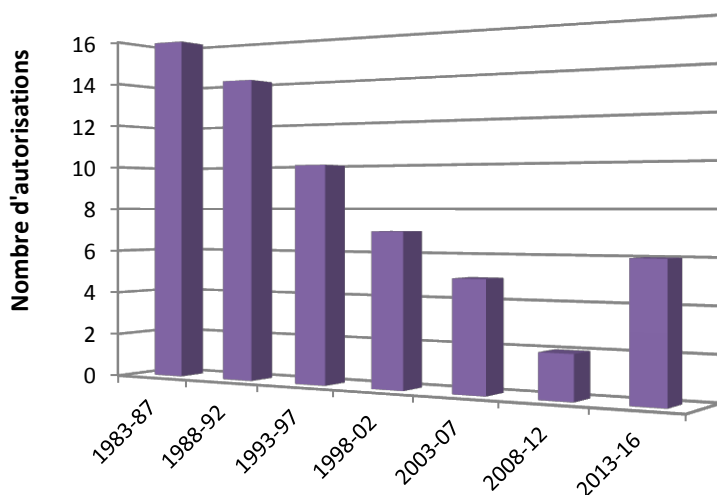


Figure 3 : Nombre d'autorisations de mise sur le marché de nouvelles molécules antibiotiques aux Etats Unis par tranche de cinq ans. D'après les données de la FDA (Food and Drug Administration)

Malgré un soubresaut ces 5 dernières années, le nombre de nouvelles molécules mises sur le marché est en déclin depuis 30 ans.

Les bienfaits de ces molécules sont évidents. Au début du XXe siècle, les principales causes de mortalité étaient liées à des infections d'origine bactérienne (Figure 2). L'introduction des antibiotiques sur le marché a concouru à l'amélioration de l'espérance de vie en faisant graduellement reculer le taux de mortalité lié aux infections bactériennes (Table 1). Aujourd'hui encore les antibiotiques sont partis prenants de la médecine moderne et sont nécessaires à la prévention d'infections lors de nombreux traitements médicaux plus complexes : chimiothérapies, transplantations, chirurgies cardiaques entre autres (Gould and Bal, 2013 ; Ventola, 2015).

Malgré cette avancée indéniable en matière de santé publique, le « miracle » antibiotique est aujourd'hui confronté à ses limites. La course aux antibiotiques évoquée plus tôt a en effet rendu la découverte de nouvelles molécules antibiotiques difficile. Preuve en est, le nombre d'antibiotiques mis sur le marché est en perpétuel déclin depuis les 30 dernières années (Figure 3). Face à cette stagnation de l'arsenal thérapeutique, une nouvelle menace s'impose : l'émergence et la propagation de la résistance chez les bactéries.

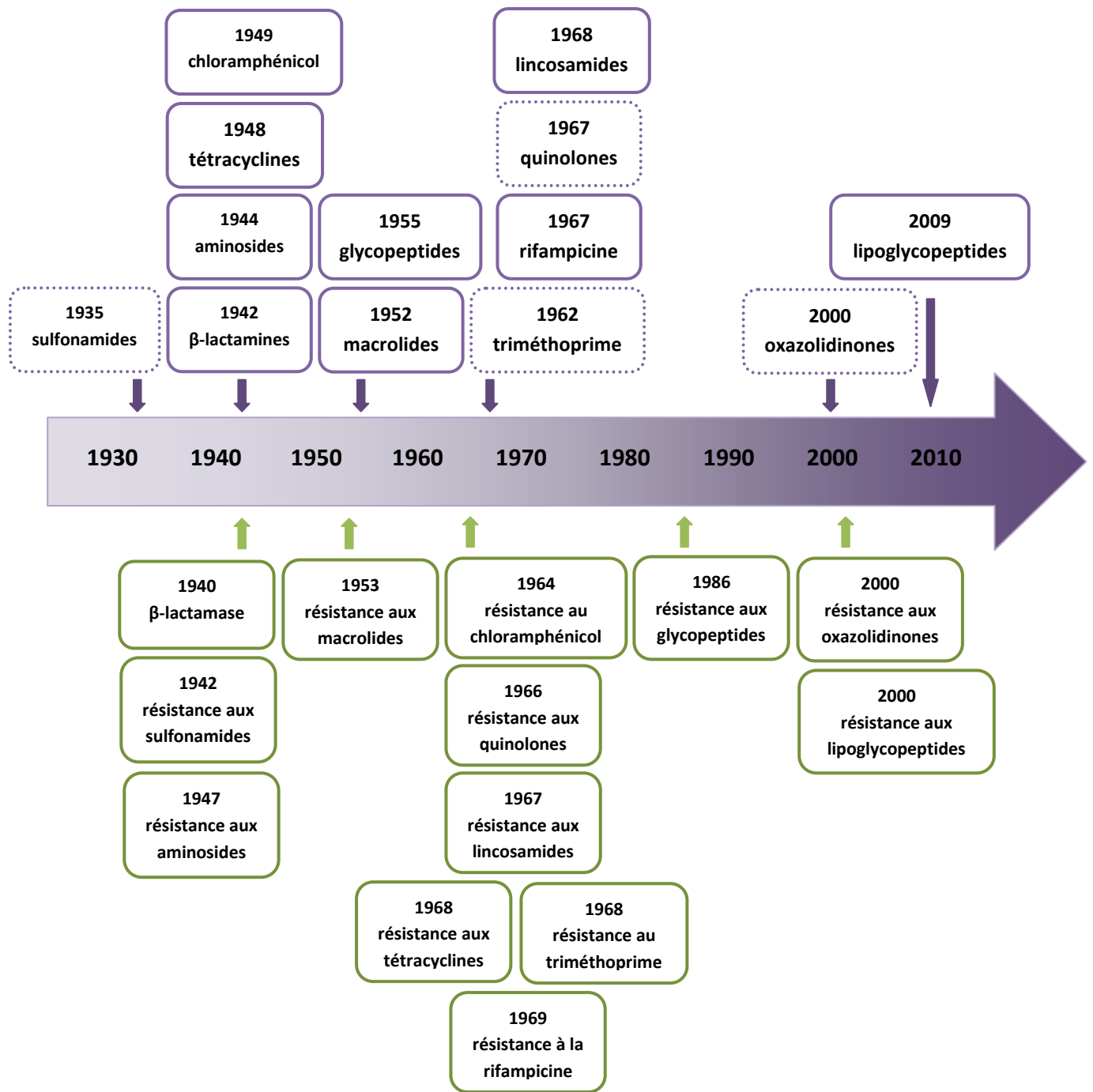


Figure 4 : Frise chronologique de l'apparition de la résistance. D'après les données de l'OMS

En violet sont rappelées les dates de mise sur le marché des différentes familles d'antibiotiques. En vert sont mentionnés les premiers événements de résistance rapportés.

II. Un miracle éphémère : l'apparition de résistances.

L'euphorie aura été de courte durée. En 1940, douze ans après les travaux de Fleming, une enzyme bactérienne capable d'inactiver la pénicilline est découverte (Abraham and Chain, 1940). Cette découverte est la première d'une longue série. Au cours des années qui vont suivre des mécanismes de résistances à la totalité des familles d'antibiotiques vont être décrits (Figure 4). Malheureusement ces résistances vont rapidement diffuser dans le contexte clinique. Dès 1947, soit trois ans après la mise sur le marché de la pénicilline, plusieurs hôpitaux londoniens font état de cas d'infections à staphylocoques résistants à la pénicilline (Barber, 1948, 1947a) et d'une augmentation rapide de ces cas de résistance : 14% de souches résistantes en 1946 contre 38% en 1947 (Barber, 1947b).

Pour expliquer cette propagation rapide des souches résistantes, les scientifiques de l'époque, Fleming en tête, proposent que les bactéries soient capables de « s'éduquer » aux antibiotiques. Néanmoins à l'époque, au-delà des phénomènes de mutation et de sélection, les raisons de cette rapide éducation demeuraient encore un mystère. Il faudra attendre les années 50 pour qu'un nouveau pan du mystère soit levé dans un Japon en proie à la shigellose. Pour lutter contre cette dysenterie, trois nouvelles molécules antibiotiques sont mises sur le marché : la streptomycine, le chloramphénicol et la tétracycline. Elles rejoignent les sulfonamides alors utilisés en clinique. Malheureusement très vite vont émerger des shigelles résistantes aux quatre antibiotiques (Figure 5, page suivante). Conceptuellement cette multirésistance pose problème. L'apparition conjointe de quatre résistances ne peut reposer uniquement sur des mutations. Deux scientifiques japonais, Akiba et Ochai proposent alors que les shigelles aient acquis

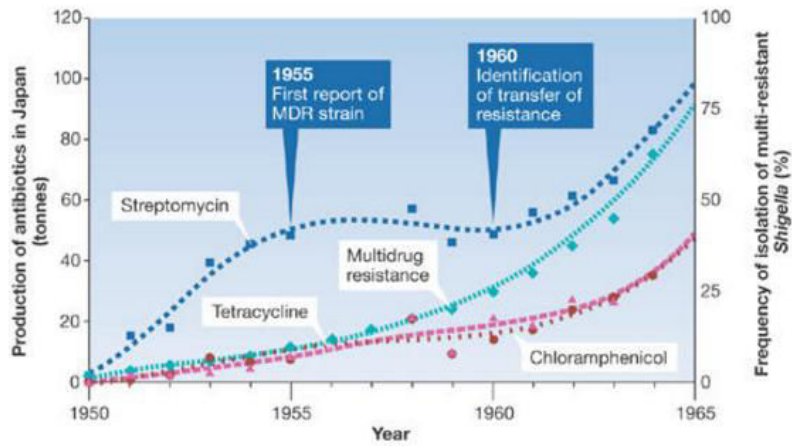


Figure 5 : Développement de shigelles multirésistantes au Japon en lien avec l'introduction de nouvelles molécules antibiotiques. D'après Davies, 2007

MDR = multirésistantes

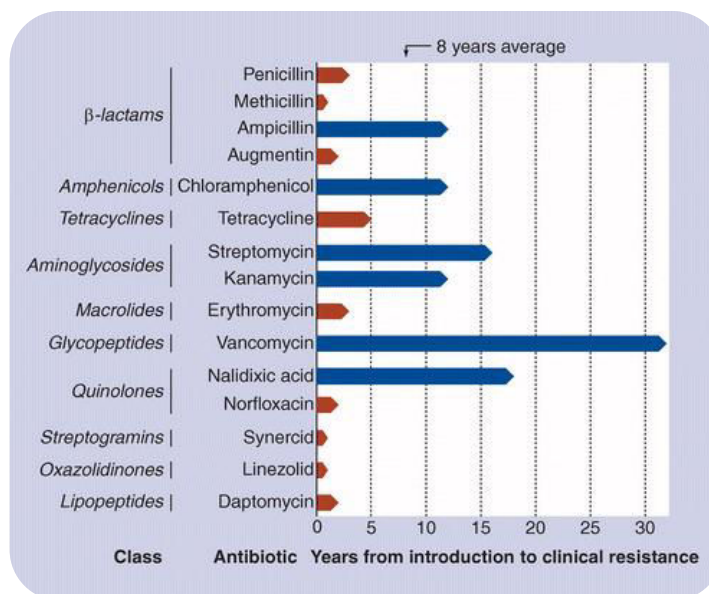


Figure 6 : Emergence de la résistance après introduction en thérapeutique. D'après Schmieder et Edwards, 2012

En rouge sont représentées les résistances ayant émergé rapidement. Les bleus représentent les résistances plus tardives. Le temps moyen d'apparition de la résistance en clinique est estimé à 8 ans.

la résistance d'autres bactéries par un échange de gène. Ils vont même plus loin et démontrent des transferts de résistance entre bactéries du genre *Shigella* et *Escherichia coli* (Akiba et al., 1960 ; Ochiai et al., 1959). Une découverte majeure vient d'être faite. Les bactéries sont capables de s'échanger des gènes de résistance.

Les mécanismes de mutation, sélection et acquisition de gène par transfert entre bactéries concourent tous à la rapidité avec laquelle les bactéries s'adaptent en réponse à une pression de sélection antibiotique. Des études rétrospectives ont estimé à 8 ans le temps moyen pour voir émerger une résistance après l'introduction d'un nouvel agent thérapeutique en milieu clinique (Figure 6) (Schmieder and Edwards, 2011).

Différents mécanismes de résistance ont été décrits (Figure 7, page suivante) :

- Des mécanismes d'**imperméabilité membranaire** qui limitent la pénétration des antibiotiques dans la bactérie. Ces mécanismes impliquent des porines, protéines permettant le passage des molécules hydrophyles. Les résistances reposent sur des modifications de la fonction des porines par mutation ou sur une diminution leur expression (Delcour, 2009).

- Des mécanismes d'**inactivation enzymatique** qui vont conduire à la modification chimique des antibiotiques et à leur neutralisation. Ce mécanisme est très répandu notamment dans le cadre de la résistance aux β -lactamines ou aux aminosides.

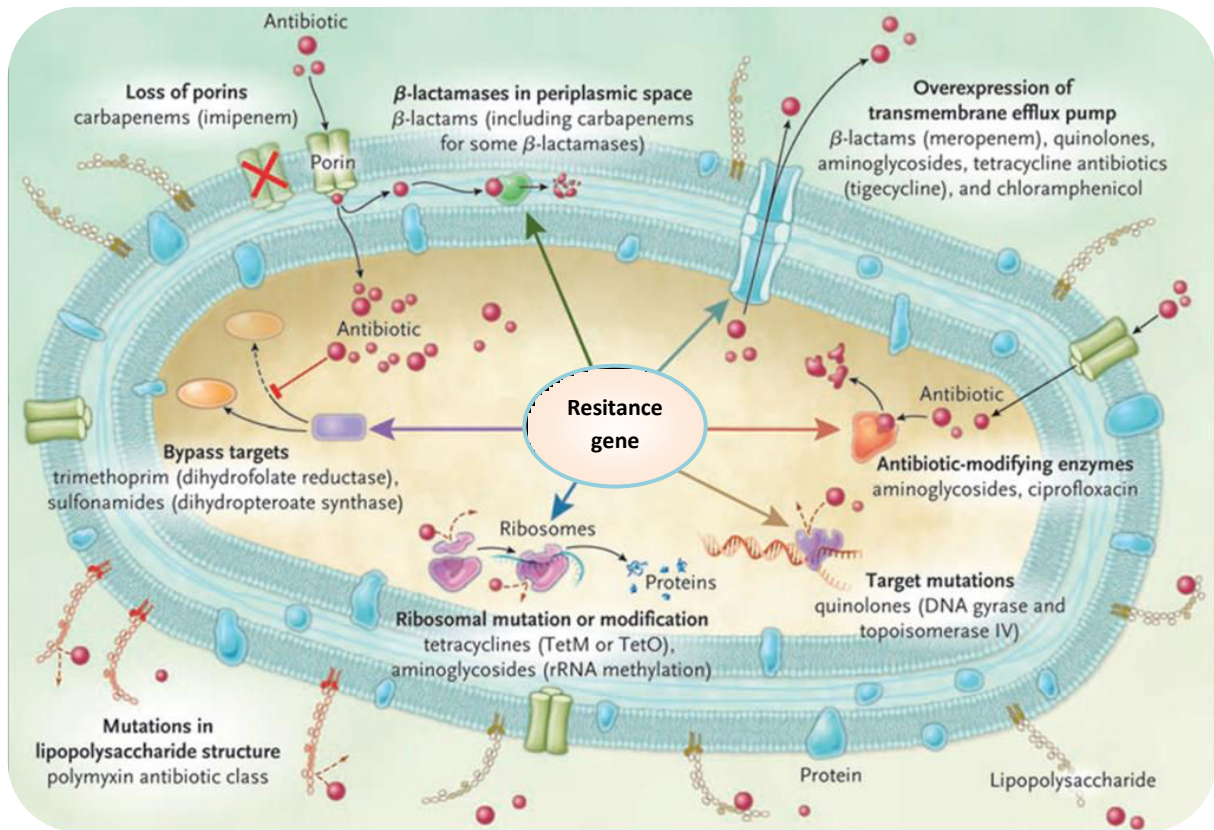


Figure 7 : Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques. Adapté de Peleg and Hooper, 2010

- Des mécanismes de **modification, protection ou substitution de la cible** qui empêche l'action de l'antibiotique sur sa cible. C'est par exemple le cas de la résistance des entérocoques aux glycopeptides. Dans ces bactéries, la résistance à la vancomycine est médiée par un opéron qui encode à la fois les gènes permettant l'hydrolyse de la cible de l'antibiotique et le remplacement de cette cible par un précurseur faiblement reconnu par la vancomycine (Courvalin, 2006).

- Des mécanismes d'**efflux actif** qui vont permettre d'expulser les antibiotiques hors de la cellule. La surexpression de systèmes d'efflux dits multidrogues (MDR), capables de transporter des familles d'antibiotiques chimiquement différentes, permet aux bactéries d'accroître leur spectre de résistance. Citons par exemple la surexpression des systèmes AcrAB-TolC chez *E. coli* et MexAB-OprM chez *P. aeruginosa* décrite chez des souches cliniques résistantes (Li et al., 1995 ; Nikaido, 1998). Ces deux systèmes confèrent une résistance croisée aux pénicillines, aux aminosides, aux tétracyclines, aux quinolones ou encore au triméthoprim.

L'origine des gènes de résistance serait probablement environnementale. De nombreux antibiotiques sont d'origine naturelle, produits par des micro-organismes du sol ayant eux-mêmes besoin de systèmes de protection pour leur résister. Des études méta-génomiques dans des environnements épargnés de toute activité humaine ont par ailleurs montré la présence naturelle de gènes impliqués dans des mécanismes d'efflux ou d'inactivation d'antibiotiques (Schmieder and Edwards, 2011). L'environnement constituerait donc un immense réservoir de gènes directement ou indirectement impliqué dans la résistance aux antibiotiques (Allen et al., 2010 ; D'Costa et al., 2006). Ce réservoir, appelé résistome, serait particulièrement ancien. Une étude de 2004 estime par exemple que l'origine des β -lactamases remonterait à 2 milliards d'années (Hall and Barlow, 2004).

Les enzymes ou protéines impliquées dans les mécanismes de résistance dériveraient probablement de protéines déjà présentes dans les bactéries. Chez *Providencia stuartii*, il a par exemple été montré qu'une enzyme impliquée dans des mécanismes de modification du peptidoglycane, la 2'-N-acétyltransférase, était aussi capable d'inactiver la gentamicine, un aminoside (Martinez, 2009). De même, les β -lactamases dériveraient en fait des protéines qu'elles ciblent (Kelly et al., 1986). Les gènes *qnr*, impliqués dans la résistance aux quinolones seraient également des homologues de protéines retrouvées dans des bactéries environnementales, les « pentapeptide-repeat proteins ». Les bactéries possédaient probablement déjà les outils nécessaires à la résistance mais utilisés à d'autres fins et c'est sans doute en partie pour cette raison que l'émergence des résistances fût si rapide.

Etude bibliographique

Dans la bataille opposant l'Homme aux bactéries, la plasticité des génomes bactériens a mis à mal le « miracle » antibiotique. A une heure où la découverte de molécules antibactériennes se fait rare, il est indispensable de trouver de nouvelles alternatives pour lutter efficacement contre le développement de la résistance. Et si une des clés du problème résidait dans l'analyse des armes ennemies ? La compréhension des mécanismes concourant à l'acquisition et à la dissémination de la résistance pourrait en effet permettre de mieux appréhender les réponses adaptatives des bactéries et de développer des outils thérapeutiques appropriés.

Le travail présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans cette optique. Il vise à mieux caractériser la dynamique d'évolution de populations bactériennes ayant acquis une structure génétique impliquée dans la résistance : les intégrons.

Afin de mieux appréhender ce sujet, l'étude bibliographique présentée ici permettra :

- (i) de faire un état des lieux des mécanismes d'acquisition de la résistance.
- (ii) de présenter les déterminants évolutifs qui concourent à son maintien et à sa propagation ainsi que les outils à la disposition du biologiste pour étudier ses déterminants.
- (iii) de présenter le modèle d'étude : les intégrons.

Chapitre 1 - Mécanismes d'acquisition des gènes de résistance.

Il convient de distinguer deux types de résistance :

- La résistance naturelle existant chez toutes les souches bactériennes d'une même espèce. Cette résistance est strictement chromosomique et transmise à la descendance. On parle alors de transfert vertical de gènes. Ces gènes ne sont néanmoins pas directement mobilisables et sont donc très peu impliqués dans la dissémination de la résistance à court terme. Ils constituent néanmoins à l'échelle évolutive un réservoir de gènes potentiellement mobilisables.
- La résistance acquise correspond à l'acquisition d'une résistance par une souche bactérienne initialement sensible à un antibiotique donné. Cette acquisition de résistance est permise par l'immense plasticité des génomes bactériens. Deux phénomènes sont plus largement impliqués dans cette plasticité : les mutations et les transferts horizontaux de gènes. Ces deux phénomènes sont les acteurs majeurs de l'émergence et de la dissémination de la résistance

I. Les mutations.

A. Définition.

Une mutation est définie comme une altération de l'information génétique dans le génome d'un organisme. Une mutation peut être ponctuelle et n'affecter qu'un seul nucléotide (substitution d'un nucléotide par un autre, délétion ou insertion ponctuelle) ou s'étendre à plusieurs nucléotides (délétion ou insertion de plusieurs nucléotides) (Darmon and Leach, 2014). L'apparition de mutations est un phénomène naturel chez les bactéries. Elles sont générées *de novo* et de façon aléatoire lors de la réplication du génome bactérien (Friedberg et al., 2006).

Selon l'endroit du génome affecté, une mutation peut avoir ou non un effet à l'échelle phénotypique. Une mutation peut par exemple altérer la structure et/ou la fonction d'une protéine lorsqu'elle a lieu au sein de la séquence codante d'un gène (Liang et al., 2013). Les événements de délétion et d'insertion sont souvent responsables de mutations dites « frameshift » qui résultent en un décalage du cadre de lecture lors de la traduction et génèrent des protéines aberrantes ayant perdu leurs propriétés originales (Li et al., 2015). Si une mutation affecte une région promotrice, elle peut alors modifier le profil d'expression du gène contrôlé par cette région (Caroff et al., 1999). Dans certains cas, lorsqu'elles affectent une voie métabolique majeure, certaines mutations peuvent être délétères voire létales (Chen and Shakhnovich, 2009).

En 1991, John Drake fait une observation importante. Chez divers micro-organismes, la fréquence d'apparition de mutations par paire de bases est inversement proportionnelle à la taille des génomes (Drake, 1991). Cette corrélation inverse se traduit par un taux de mutations par génome constant de l'ordre de 0,003

mutations par génération bactérienne. Initialement postulée à partir de 7 micro-organismes dont *E. coli*, cette valeur constante a par la suite été confirmée chez un plus grand nombre d'espèces (Lynch, 2010 ; Sung et al., 2012). Il y aurait donc une limite à la dérive génétique. Les déterminants de cette barrière demeurent encore un mystère.

Si l'on associe ce taux de mutations par génome et par génération à la taille des populations bactériennes et au faible temps de génération de ces dernières, on obtient des temps d'apparition de mutants relativement courts et donc un potentiel évolutif important.

B. Mutations et antibiorésistance.

Les mutations contribuent grandement à l'antibiorésistance. La résistance de certains pathogènes est d'ailleurs parfois même exclusivement liée à des mutations génomiques. C'est notamment le cas chez *Mycobacterium tuberculosis* où la résistance à tous les agents thérapeutiques utilisés est acquise par mutation (Gillespie, 2002).

Les mutations peuvent contribuer de diverses façons à l'antibiorésistance.

1. Mutations dans le gène de la cible de l'antibiotique.

La grande majorité des résistances basées sur un mécanisme de modification ou de protection de la cible repose sur l'apparence de mutations chromosomiques dans des gènes précis.

La résistance aux quinolones est par exemple conférée par des mutations dans les gènes *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE* encodant respectivement les sous-unités protéiques de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV (Hawkey, 2003). De même la résistance à la rifampicine est permise par des mutations dans le gène *rpoS* codant

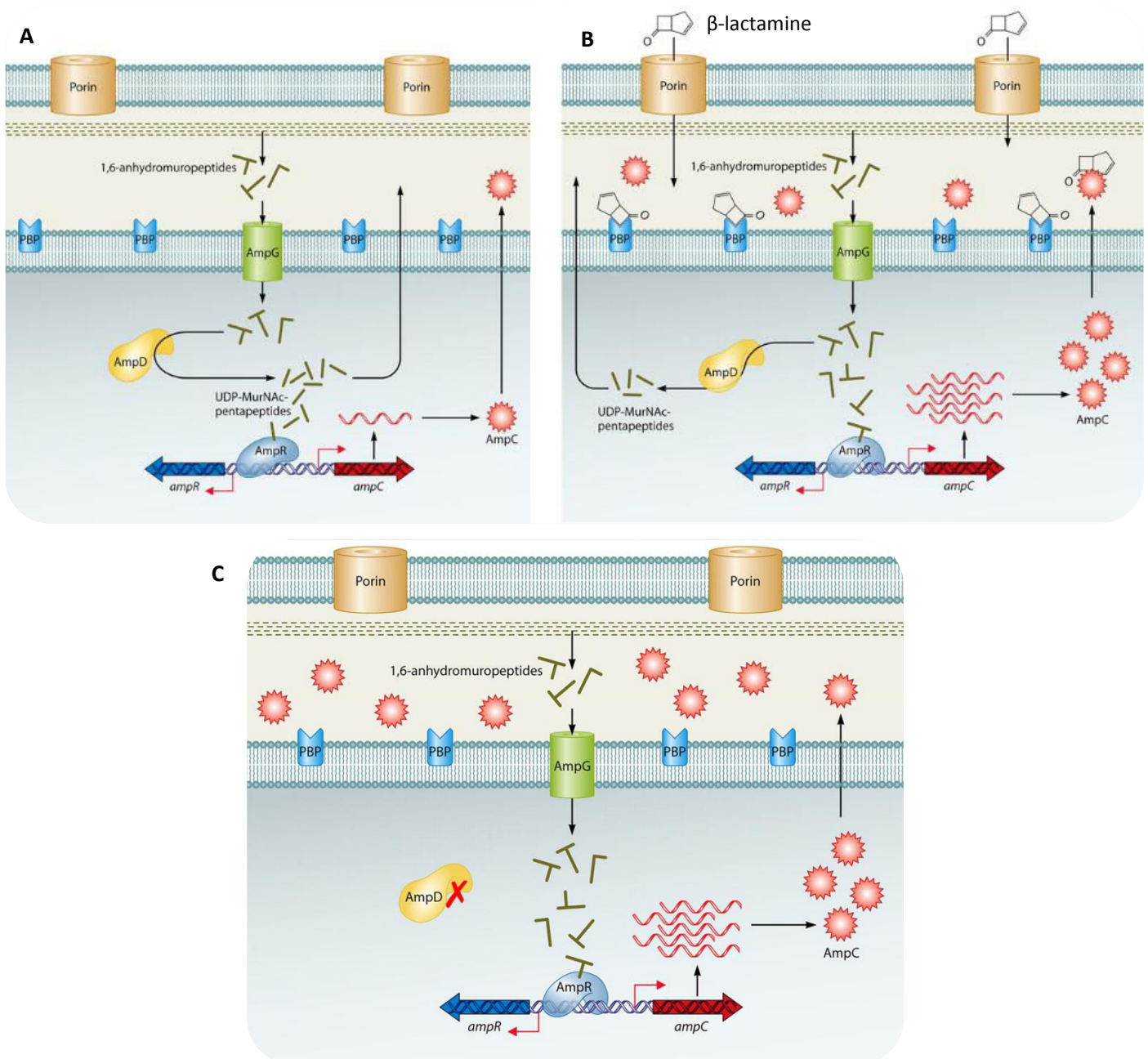


Figure 8 : Régulation de l'expression du gène de résistance *ampC*, encodant une β -lactamase. D'après Lister et al., 2009

A- La transcription du gène *ampC* est constitutivement réprimée par l'action indirecte de AmpD.

Les 1,6 anhydromuropeptides générés dans le cadre du recyclage de la paroi bactérienne, après avoir été internalisés par AmpG, sont dégradés par AmpD. Dégradés, ils ne peuvent pas induire l'expression du gène *ampC*. La bactérie présente un faible niveau de résistance aux β -lactamines.

B- L'action des β -lactamines active la transcription du gène *ampC*.

Les β -lactamines sont des inhibiteurs de la synthèse des parois bactériennes. Leur action va se traduire par une accumulation de 1,6 anhydromuropeptides dans la cellule. AmpD est incapable de tous les dégrader. Les 1,6 anhydromuropeptides, par action sur le répresseur AmpR, lèvent l'inhibition exercée sur le gène *ampC*. La bactérie produit des β -lactamases pour lutter contre l'antibiotique.

C- Une mutation de la protéine AmpD entraîne la résistance constitutive aux β -lactamines.

Une mutation de la protéine AmpD empêchant la dégradation des 1,6 anhydromuropeptides conduit à leur accumulation dans la cellule. Le gène *ampC* est constitutivement exprimé. La bactérie est constitutivement résistante aux β -lactamines.

la sous unité β de l'ARN polymérase III (Campbell et al., 2001). Autre exemple, des mutations chromosomiques dans les gènes *folP* et *folA* permettent d'inhiber respectivement l'effet des sulfonamides et du triméthoprim (van Hoek et al., 2011).

2. Mutations des régulateurs de gènes de résistance.

Au-delà d'agir directement sur la cible des antibiotiques, les mutations peuvent agir plus indirectement en affectant des régulateurs de gènes de résistance.

On peut citer par exemple le cas de la résistance aux céphalosporines médiée par le gène chromosomique *ampC*, dont la transcription est régulée par la protéine AmpR et inductible en présence de β -lactamines (Figure 8). Des mutations du gène *ampR* peuvent conduire à une expression constitutive de *ampC*, même en l'absence d'inducteurs (Jacoby, 2009 ; Lister et al., 2009).

Autre exemple, des mutations au sein de l'opéron *marRAB*, encodant le régulateur transcriptionnel MarA, sont susceptibles de modifier le profil d'expression du régulateur stimulant ainsi la production de pompes d'efflux tout en diminuant l'expression de la porine OmpF (Figure 9, page suivante) (Randall and Woodward, 2002). Le « phénotype MarA » se traduit par un faible phénotype de résistance aux quinolones, à la rifampicine, au chloramphénicol, à la tétracycline et à certaines β -lactamines.

3. Rôle des mutations dans l'évolution de la résistance.

Outre leur implication dans l'apparition de la résistance, les mutations ont également joué un rôle majeur dans l'évolution de cette dernière. Un des exemples les plus parlants est celui des β -lactamases dont le spectre d'action a été élargi grâce à des mutations. Les BLSE de type TEM et SHV dérivent de deux précurseurs : TEM-1/TEM-2 et SHV-1 dont le spectre d'action était initialement

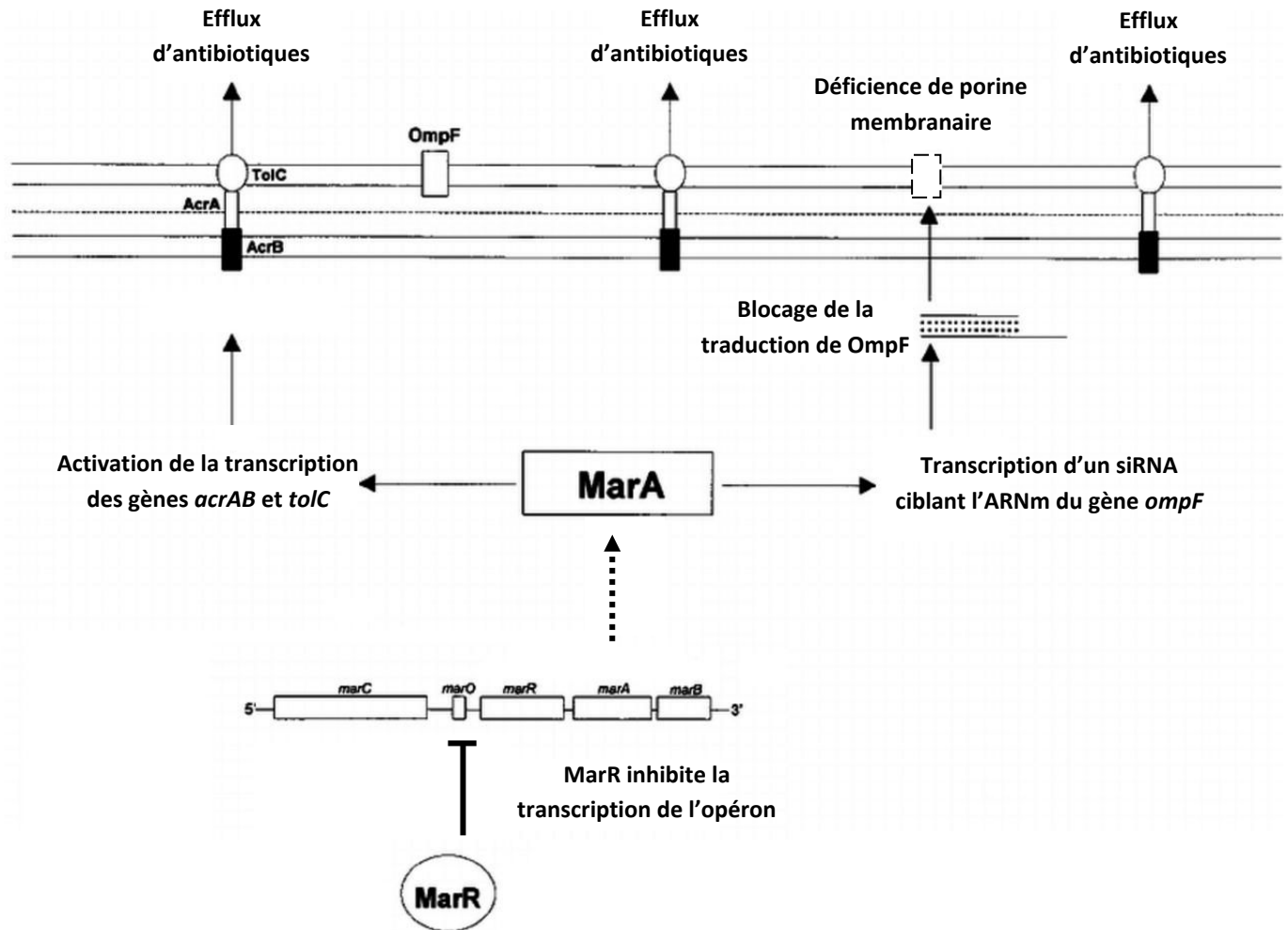


Figure 9 : L'opéron *marRAB* et son implication dans la résistance. D'après Price et al., 2000

L'opéron *marRAB* encode la protéine MarA, un régulateur global de l'expression de plus d'une soixantaine de gènes chez *E. coli*. Parmi ces gènes, plusieurs sont susceptibles de conduire à un phénotype de résistance. MarA est notamment capable d'activer la transcription des gènes *acrAB* et *tolC* encodant les effecteurs de la pompe d'efflux AcrAB-TolC. En plus de stimuler l'efflux des antibiotiques, MarA est capable de diminuer la perméabilité membranaire en bloquant la traduction des porines OmpF.

La transcription de l'opéron est néanmoins constitutivement réprimée par la protéine MarR.

Des mutations dans le gène *marR* ou dans l'opérateur *marO* conduisent à une levée de l'inhibition de l'opéron. Le gène *marA* est constitutivement exprimé. Les bactéries présentent constitutivement peu de porines et une grande quantité de pompes d'efflux. Elles deviennent moins sensibles à de nombreux d'antibiotiques.

restreint aux pénicillines de première génération. De nombreux variants de ces enzymes sont néanmoins apparus au cours de l'évolution par accumulation de mutations (Heritage et al., 1999; Petrosino et al., 1998). Aujourd'hui plus de 150 variants de TEM et 60 variants de SHV existent dont des variants capables d'hydrolyser des β -lactames à large spectre dont le céfotaxime et la ceftazidime largement utilisés en clinique (Woodford and Ellington, 2007).

A retenir :

Générées *de novo* lors de la réplication de l'ADN, les mutations sont une source d'innovation génétique. Couplées au temps de génération de certaines bactéries et à la taille des populations bactériennes, elles confèrent à ces dernières un potentiel adaptatif important.

Certaines mutations peuvent affecter les gènes encodant les protéines cibles des antibiotiques et conférer une résistance. D'autres mutations vont impacter des régulateurs de gène de résistance et modifier le phénotype des bactéries. Au-delà de faire apparaître la résistance, les mutations participent activement à l'évolution de cette dernière en affinant les mécanismes et élargissant les spectres de résistance.

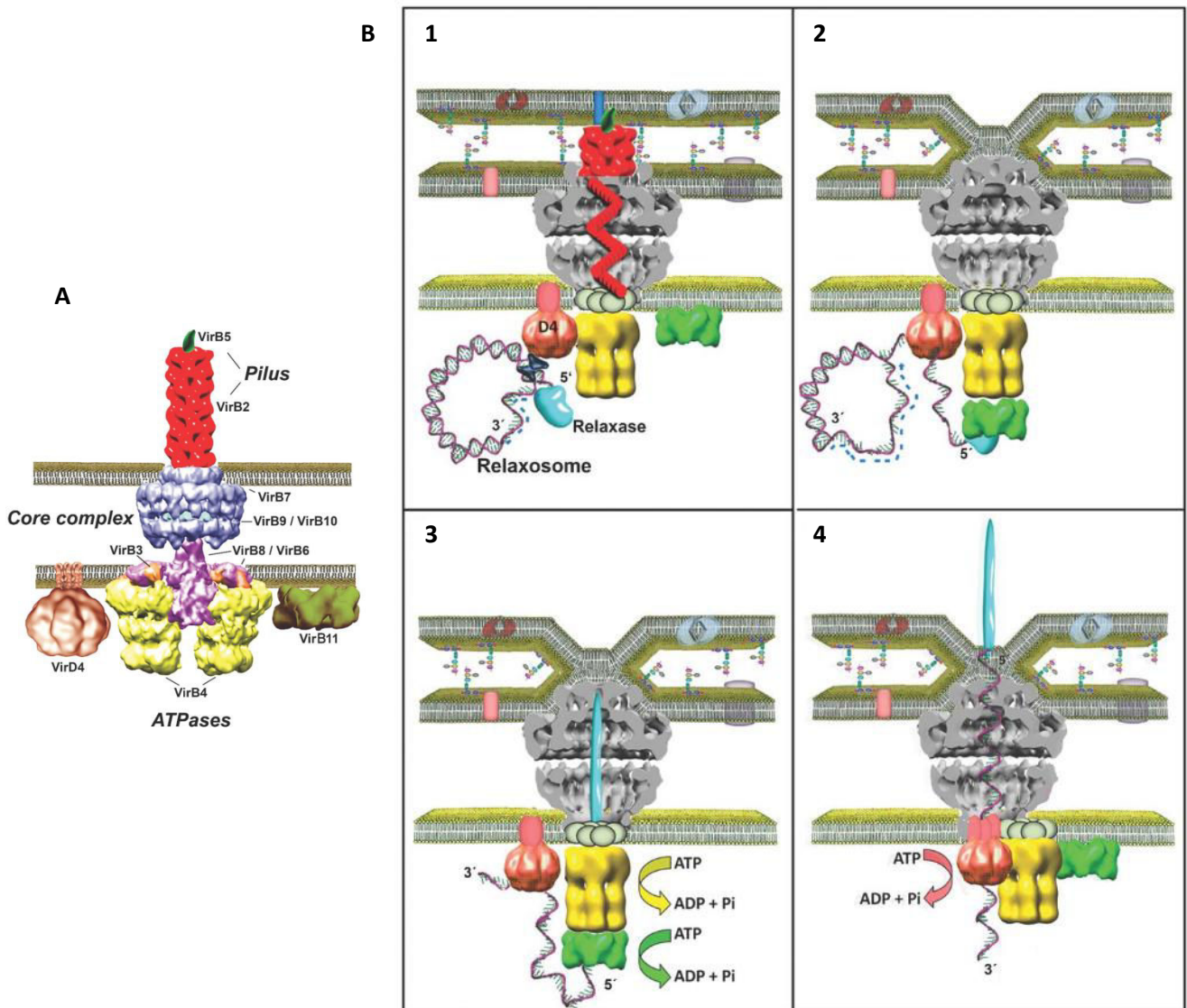


Figure 10 : La conjugaison bactérienne et le système de sécrétion de type IV. D'après Cabezón et al., 2014

A- Structure du système de sécrétion de type IV (T4SS).

Le T4SS est constitué d'un « core complex » situé dans l'espace périplasmique entre les 2 membranes des bactéries à Gram négatif. Le pilus, composé de piline (VirB2) et d'adhésine (VirB5), est exposé coté extracellulaire. Il servira à contacter une autre cellule. Coté intra-cellulaire, le T4SS est composé de 3 ATPases qui serviront au transfert actif de molécules au travers du « core complex » ainsi qu'à la synthèse du pilus.

B- Déroulement de la conjugaison après contact entre deux cellules.

- 1- Rétractation du pilus et recrutement du relaxosome par le T4SS. La relaxosome clive le plasmide ou l'ICE au niveau de la séquence *oriT*. Le transfert de l'élément génétique mobile se fera sous forme simple brin.
- 2- Les membranes des deux bactéries fusionnent. Le relaxosome est adressé à l'entrée du T4SS.
- 3- Pénétration de la relaxase dans le T4SS par transport actif
- 4- Traversée active du T4SS par l'élément génétique mobile sous forme simple brin

II. Les transferts horizontaux de gènes.

Les transferts horizontaux de gènes regroupent tous les mécanismes d'échanges d'ADN entre bactéries. Grâce à ces mécanismes, les bactéries vont par exemple être capables d'échanger des gènes de résistances. Le transfert horizontal de gènes est d'ailleurs le principal acteur de la dissémination de l'antibiorésistance (von Wintersdorff et al., 2016).

A. Les mécanismes des transferts horizontaux de gènes.

1. La conjugaison.

La conjugaison est un processus d'échange de gènes impliquant un contact entre deux bactéries. Une cellule donneuse va transférer de l'ADN à une cellule receveuse. Ce processus met en jeu deux groupes de gènes : des gènes assurant la mobilisation de l'élément génétique mobile et des gènes assurant la formation d'un pont entre les deux bactéries, le pilus (Schröder and Lanka, 2005). Ces gènes sont portés par des éléments génétiques mobiles capables de promouvoir leur propre transfert par conjugaison : les plasmides conjugatifs (Smillie et al., 2010) et les éléments intégratifs conjugatifs (ICE) (Wozniak and Waldor, 2010).

Chez les bactéries à Gram négatif, la conjugaison met en jeu le système de sécrétion de type IV (T4SS) (Figure 10). Ce complexe protéique assure à la fois la prise en charge de l'élément génétique mobile et la formation du pilus. L'élément génétique mobile (EGM) est échangé sous forme simple brin. La cellule donneuse conserve une copie de l'élément transféré.

La conjugaison est le mode de transfert considéré comme le plus impliqué dans la dissémination de l'antibiorésistance (von Wintersdorff et al., 2016).

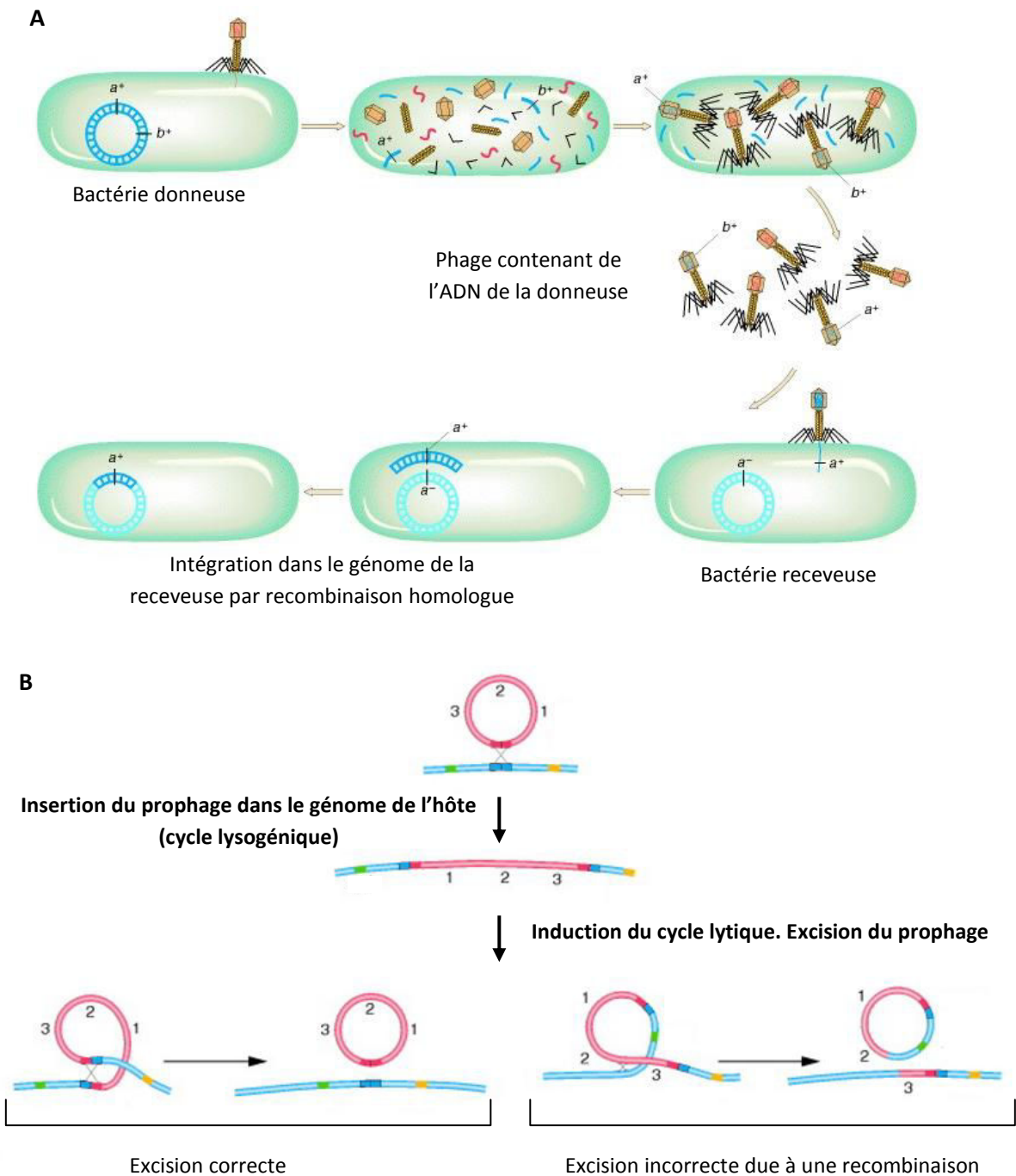


Figure 11 : Transductions généralisée et spécialisée. D'après <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21760>

A- Transduction généralisée.

La transduction généralisée a lieu lors d'un cycle lytique. Un fragment d'ADN lysé de l'hôte est accidentellement encapsidé dans un phage. Il est alors propagé par le phage et inséré dans une cellule receveuse où par recombinaison homologue il sera inséré dans le génome.

B- Transduction spécialisée.

La transduction spécialisée a lieu lors des cycles lysogéniques. Dans l'exemple présenté ici, l'ADN du phage s'insère entre 2 gènes, un vert et un jaune. Après induction du cycle lytique, le prophage s'excise. Des événements de recombinaison peuvent conduire à la capture par le prophage d'une partie de l'environnement génétique. Dans l'exemple ci dessus, le gène vert est capturé et pourra être transmis à une bactérie receveuse.

2. La transduction.

La transduction est un processus d'échange de gènes mettant en jeu des bactériophages à ADN ou ARN, des virus bactériens. Ils sont composés d'une capsid renfermant un ADN ou ARN viral et d'une queue servant à la reconnaissance de la cible et à l'injection de l'acide nucléique viral dans l'hôte. La transduction correspond à l'encapsulation dans le phage d'une partie de l'ADN de l'hôte. Par l'intermédiaire du phage, cet ADN peut alors être transmis à une autre bactérie. La transduction est dite généralisée lorsqu'un fragment d'ADN aléatoire est inséré dans une capsid lors d'un cycle lytique ou bien spécialisée lorsqu'un fragment d'ADN spécifique est embarqué avec l'ADN du phage lors de son excision du chromosome dans le cadre d'un phage à cycle lysogénique (Figure 11).

La mobilisation et le transfert de gènes de résistance par transduction ont déjà été démontrés chez *Streptococcus pyogenes* (Hyder and Streitfeld, 1978), les entérocoques (Mazaheri Nezhad Fard et al., 2011), *E. coli* (Billard-Pomares et al., 2014), *Salmonella* (Schmieger and Schicklmaier, 1999) ou encore chez *Staphylococcus aureus* (Varga et al., 2012). En outre plusieurs études méta-génomiques ont montré que les bactériophages constituent un important réservoir de gènes de résistance. Ainsi, des bactériophages porteurs de gènes de résistances aux β -lactamines (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}) et quinolones (gènes *qnr*) ont notamment été retrouvés dans des eaux de rivières et effluents urbains en Espagne (Colomer-Lluch et al., 2014, 2011).

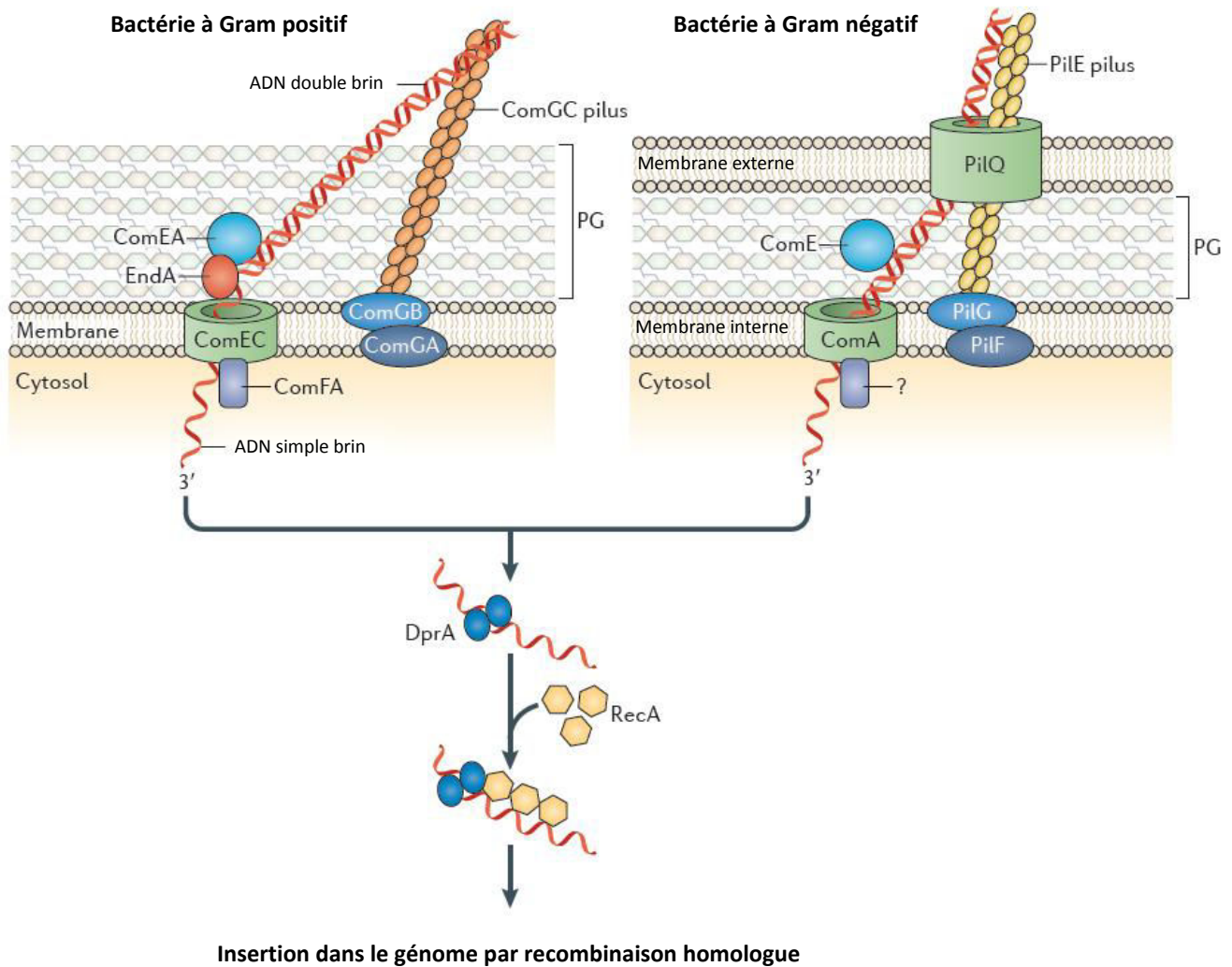


Figure 12 : Les acteurs de la transformation chez les bactéries à Gram positif et négatif. D'après Johnston et al., 2014

Les ADN extracellulaires sont capturés par un pilus de transformation et internalisés dans la cellule par l'intermédiaire de porines. L'entrée de l'ADN se fait sous forme simple brin. Une fois dans la cellule, les ADN pourront être intégrés au génome par recombinaison homologue. PG = peptidoglycane.

3. La transformation.

La transformation correspond à l'incorporation dans le génome bactérien d'un ADN libre circulant.

La capture d'ADN libre circulant nécessite néanmoins que la bactérie receveuse soit dans un état dit de compétence. Certaines bactéries sont naturellement compétentes. Une revue publiée en 2014 fait état de 82 espèces bactériennes naturellement compétentes (Johnston et al., 2014). Parmi les bactéries naturellement compétentes certaines le sont constitutivement. C'est notamment le cas des bactéries du genre *Neisseria*. Pour les autres, l'activation de la compétence requiert des conditions particulières : présence de certains peptides, d'auto-inducteurs ou de conditions de stress précises (Johnston et al., 2014).

Les mécanismes de capture de gènes par transformation sont bien documentés et diffèrent entre les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif (Figure 12). Dans tous les cas, l'ADN libre est piégé par un pilus de transformation, adressé à un pore transmembranaire où son passage vers le cytoplasme bactérien se fait sous forme simple brin. Il pourra ensuite être intégré au génome de la bactérie par recombinaison homologue *via* la recombinase RecA.

Plusieurs travaux ont souligné l'implication de la transformation bactérienne dans la dissémination des résistances. La transformation fournirait à la bactérie des allèles mutants qui par recombinaison homologue viendraient modifier le gène codant la protéine cible de l'antibiotique. De tels mécanismes ont été postulés plusieurs fois pour expliquer l'émergence de la résistance aux quinolones chez des streptocoques (Ferrándiz et al., 2000 ; Janoir et al., 1999) ou à la pénicilline chez *Neisseria* (Spratt, 1994).

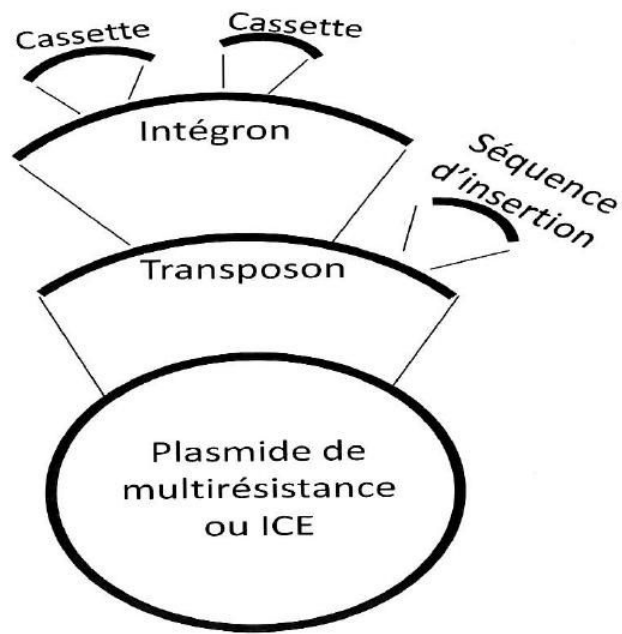


Figure 13 : Effet « poupées russes » des éléments génétiques mobiles (EGM).

Les EGM s'imbriquent les uns dans les autres pour former des structures complexes pouvant rassembler plusieurs gènes de résistances.

B. Les éléments génétiques mobiles (EGM) impliqués dans la dissémination de l'antibiorésistance.

1. Les plasmides.

Les plasmides sont des ADN extra-chromosomiques, généralement circulaires, capables de répllication autonome. Leur répllication met en jeu la machinerie enzymatique de la bactérie et une origine de répllication *ori* portée par le plasmide. L'origine de répllication *ori* détermine le nombre de copies du plasmide ainsi que sa classe d'incompatibilité (groupe Inc). Un groupe d'incompatibilité est défini comme un ensemble de plasmides incapables de coexister dans la même cellule (Thomas, 2014). Chaque groupe d'incompatibilité a un spectre d'hôte donné. Certains plasmides s'expriment de façon stable dans un grand nombre de bactéries Gram positives ou Gram négatives (IncA/C, IncP, IncQ) tandis que d'autres ont un spectre d'hôte beaucoup plus restreint (IncF, IncI1).

La conjugaison est le mode de transfert privilégié des plasmides. On distingue néanmoins les plasmides conjugatifs, capables de promouvoir leur propre transfert par conjugaison, des plasmides mobilisables qui portent seulement une *oriT*. Ces derniers sont transférables mais nécessitent la présence d'un autre élément conjugatif dans la cellule disposant de la machinerie nécessaire à l'échange par conjugaison.

Les plasmides sont généralement considérés comme les principaux vecteurs de la résistance et hébergent souvent d'autres EGM non conjugatifs comme les séquences d'insertion, les transposons ou les intégrons. Ceci témoigne d'un effet « poupées russes » des EGM qui se servent les uns des autres pour mieux disséminer (Figure 13).

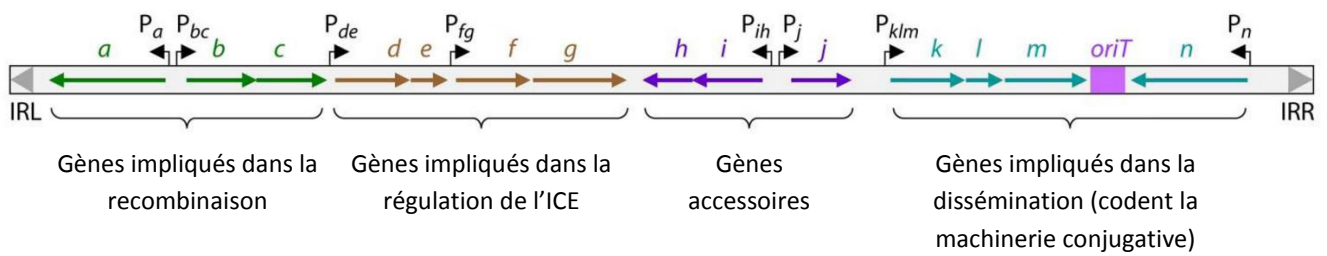


Figure 14 : Schéma de l'organisation d'un élément intégratif conjugatif (ICE). D'après Darmon et Leach, 2014

Un ICE comprend deux séquences inversées répétées terminales (IRL et IRR) entre lesquelles sont compris différents sets de gènes impliqués dans la recombinaison (pour l'insertion dans le génome bactérien), la dissémination par conjugaison, la régulation ainsi que d'autres gènes accessoires. Une *oriT* indispensable à la mobilisation de l'élément lors de la conjugaison est présente dans le module de dissémination.

Table 2 : Exemples d'éléments intégratifs conjugatifs (ICE) véhiculant des gènes de résistance.

D'après Wozniak et Waldor, 2010

ICE	Organisme hôte	Taille (kb)	Phénotype de résistance
SXT	<i>Vibrio cholerae</i>	99,5	Cm ^R , SXT ^R , Spt ^R
R391	<i>Providencia rettgeri</i>	89	Km ^R
ICEHin1056	<i>Haemophilus influenzae</i>	49,4	Tet ^R , Cm ^R , Amp ^R
Tn916	<i>Enterococcus faecalis</i>	18	Tet ^R
CTnDOT	<i>Bacteroides</i> spp.	65	Tet ^R , Ery ^R

Cm = Chloramphénicol, SXT = Sulfaméthoxazole et Triméthoprime (Bactrim), Spt = Streptomycine, Km = Kanamycine, Tet = Tétracycline, Amp = Ampicilline et Ery = Erythromycine.

2. Les éléments intégratifs conjugatifs (ICE).

Les éléments intégratifs conjugatifs (ICE) sont des EGM chromosomiques capables de s'exciser du chromosome et de promouvoir leur transfert par conjugaison d'une bactérie à une autre (Burrus and Waldor, 2004 ; Darmon and Leach, 2014). Comme les plasmides conjugatifs, les ICE codent tous les gènes nécessaires à leur transfert par conjugaison (Figure 14). A la différence des plasmides, les ICE sont incapables de se répliquer de façon autonome donc incapables de se maintenir à long terme sous forme extra-chromosomique.

Plusieurs ICE sont des vecteurs de gènes de résistance aux antibiotiques (Table 2). Le plus caractérisé reste néanmoins l'élément STX activement impliqué dans la dissémination de phénotype de multirésistance au chloramphénicol, au triméthoprim, aux sulfonamides et à la streptomycine (Whittle et al., 2002 ; Wozniak and Waldor, 2010).

3. Les séquences d'insertions (IS).

Les séquences d'insertion (IS) sont de petits EGM, généralement flanqués de séquences inversées répétées (IR), codant uniquement les transposases nécessaires à leur transposition (Figure 15, page suivante). Selon la nature de ces transposases, différentes familles d'IS ont été définies (Mahillon and Chandler, 1998). Quelle que soit leur famille, les IS sont capables de s'insérer à de nombreux endroits dans les génomes bactériens.

L'implication des IS dans la dissémination de la résistance a plusieurs fois été démontrée. Certaines IS sont capables de capturer des gènes de résistance voisins lors de leur transposition. C'est le cas de l'IS1294b pour le gène *bla*_{CMY-2} (Yassine et al., 2015) ou encore de l'IS*Ap11* pour le gène de résistance à la colistine *mcr1*

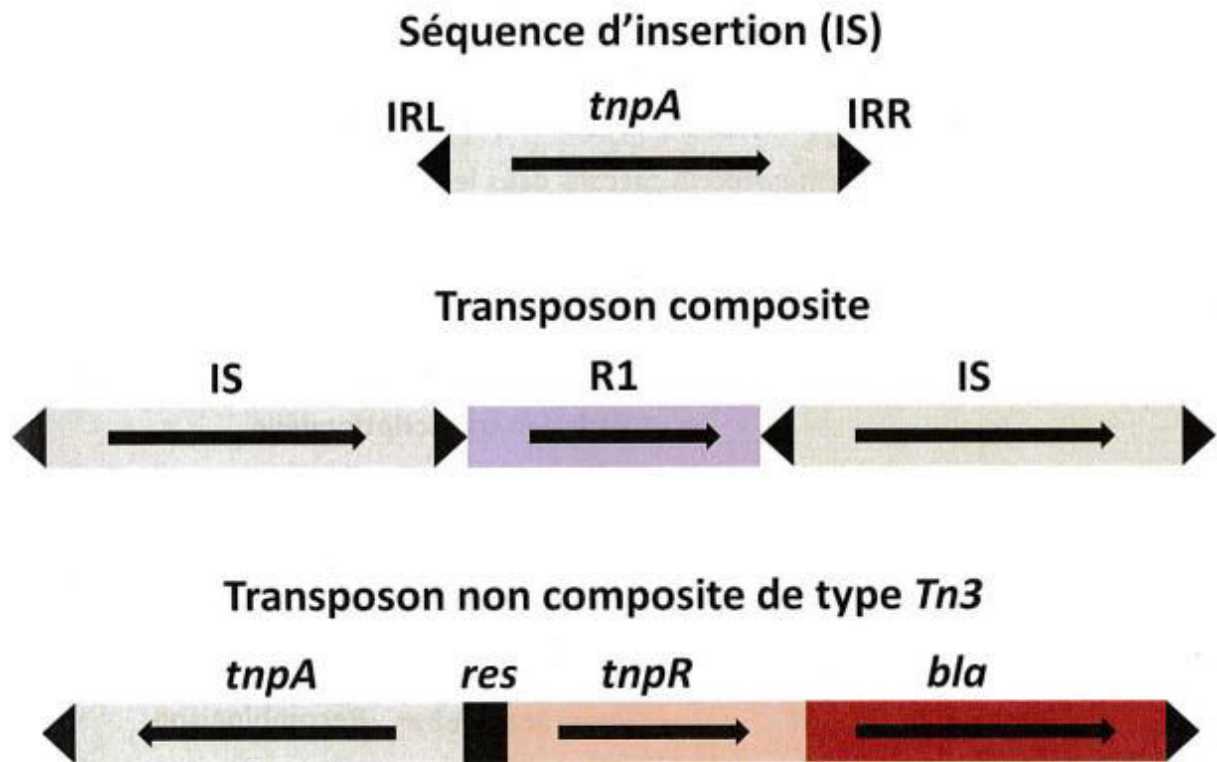


Figure 15 : Représentation schématique d'une séquence d'insertion, d'un transposon composite et d'un transposon non composite de type Tn3.

Les transposons, comme les IS, sont des EGM flanqués de séquences inversés répétées (IRL et IRR) capables de transposer dans les génomes bactériens. Les IS encodent en général uniquement la transposase *tnpA* nécessaire à leur activité de transposition. A l'inverse, les transposons portent, en plus la transposase, des gènes « passagers » qui vont voyager avec le transposon.

On distingue néanmoins deux grandes sous-familles de transposons :

- les transposons composites constitués de deux copies d'une même IS, en orientation directe ou inverse, encadrant un segment d'ADN. Le plus souvent, une seule des deux IS encode une transposase fonctionnelle. L'autre IS code alors pour un régulateur de la transcription.
- les transposons non composites, encadrés de deux IR qui encodent une transposase (*tnpA*) et une resolvase (*tnpR*) en plus de « gènes passagers ». Ici est présenté, l'exemple du transposon Tn3 portant un gène de résistance aux β -lactamines.

(Petrillo et al., 2016). Les ISCR, systématiquement retrouvées à proximité de gènes de résistance seraient également très largement impliquées dans la dissémination de la résistance (Toleman et al., 2006; Toleman and Walsh, 2010) .

En outre certains IS peuvent fournir un promoteur fonctionnel à des gènes de résistance en s'insérant à leur proximité. Chez *Acinetobacter baumannii*, plusieurs IS de la famille des IS6 fournissent des promoteurs au gène *bla_{OXA-58}* et sont responsables de phénotypes de résistance aux carbapénèmes (Al-Hassan et al., 2015). Autre exemple, l'*ISEcp1*, fréquemment retrouvée en amont de gènes *bla_{CTX-M}*, est capable de favoriser l'expression de ces gènes en leur fournissant un promoteur et de les mobiliser (Poirel et al., 2003).

4. Les transposons.

Les transposons, comme les IS, sont des EGM flanqués de séquences inversés répétées (IR) capables de transposition dans les génomes bactériens (Figure 15). A la différence des IS, les transposons ne codent pas uniquement la machinerie nécessaire à la transposition mais aussi tout un ensemble de gènes qui « voyagent » avec le transposon.

Lorsque les « gènes passagers » sont des gènes de résistance, ces EGM vont pouvoir participer activement à leur dissémination. Parmi les transposons impliqués dans la résistance, on retiendra notamment les transposons Tn5 (résistance à la streptomycine et à la kanamycine (Bennett, 2008)), Tn9 (résistance au chloramphénicol (Partridge, 2011)), Tn10 (résistance à la tétracycline (Lawley et al., 2000)) et Tn3 (résistance aux β -lactamines (Chen and Clowes, 1987 ; Partridge and Hall, 2005)). En milieu clinique le transposon Tn1546, membre de la famille des Tn3, a également conduit à l'émergence d'entérocoques et de staphylocoques

résistants à la vancomycine (Arthur et al., 1993 ; Périchon and Courvalin, 2009). Les transposons de type Tn7 et Tn3 sont également très souvent porteurs d'intégrons.

5. Les intégrons.

Les intégrons sont des systèmes de capture et d'expression de gènes de résistance. Ne codant pas pour des fonctions de transposition, les intégrons sont souvent associés à des plasmides et/ou transposons. Ils constituent l'une des sources principales de la dissémination de la résistance aussi bien dans l'environnement qu'en milieu clinique chez l'homme ou l'animal. Leur description fera l'objet d'un chapitre entier.

A retenir :

Les transferts horizontaux regroupent tous les mécanismes d'échanges de gènes entre bactéries. Ces échanges mettent en jeu des éléments génétiques mobiles aux mécanismes de déplacement et de mobilisation divers et variés.

Lorsque ces éléments génétiques portent des gènes de résistance, ils vont être capables de véhiculer la résistance d'une bactérie à l'autre. Les mécanismes de transfert horizontaux sont d'ailleurs souvent considérés comme les principaux responsables de la dissémination rapide de la résistance.

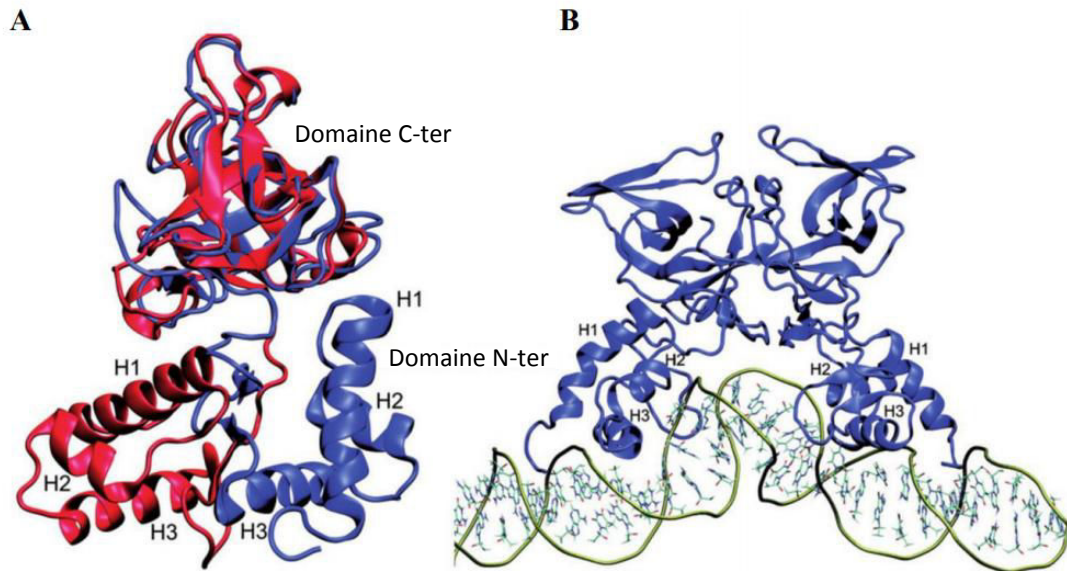


Figure 16 : Structure de la protéine LexA. D'après Butala, Zgur-Bertok et al., 2009

A- Structure du monomère de LexA.

En rouge : monomère de LexA sous forme libre. En bleu : monomère de LexA fixé à l'ADN. Le changement de conformation est lié à la fixation sur l'ADN. Les structures se superposent au niveau des domaines C-ter. Les 3 hélices α constituant le domaine N-ter sont nommées H1 à H3.

B- Protéine LexA sous forme dimérique, fixée au niveau d'une boîte LexA.

La liaison à l'ADN se fait *via* le domaine N-ter et implique un motif hélice-tour-hélice (HTH).

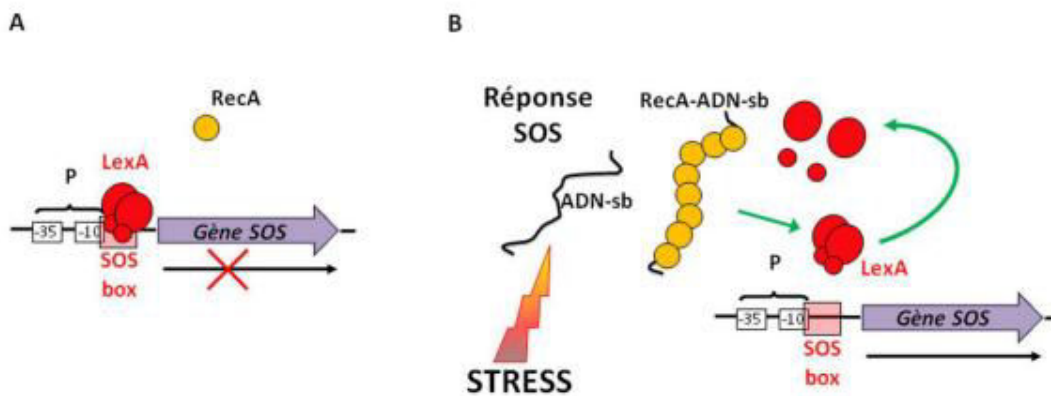


Figure 17 : La réponse SOS. D'après Da Re et Ploy, 2012

A- Absence de stress, gène réprimé.

Dans les conditions normales, en l'absence de stress, la protéine LexA est liée à la « SOS box » (ou LexA box) dans la région promotrice d'un gène du régulon SOS. La protéine LexA agit comme un répresseur transcriptionnel. Le gène n'est pas ou peu exprimé.

B- Stress générant des ADN simple brin, gène activé.

En cas de stress générant de l'ADN simple brin (ADN-sb), la protéine RecA se lie à ces régions d'ADN simple brin pour former un filament nucléoprotéique, ce qui va provoquer l'autoprotéolyse de LexA. Le gène SOS est alors exprimé.

III. Implication de la réponse SOS dans l'acquisition et la dissémination de la résistance.

A. La réponse SOS.

La réponse SOS est un système adaptatif permettant aux bactéries de répondre à divers stress générant des ADN simple brin. Elle met en jeu deux régulateurs centraux : les protéines LexA (locus for X-ray sensitivity A) et RecA (Recombinase A).

La protéine LexA est une protéine de 202 acides aminés composée de deux domaines distincts reliés par une région charnière (Luo et al., 2001). Cette protéine est capable de se fixer à l'ADN sous forme de dimère au niveau de sites de fixation spécifique, appelés « boîtes LexA ». Une boîte LexA est constituée d'un motif palindromique de 16pb de consensus 5'-CTGT-N₈-ACAG-3' situé dans la région promotrice du gène régulé par LexA (Erill et al., 2007). La fixation de LexA au niveau de son site de reconnaissance met en jeu un motif hélice-tour-hélice (HTH) situé dans le domaine N-terminal (NTD) de la protéine (Figure 16). Une fois fixée à une boîte LexA, la protéine agit comme un répresseur transcriptionnel en empêchant le recrutement des ARN polymérase par encombrement stérique (Friedberg et al., 2006).

En absence de stress, les gènes du « régulon » SOS sont constitutivement réprimés par la protéine LexA (Figure 17). Les gènes de ce régulon codent des protéines impliquées dans divers processus cellulaires tels que l'inhibition de la division cellulaire, la réparation et la réplication (Table 3, page suivante) (Storz and Hengge, 2011). Exprimés, ces gènes permettront à la bactérie de survivre à des lésions causées à l'ADN et de les réparer.

Table 3 : Quelques gènes du régulon SOS et leurs fonctions. D'après Storz and Hengge, 2011

Gène	Fonction(s)
<i>cho</i>	Endonucléase de réparation par excision
<i>dinB</i>	ADN polymérase IV
<i>dinD</i>	Fonction inconnue
<i>dinF</i>	Fonction inconnue
<i>dinG</i>	Hélicase
<i>dinI</i>	Stabilisation du filament RecA
<i>lexA</i>	Répresseur de la réponse SOS
<i>polB</i>	ADN polymérase II
<i>ptrA</i>	Protéase III
<i>recA</i>	Recombinaison, active l'autoprotéolyse de LexA et UmuD
<i>recN</i>	Recombinaison/réparation
<i>recX</i>	Déstabilisation du filament RecA
<i>rmuC</i>	Fonction inconnue, les mutants montrent des taux élevés de réarrangements génétiques
<i>ruvAB</i>	Recombinaison ; hélicase, se lie aux jonctions de Holliday
<i>ssb</i>	Se lie à l'ADN-sb, réplication, recombinaison, réparation
<i>sfiA</i>	Inhibition de la division cellulaire
<i>umuDC</i>	ADN polymérase V
<i>uvrAB</i>	Reconnaissance des mésappariements et excision des nucléotides
<i>uvrD</i>	Antirecombinaison DNA hélicase ; déstabilise le filament RecA, impliqué dans la réparation des mésappariements, réparation des mésappariements
<i>ybfE</i>	Fonction inconnue ; se lierait à l'ADN, possible régulateur de transcription
<i>ydjM</i>	Fonction inconnue, protéine de la membrane interne
<i>yebG</i>	Fonction inconnue

L'activation de la réponse SOS met en jeu la protéine RecA. Cette dernière reconnaît les ADN simple brin et s'y fixe formant un filament nucléoprotéique. Ce filament est alors capable d'interagir directement avec la protéine LexA (Kovačič et al., 2013) et d'induire l'autoprotéolyse de cette dernière (Figure 17). La boîte LexA et la région promotrice sont libérées laissant le champ libre à la machinerie transcriptionnelle. Les gènes du régulon SOS, initialement réprimés, sont exprimés. La bactérie est alors à même de gérer les lésions faites à l'ADN.

B. L'activation de la réponse SOS suite à des dommages à l'ADN favorise l'apparition de mutations.

La fidélité des ADN polymérases I et III impliquées dans la réplication de l'ADN repose sur la sélection géométrique des résidus incorporés (Friedberg et al., 2006). L'incorporation d'un résidu ne s'opère que si ce résidu loge parfaitement dans le site actif de la polymérase. Néanmoins cette sélection géométrique a un prix. La moindre anomalie structurale au niveau de la matrice d'ADN va déstabiliser le site actif de la protéine et bloquer la synthèse de l'ADN (Friedberg et al., 2006). Les ADN polymérases I et III sont particulièrement démunies face aux ADN lésés. Aussi pour pouvoir survivre à des dommages à l'ADN et répliquer des ADN endommagés, la bactérie va activer, dans le cadre de la réponse SOS, différents gènes encodant des ADN polymérases dites translésionnelles capables de gérer des matrices d'ADN endommagées.

Les ADN polymérases translésionnelles appartiennent toutes à la famille des polymérases Y (Ohmori et al., 2001). Ces polymérases ont plusieurs particularités. Tout d'abord elles ne possèdent pas d'activité exonucléase 3'-5' et sont donc incapables de « proofreading » (activité de correction) (Goodman, 2002 ; Goodman

and Tippin, 2000). En outre, pour pouvoir tolérer des ADN lésés, le site actif de la polymérase est beaucoup moins sélectif et va donc incorporer plus facilement de mauvais nucléotides (Ling et al., 2001 ; Silvan et al., 2001). Ces deux facteurs vont augmenter considérablement le taux d'erreurs réalisées par les ADN polymérases translésionnelles.

Chez *E. coli*, deux ADN polymérases translésionnelles sont présentes, toutes deux induites par la réponse SOS : les ADN polymérases IV et V encodées respectivement par les gènes *dinB* et *umuDC*. En vertu de leur absence d'activité de « proofreading » et de leur taux important d'erreurs, ces deux polymérases translésionnelles favorisent l'apparition de potentielles mutations de résistance en contexte SOS induit.

C. L'activation de la réponse SOS suite à des dommages à l'ADN favorise la dissémination de nombreux EGM.

Au delà du simple fait de favoriser l'apparition de mutations, la réponse SOS va promouvoir la dissémination de certains EGM.

Il a par exemple déjà été démontré que l'activation de la réponse SOS pouvait augmenter la fréquence de transfert de certains ICE dont l'élément SXT (Beaber et al., 2004). La transposition de certains transposons serait également induite par la réponse SOS. Plusieurs évidences laissent supposer que le transposon *Tn10* serait SOS induit. Parmi ces évidences, l'inactivation de la protéine RecA et donc de la réponse SOS se traduit par une diminution d'un facteur 200 de la fréquence d'insertion des *IS10* encadrant le *Tn10* (Skaliter et al., 1992). En outre, la transposition de l'*IS10* est également induite par des dommages UV infligés à l'ADN et donc par la réponse SOS (Eichenbaum and Livneh, 1998). La capture de

cassettes de résistance par les intégrons est aussi induite par la réponse SOS (E. Guerin et al., 2009). Cette régulation sera détaillée ultérieurement dans le chapitre portant sur les intégrons.

De façon intéressante, il a aussi été démontré que la conjugaison et la transformation pouvait induire la réponse SOS (Baharoglu et al., 2012, 2010). Les mécanismes d'échanges de gènes pourraient donc promouvoir le transfert de résistances par activations de la réponse SOS.

D. Les antibiotiques sont capables d'induire la réponse SOS.

Plusieurs antibiotiques sont capables d'induire la réponse SOS à de faibles concentrations en dessous de la concentration minimale inhibitrice (CMI) (Baharoglu and Mazel, 2014).

Les antibiotiques agissant directement ou indirectement sur la réplication de l'ADN vont être des inducteurs courants du système SOS. C'est notamment le cas du triméthoprim qui inhibe la synthèse des purines et pyrimidines (Lewin and Amyes, 1991) ou des quinolones qui inhibent l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (Pohlhaus and Kreuzer, 2005).

Les β -lactamines sont également capables de déclencher la réponse SOS *via* la voie de transduction DpiBA. La protéine DpiB joue le rôle de senseur et détecte le stress généré par l'antibiotique au niveau de la paroi. En réponse au stress, cette dernière va activer le régulateur DpiA par phosphorylation. La protéine DpiA phosphorylée va alors se lier aux origines de réplication du chromosome bloquant l'activité de l'ADN polymérase III. La réplication étant interrompue, la réponse SOS se déclenche (Miller et al., 2004, 2003).

D'autres antibiotiques comme les aminosides, certaines β -lactamines ou le métronidazole génèrent des dérivés réactifs de l'oxygène qui induisent un stress

oxydatif chez la bactérie ; un stress oxydatif capable de générer des dommages à l'ADN et d'induire la réponse SOS (Kohanski et al., 2010).

L'induction de la réponse SOS par un antibiotique peut dans certains cas être espèce dépendante. Par exemple, les aminosides, la tétracycline et le chloramphénicol sont capables d'induire la réponse SOS chez *V. cholerae* mais pas chez *E. coli* (Baharoglu and Mazel, 2011).

L'induction du système SOS par les antibiotiques est un problème en soit puisque cette induction implique que les antibiotiques sont capables d'induire à la fois la mutagénèse et la dissémination de certains EGM via l'activation du SOS, favorisant ainsi l'émergence de résistances.

A retenir :

La réponse SOS est un système activé par les bactéries pour survivre à divers stress générant des ADN simple brin.

L'activation de cette réponse se traduit à la fois par l'expression d'ADN polymérase à faible fidélité qui favorisent l'émergence de mutations et par une augmentation de la mobilité de certains éléments génétiques mobiles. L'un dans l'autre, la réponse SOS favorise à la fois l'émergence de la résistance et sa dissémination.

De façon intéressante, de nombreux antibiotiques sont capables d'activer cette réponse. *Via* l'activation du système SOS, les antibiotiques vont donc être capables de favoriser l'apparition de la résistance.

Chapitre 2 - Appréhender la propagation de la résistance aux antibiotiques au travers de l'évolution expérimentale.

A l'échelle des populations bactériennes, on peut estimer que des mutations apparaissent fréquemment. Pourtant, toutes ces mutations ne sont pas nécessairement « fixées » et maintenues dans la population.

Toute innovation génétique n'est pas nécessairement avantageuse et peut être perdue à terme si délétère pour la bactérie. La fixation d'une mutation va donc dépendre de contraintes évolutives. Ce qui est vrai pour une mutation l'est aussi pour la résistance au sens large. Une fois acquise, rien n'exclut que la résistance soit perdue au cours de l'évolution.

Il est donc essentiel de développer des outils expérimentaux pour évaluer la dynamique d'évolution des populations bactériennes dans le but de mieux appréhender la dissémination et le maintien de la résistance.

Ce chapitre traitera des concepts évolutifs et des outils expérimentaux permettant de mieux appréhender la propagation et le maintien de la résistance dans les populations bactériennes.

I. La propagation de la résistance : une histoire de sélection naturelle.

A. La sélection naturelle : définition et concepts.

La sélection naturelle est un concept introduit par Charles Darwin en 1859 dans son livre *On the origin of species*. Elle est au centre de la théorie moderne de l'évolution.

Cette théorie suppose que des variations génotypiques entre membres d'une même espèce se répercutent à l'échelle des phénotypes. Dans un environnement donné, ces différences de phénotype vont conférer, ou non, un avantage aux individus. Les membres de l'espèce aux caractères avantageux sont plus enclins à la survie et seront amenés à mieux se reproduire. Conséquence directe de cette reproduction facilitée, les génotypes avantageux sont préférentiellement transmis à la descendance et sont donc naturellement sélectionnés au fil des générations.

Pour conceptualiser ce principe, différentes notions ont été introduites. L'habilité d'un individu à se reproduire dans un milieu donné est représentée par la notion de « **fitness** » (valeur sélective en français). L'effet d'une variation génotypique (mutation ou acquisition de gène) sur le fitness de l'hôte se traduit par un « fitness cost » ou **coût biologique**. Ce coût biologique va définir si l'acquisition génétique est avantageuse, neutre ou délétère pour l'hôte.

Il est important de comprendre que ces concepts sont environnement-dépendants. Une innovation génétique pourra être avantageuse dans un environnement donné mais défavorable dans un autre. Certaines conditions environnementales vont donc être en mesure de sélectionner un ou des

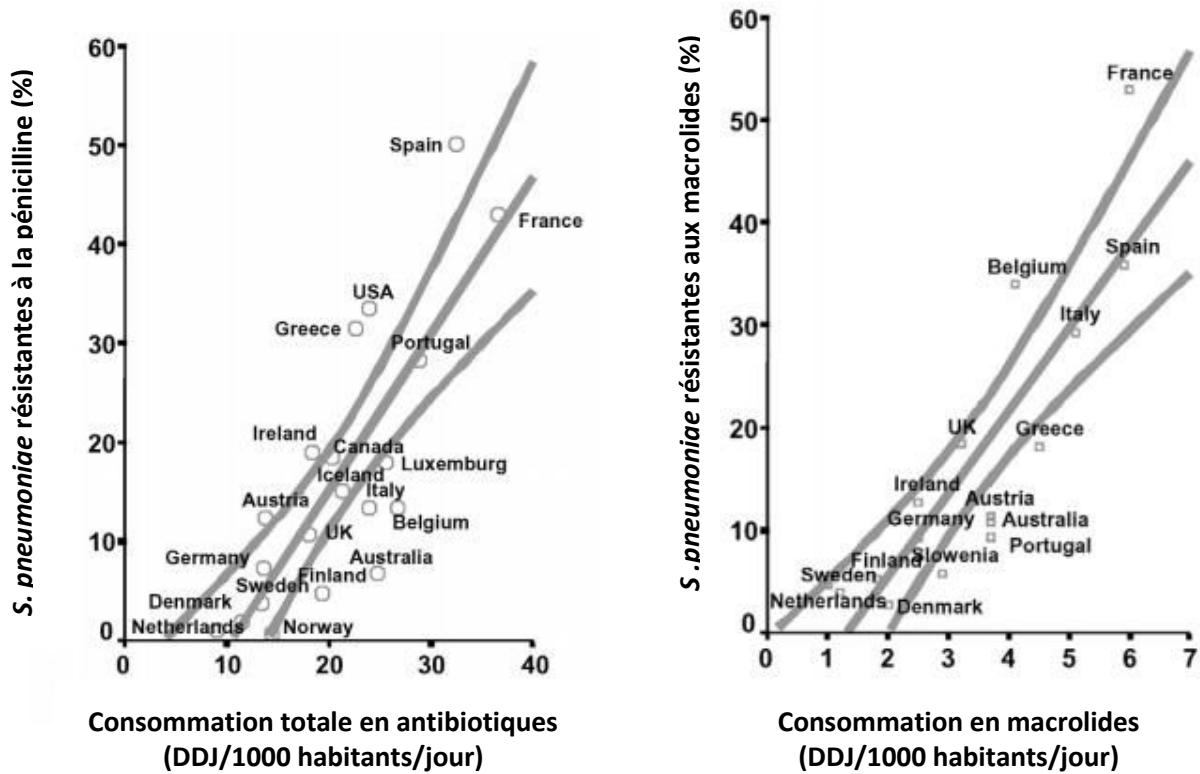


Figure 18 : Corrélation entre la consommation d'antibiotiques et la résistance dans 16 pays. Adapté de Albrich et al., 2004

La DDJ ou Dose Définie Journalière est une unité de mesure quantifiant la dose moyenne d'un médicament administré par jour à un patient de 70kg. On observe une corrélation entre l'antibiorésistance et la consommation en antibiotiques. Plus le pays est consommateur d'antibiotiques, plus les souches résistantes y sont prévalentes.

génotype(s)/phénotype(s) particulier(s). On dit alors que l'environnement exerce une **pression de sélection** sur un caractère donné, la résistance par exemple.

B. La pression de sélection antibiotique : principale responsable de la propagation de la résistance.

Il est généralement admis qu'une pression de sélection antibiotique est indispensable à la dissémination et à la persistance des bactéries résistantes. Les antibiotiques vont naturellement sélectionner les populations bactériennes résistantes qui sont mieux armées pour les contrer.

Cet effet a été plusieurs fois constaté en milieu clinique. Une étude randomisée mettant en jeu des clusters de patients traités ou non à l'azithromycine, a par exemple démontré que le portage de *Streptococcus pneumoniae* résistants dans le nasopharynx augmentait en réponse au traitement antibiotique (Skalet et al., 2010). D'autres études ont plus indirectement montré une corrélation entre la consommation globale d'antibiotiques et les niveaux de résistance de diverses bactéries (Figure 18) (Albrich et al., 2004 ; Bergman et al., 2004 ; Bronzwaer et al., 2002 ; Goossens et al., 2005). Une autre étude démontre l'existence d'une corrélation temporelle entre les pics d'utilisation des antibiotiques et la résistance (Sun et al., 2012).

Au-delà du contexte clinique, l'effet des antibiotiques sur la sélection de souches résistantes est aussi observé dans le réservoir animal. L'utilisation des antibiotiques est particulièrement répandue dans la filière de l'élevage pour notamment prévenir ou traiter les infections bactériennes. Plusieurs études ont déjà démontré l'impact des antibiotiques sur la sélection des résistances dans le monde animal. Une étude danoise a par exemple démontré que l'amoxicilline, le ceftiofur et

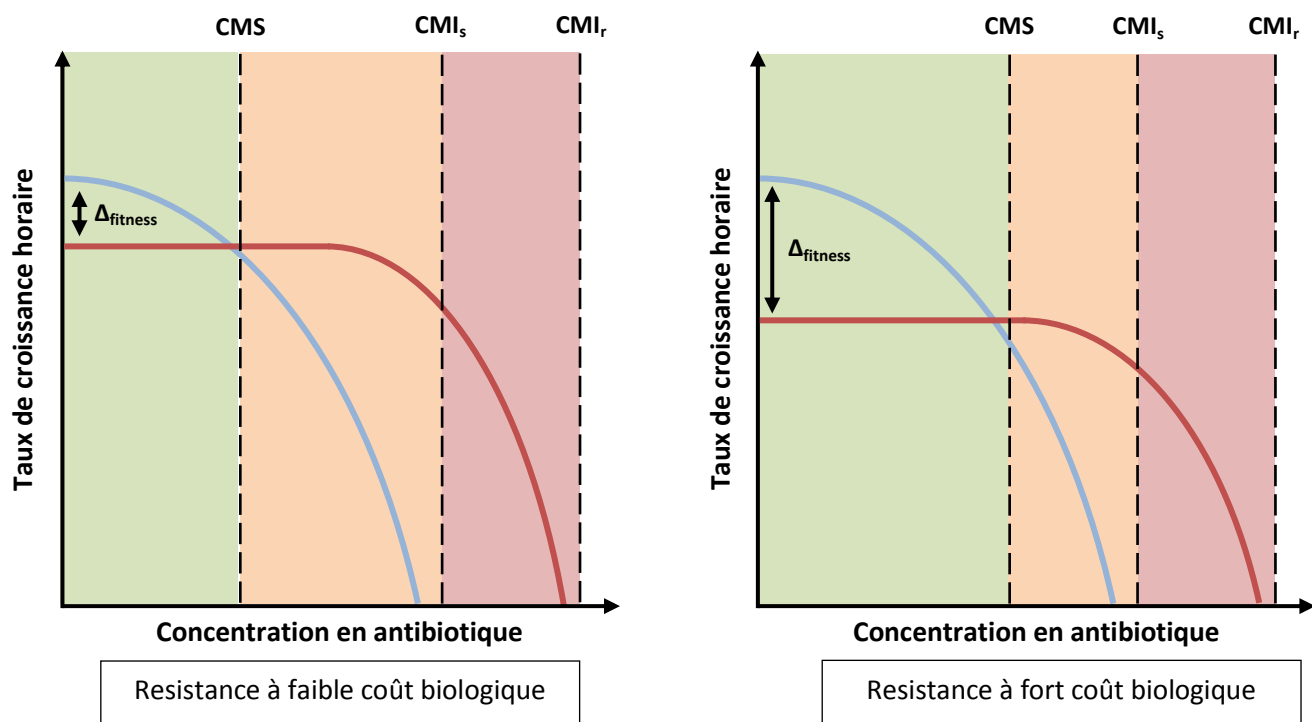


Figure 19 : Coût biologique et sélection en présence de concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques. Adapté d'après Andersson and Hughes, 2011

CMI_s = Concentration minimale inhibitrice de la souche sensible, CMI_r = Concentration minimale inhibitrice de la souche résistante, CMS = Concentration minimale sélective.

Les courbes bleues représentent l'évolution du taux de croissance horaire des bactéries sensibles en fonction de la concentration en antibiotique tandis que les rouges représentent celle des bactéries résistantes.

La fenêtre verte représente la fenêtre de concentrations pour lesquelles les bactéries sensibles sont avantagées. La fenêtre rouge représente la fenêtre de sélection classique de la résistance telle que rencontrée dans le milieu clinique où les antibiotiques inhibent la croissance des bactéries sensibles. La fenêtre orange représente la fenêtre de concentrations sub-inhibitrices dans laquelle les bactéries résistantes sont avantagées bien que les bactéries sensibles soient toujours capables de croître. La taille de cette fenêtre est directement corrélée au coût de la résistance ($\Delta_{fitness}$). À gauche, la résistance possède un coût limité, les bactéries résistantes sont sélectionnées à de faibles concentrations d'antibiotique. À l'inverse à droite où le coût est plus important, il faudra se rapprocher plus près de la CMI des souches sensibles pour espérer sélectionner les bactéries résistantes. La concentration sub-inhibitrice à partir de laquelle on commence à sélectionner les bactéries résistantes constitue la CMS.

le cefquinome (trois β -lactamines) étaient responsables de la sélection de bactéries porteuses de gènes *bla*_{CTX-M} dans le tractus digestif de porcs (Cavaco et al., 2008). Ainsi, comme en contexte clinique, la consommation d'antibiotiques a aussi plusieurs fois été corrélée avec la résistance dans le milieu vétérinaire (Agersø et al., 2012; Chantziaras et al., 2013 ; Jensen et al., 2006).

Cette pression de sélection antibiotique est aussi à l'œuvre dans l'environnement. Une étude chinoise relativement récente a par exemple démontré que des pressions antibiotiques était capables d'enrichir en bactéries résistantes des échantillons d'eau et de sédiments contaminés par du lisier (Xiong et al., 2015). Plusieurs études ont aussi corrélé la présence de marqueurs de résistance dans l'environnement à leur degré d'anthropisation (Gaze et al., 2011 ; Rosewarne et al., 2010 ; Stalder et al., 2012).

Des travaux récents ont également montré que les antibiotiques étaient capables de sélectionner la résistance à des concentrations faibles, bien en deçà de la concentration minimale bactéricide (CMI) (Gullberg et al., 2011). En-dessous de la CMI, bien que non totalement inhibée, la croissance des bactéries sensibles va être ralentie jusqu'à une concentration seuil qualifiée de concentration minimale sélective (CMS) (Figure 19). A ces concentrations, la croissance des souches résistantes n'est elle que très peu affectée. Se crée alors une fenêtre entre la valeur de CMS et de CMI propice à la sélection des bactéries résistantes (Figure 19). La taille de cette fenêtre va néanmoins être fonction du coût biologique de la résistance (Hughes and Andersson, 2012). Moins la résistance sera coûteuse pour la bactérie, plus cette fenêtre de sélection sera étendue (Figure 19). Conséquence directe de cet effet, les résistances à faible coût biologique seront plus facilement sélectionnées à de faibles concentrations sub-inhibitrices (Hughes and Andersson, 2012). Déterminer le coût

biologique d'une résistance est donc essentiel pour mieux appréhender quelles résistances sont les plus susceptibles d'être propagées dans des milieux pauvres en antibiotiques, l'environnement par exemple.

C. Qu'en est-il de la résistance dans des milieux dépourvus d'antibiotiques ?

Il est généralement admis qu'en absence de pression antibiotique, la résistance tend à décliner. Ce postulat est notamment à la base de toutes les politiques visant à contrôler plus strictement l'utilisation des antibiotiques. Si dans la majorité des cas ce postulat s'avère exact, il a aussi plusieurs fois été démontré qu'en l'absence de pression de sélection antibiotique certaines bactéries résistantes étaient capables de persister sur des périodes plus ou moins longues.

Des études cliniques réalisées sur des souches d'entérobactéries (*E. coli* et *K. pneumoniae*) résistantes au triméthoprim ont par exemple démontré qu'en dépit d'une diminution de 85% des prescriptions pendant 2 ans, la prévalence des bactéries résistantes n'était que très faiblement réduite (Brolund et al., 2010; Sundqvist et al., 2010). Même constat dans le réservoir animal où des souches de *Campylobacter jejuni* résistantes aux quinolones (van Boven et al., 2003) et de *E. coli* résistantes au triméthoprim et à la streptomycine (Chaslus-Dancla et al., 1987) étaient capables de persister pendant plusieurs semaines en l'absence d'antibiotique.

Mais alors quels sont les facteurs qui vont favoriser la persistance de la résistance en absence de pression de sélection ?

Le premier de ces facteurs est la **co-sélection** des résistances. La co-sélection consiste en la sélection d'un marqueur de résistance par le biais d'une

pression indirecte (Cantón and Ruiz-Garbajosa, 2011). Comme évoqué précédemment, de plus en plus de bactéries sont multirésistantes. Dans ce contexte de multirésistance, une résistance à un antibiotique A pourra être sélectionnée par un antibiotique B si les deux marqueurs de résistance à A et B sont physiquement liés. Une étude vietnamienne a par exemple démontré que des traitements à base de β -lactamines étaient capables d'enrichir le tractus digestif des patients en bactéries résistantes aux quinolones par co-sélection (Vien et al., 2012). Réciproquement, une étude plus récente de méta-génomique a démontré que des traitements à base de quinolones pouvaient sélectionner certaines résistance aux β -lactamines mais aussi aux macrolides et à la tétracycline (Willmann et al., 2015). Ainsi la multirésistance va donner l'opportunité à certains marqueurs de résistance de persister par co-sélection.

Un autre facteur essentiel à la persistance des bactéries résistantes en l'absence de pression de sélection est le **coût biologique de la résistance**. Des résistances n'ayant pas ou peu d'impact sur le fitness de l'hôte auront plus de chance de persister à long terme (Andersson and Hughes, 2011). A l'inverse, une résistance à fort coût biologique va drastiquement réduire les capacités de croissance/multiplication des bactéries résistantes et donc leur survie à long terme. Etre en mesure de définir le coût biologique d'une résistance est donc essentiel pour appréhender son potentiel de persistance.

Un dernier facteur va influencer la persistance des bactéries résistantes. De même que les bactéries sont capables d'évoluer pour devenir résistantes, elles sont aussi capables d'évoluer pour réduire le coût de leur résistance. En 1996, Stéphanie Schrag et Véronique Perrot font évoluer des bactéries résistantes à la streptomycine (mutations dans le gène *rpsL*) pendant une centaine de générations en absence de

pression antibiotique. Alors qu'elles s'attendaient à un phénomène de réversion (mutation rétablissant la séquence originelle du gène), ces dernières observent que malgré l'absence de pression de sélection la résistance a été conservée dans la totalité des bactéries évoluées (Schrag and Perrot, 1996). En comparant le fitness de bactéries résistantes non évoluées et évoluées, les chercheuses constatent que le fitness des bactéries résistantes évoluées est plus important que celui des souches non évoluées. En d'autres termes, les bactéries ont évolué pour rendre les souches résistantes plus compétitives et plus persistantes. On parle alors de **mutations compensatoires** capables de diminuer le coût global de la résistance.

Ces trois facteurs (co-évolution, coût biologique et présence de mutations compensatoires) vont donc conditionner la persistance d'une bactérie résistante en absence de pression de sélection. Il est donc important de développer des outils expérimentaux permettant d'évaluer le coût biologique d'une résistance ou mimant l'évolution d'une population bactérienne résistante afin d'appréhender sa dynamique.

A retenir :

La propagation de la résistance répond à des contraintes évolutives. Elle est le fruit d'une pression de sélection antibiotique qui favorise les bactéries résistantes au détriment des bactéries sensibles. Une solution pour limiter la propagation de la résistance a donc été de réduire cette pression en limitant l'usage des antibiotiques. Une politique qui bien que bénéfique se heurte à nouveau aux capacités adaptatives des bactéries.

Car en effet, même en l'absence de pression de sélection directe, les bactéries sont capables de maintenir leur résistance. Cette persistance s'explique en tenant compte de trois phénomènes : la co-sélection des résistances, le coût biologique de la résistance et l'apparition de mutations compensatoires.

Il est donc important pour le microbiologiste de développer des outils permettant d'évaluer ces paramètres et d'appréhender la dynamique d'apparition des mutations de résistance et/ou compensatoires.

II. Le coût biologique de la résistance.

Etre en mesure de déterminer le coût biologique d'une résistance est essentiel pour appréhender le potentiel de persistance de cette résistance. Plus le coût de la résistance sera important, plus il sera difficile pour une souche résistante de se maintenir dans un environnement ne contenant pas ou peu d'antibiotique. En outre comme évoqué plus haut, ce coût va aussi définir dans quelle mesure une résistance peut être sélectionnée en présence de concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques (Figure 19, page 52).

A. Déterminer le coût d'une résistance expérimentalement.

Déterminer le coût d'une résistance revient à calculer la différence de fitness entre une souche résistante et une souche isogénique sensible.

De part sa définition, le fitness représente l'aptitude d'une bactérie à se reproduire. Les bactéries se reproduisant par scissiparité, déterminer le fitness d'une bactérie revient à évaluer sa capacité à se diviser. Une première approche pour déterminer le coût d'une résistance est donc de comparer le taux de croissance horaire d'une souche pure sensible à celui d'une souche pure résistante. Le taux de croissance horaire μ d'une souche bactérienne est défini tel que :

$$\mu = \frac{d \ln N}{dt}$$

où N représente la densité de population. En pratique, la détermination du taux de croissance horaire d'une souche bactérienne passe le plus souvent par la mesure de la densité optique (DO) de la population (une valeur corrélée à N) à intervalle de temps régulier. La régression linéaire de la fonction $\ln(\text{DO}) = f(t)$ permet alors d'obtenir le taux de croissance horaire de la bactérie.

Cette méthode a été utilisée à plusieurs reprises pour déterminer le coût biologique de marqueurs de résistance (Ender et al., 2004 ; Enne et al., 2004 ; Giraud et al., 2003). Néanmoins cette approche reste limitée du fait de sa faible sensibilité. Des différences de fitness affectant la croissance bactérienne de moins de 5% ne pourront être efficacement détectées (Andersson and Hughes, 2011). En outre, le calcul d'un taux de croissance horaire ne considère souvent que la phase de croissance exponentielle des bactéries. Il ne tient donc pas compte d'éventuelles différences de fitness en phase de latence ou en phase stationnaire ce qui constitue un biais de mesure.

D'autres approches plus sensibles et plus globales ont donc dû être imaginées pour évaluer la différence relative de fitness entre deux souches bactériennes. Parmi ces approches, la plus utilisée reste celle des **compétitions bactériennes** (Lenski, 1991). Dans le cadre de ces expériences, deux souches bactériennes sont co-inoculées dans un même milieu à un ratio initial connu. La co-culture est ensuite propagée pendant un certain nombre de générations. Au cours de l'expérience, le ratio entre les 2 populations bactériennes est évalué. Celui-ci peut être constant ou bien évoluer attestant d'une différence de croissance entre les 2 populations. Cette approche nécessite néanmoins de pouvoir faire la distinction entre les deux populations bactériennes. Cette distinction peut se faire sur la base de critères métaboliques (Lenski et al., 1991), de phénotypes de résistance (Rodríguez-Verdugo et al., 2013 ; Schrag et al., 1997) ou encore de marqueurs de fluorescence (Gallet et al., 2012). Dans tous les cas le marqueur de sélection devra être sélectivement neutre et ne pas avoir d'impact sur le fitness de la bactérie hôte.

L'expérience de compétition vise à déterminer la différence relative de fitness entre deux souches bactériennes A et B en co-culture. Cette différence relative de fitness est représentée par un coefficient de sélection s défini tel que :

$$s = \frac{d}{d\tau} \left(\ln \frac{N_A}{N_B} \right) \quad (1)$$

où $\frac{N_A}{N_B}$ correspond au ratio R entre les bactéries A et B et τ au nombre de générations bactériennes. Le ratio entre les deux populations bactériennes peut aussi être calculé à partir des fréquences de chaque compétiteur. On a alors :

$$R = \frac{p}{1-p}$$

où p correspond à la fréquence de bactéries A dans la population totale. L'équation (1) peut donc aussi s'écrire :

$$s = \frac{d}{d\tau} \left(\ln \frac{p}{1-p} \right)$$

En pratique, le coefficient de sélection est donc généralement obtenu en calculant le coefficient de régression linéaire de la fonction $\ln \frac{p}{1-p} = f(\tau)$. Lors d'une expérience d'évolution, il suffit donc d'être capable de suivre la fréquence de l'un des deux compétiteurs au cours du temps pour être en mesure de calculer s . Plutôt que de donner un coefficient de sélection, certains auteurs préfèrent donner une valeur de fitness relatif W défini tel que :

$$W = 1 + s$$

De nombreux travaux ont évalué le coût de la résistance au travers d'expériences de compétitions bactériennes (Andersson and Hughes, 2014 ; Rodríguez-Verdugo et al., 2013 ; Schrag et al., 1997). Cette méthode présente l'avantage d'être bien plus sensible que la comparaison des taux de croissance horaire de souches bactériennes pures. Couplées à des approches de cytométrie en

flux, les compétitions bactériennes permettent de détecter des différences de fitness de l'ordre de 10^{-3} (Gallet et al., 2012). De plus contrairement à la simple mesure d'un taux de croissance horaire, cette approche tient compte d'éventuelles différences de fitness lors de l'ensemble des phases de la croissance bactérienne. L'un dans l'autre, les compétitions bactériennes sont à privilégier lorsque l'on désire déterminer le coût biologique d'une innovation génétique.

B. Le coût de la résistance.

1. Coût de la résistance chromosomique.

De très nombreux travaux se sont attachés à déterminer le coût de la résistance chromosomique. Néanmoins, ces travaux mettent en jeu des méthodologies différentes (comparaison des taux de croissance versus compétition bactérienne, *in vitro* versus *in vivo*, ...) et considèrent des espèces bactériennes et des mécanismes de résistance variés, si bien qu'il est parfois difficile de faire la part des choses et de tirer de vrais concepts de cette littérature foisonnante. Deux méta-analyses récentes ont néanmoins permis de mettre en évidence l'effet de différents facteurs sur le coût biologique de la résistance (Melnyk et al., 2015 ; Vogwill and MacLean, 2015).

Le premier point soulevé par ces méta-analyses est le coût moyen de la résistance chromosomique. En considérant 179 mutations (de 8 espèces bactériennes et 8 classes d'antibiotiques), la première analyse estime qu'en moyenne l'apparition d'une mutation de résistance réduirait le fitness de l'hôte de 12% (Melnyk et al., 2015). L'autre méta-analyse, plus complète, estime quand à elle le coût de la résistance chromosomique à une réduction du fitness de l'hôte de 20% en moyenne (Vogwill and MacLean, 2015). L'émergence d'une résistance

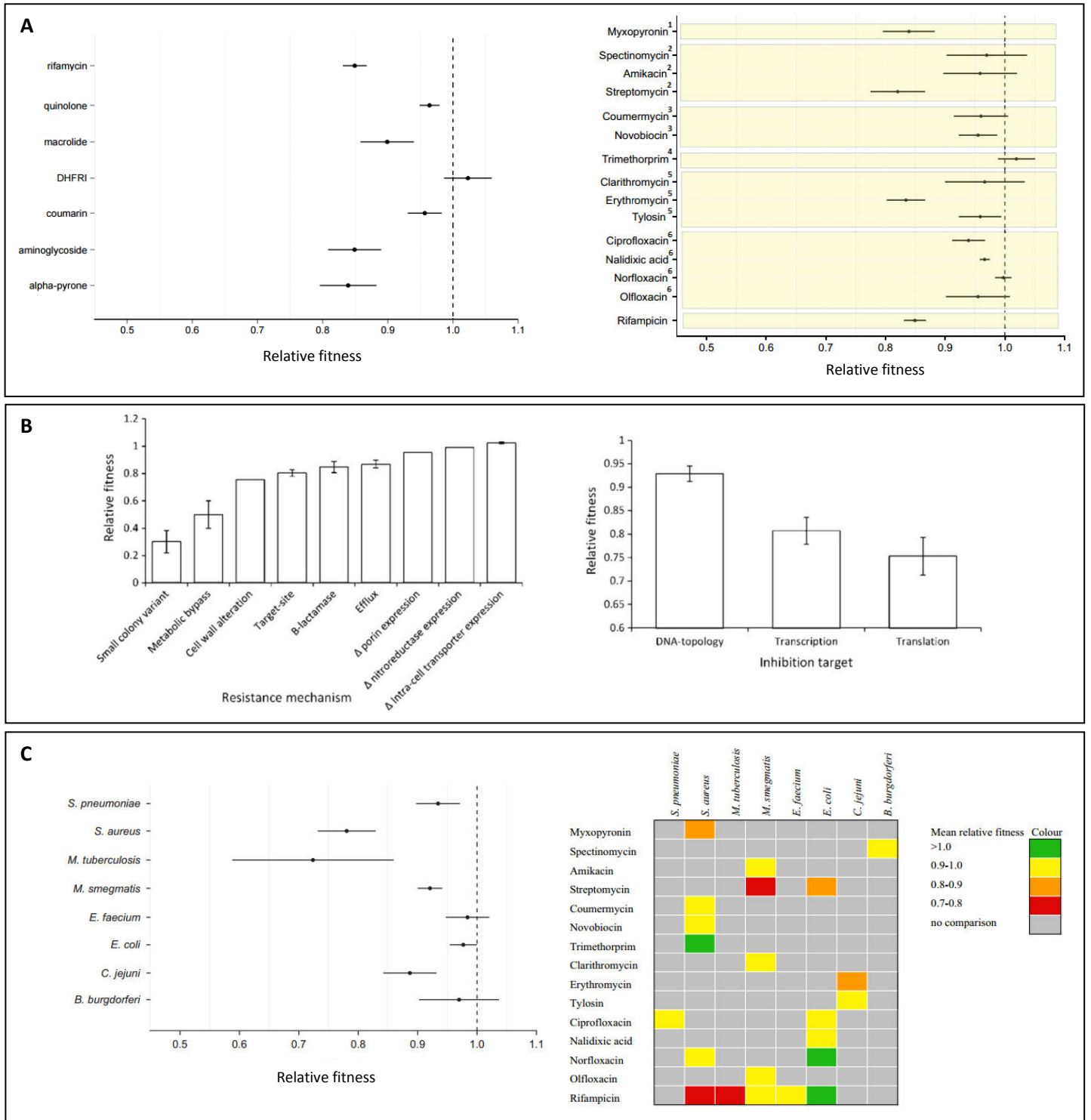


Figure 20 : Le coût biologique de la résistance chromosomique. Adapté d'après Melnyk et al., 2015 et Vogwill and MacLean, 2015

A. Un coût dépendant de la famille d'antibiotique et de l'antibiotique.

¹Alpha-pyrone, ²Aminoglycosides, ³Coumarines, ⁴DHFRI (Dihydrofolate Reductase Inhibitor), ⁵Quinolones, ⁶Macrolides.

B. Un coût dépendant du mécanisme de résistance et de la voie métabolique ciblée par l'antibiotique.

C. Un coût dépendant de l'organisme considéré.

chromosomique serait donc généralement accompagnée d'un coût non négligeable pour la bactérie hôte.

D'après les travaux de Melnyk *et al.*, le coût moyen de la résistance chromosomique serait aussi dépendant de la famille d'antibiotique considérée (Figure 20A). Ces résultats sont à mettre en perspective avec la méta-analyse de Vogwill et MacLean qui suggère que le coût de la résistance chromosomique serait dépendant du mécanisme de résistance et aussi de la voie métabolique affectée par la résistance (Figure 20B) (Vogwill and MacLean, 2015). Sachant qu'une famille d'antibiotique cible une voie métabolique particulière, il semble cohérent que, si le coût de la résistance est tributaire de la voie métabolique affectée, il puisse y avoir des différences de coût selon la famille d'antibiotique considérée. En outre au-delà même d'être famille-dépendant, le coût de la résistance serait antibiotique-dépendant (Figure 20A) (Melnyk et al., 2015). Il serait par exemple moins coûteux de résister à la spectinomycine qu'à la streptomycine, deux antibiotiques qui pourtant font partie de la même famille et ciblent tous deux les ribosomes bactériens.

De façon intéressante, le coût de la résistance semble également dépendre de l'espèce bactérienne (Figure 20C). En effet selon le fond génétique dont elle émerge, une résistance pourra avoir un coût différent. C'est par exemple le cas de la résistance à la rifampicine beaucoup plus coûteuse chez *S. aureus* que chez *E. coli* (Figure 20C). Il existerait d'ailleurs une différence entre le coût de la résistance chez les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. L'apparition d'une mutation de résistance chez une bactérie à Gram positif se traduirait par une diminution moyenne du fitness de l'hôte de 18% contre seulement 3% pour une bactérie à Gram négatif (Melnyk et al., 2015).

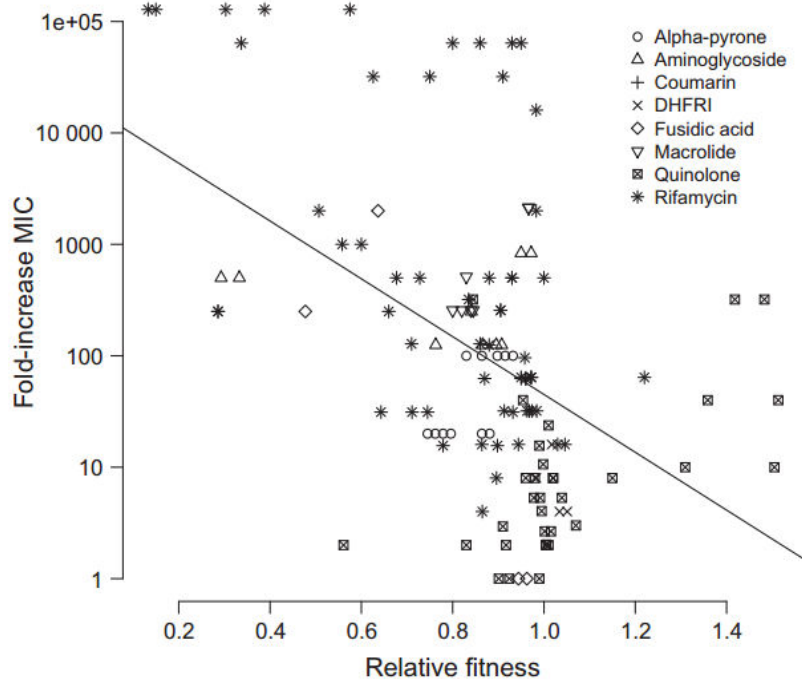


Figure 21 : Corrélation entre le coût de la résistance chromosomique et le niveau de résistance associée (augmentation de la CMI). D'après Melnyk et al., 2015

Plus le niveau de résistance est élevé, plus le coût biologique est élevé (fitness relatif bas).

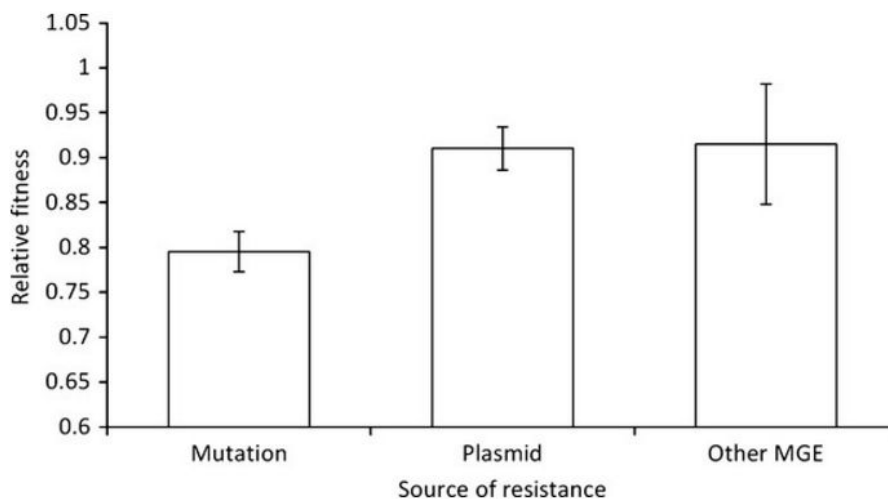


Figure 22 : Le coût de la résistance est fonction de son support. D'après Vogwill and MacLean, 2015

Données calculées à partir de 760 mutations de résistance chromosomique, 49 plasmides et 7 autres EGM. Il en ressort que le coût de la résistance chromosomique est généralement plus important que celui de la résistance associée aux EGM.

Enfin, le coût de la résistance chromosomique a également plusieurs fois été corrélé au niveau de résistance qu'elle confère. D'abord observée ponctuellement pour diverses résistances à la fois chez des bactéries à Gram positif (Hurdle et al., 2004 ; O'Neill et al., 2006) et à Gram négatif (Paulander et al., 2007), cette corrélation a ensuite été confirmée par une méta-analyse prenant en compte 8 espèces bactériennes et 179 mutations de résistance (Figure 21) (Melnyk et al., 2015).

2. Le coût de la résistance associée aux éléments génétiques mobiles (EGM).

Si la littérature sur le coût de la résistance chromosomique est plutôt riche, celle sur le coût biologique des EGM porteurs de gènes de résistance est beaucoup moins fournie. Si l'on exclue les travaux portant sur les plasmides de résistance, moins d'une dizaine d'articles traitent du coût de la résistance associée aux ICE, transposons ou autres EGM (Enne et al., 2005 ; Foucault et al., 2010 ; Knight et al., 2013 ; Starikova et al., 2013, 2012). Du fait de ce manque de littérature sur le sujet, la suite de ce paragraphe se concentrera sur le coût de la résistance plasmidique, mieux renseignée.

De façon étonnante le coût biologique moyen associé à la résistance plasmidique est relativement faible. Une méta-analyse sur 49 plasmides de 16 études différentes estime que la présence d'un plasmide de résistance, voire de multirésistance ne diminue en moyenne le fitness de l'hôte que de 9% (Vogwill and MacLean, 2015). Si l'on compare cette valeur au coût moyen de la résistance chromosomique mentionné dans le paragraphe précédent, il en ressort qu'il est en moyenne deux fois moins coûteux de porter un plasmide de résistance plutôt qu'une mutation chromosomique de résistance (Figure 22). Ceci s'explique en partie par le

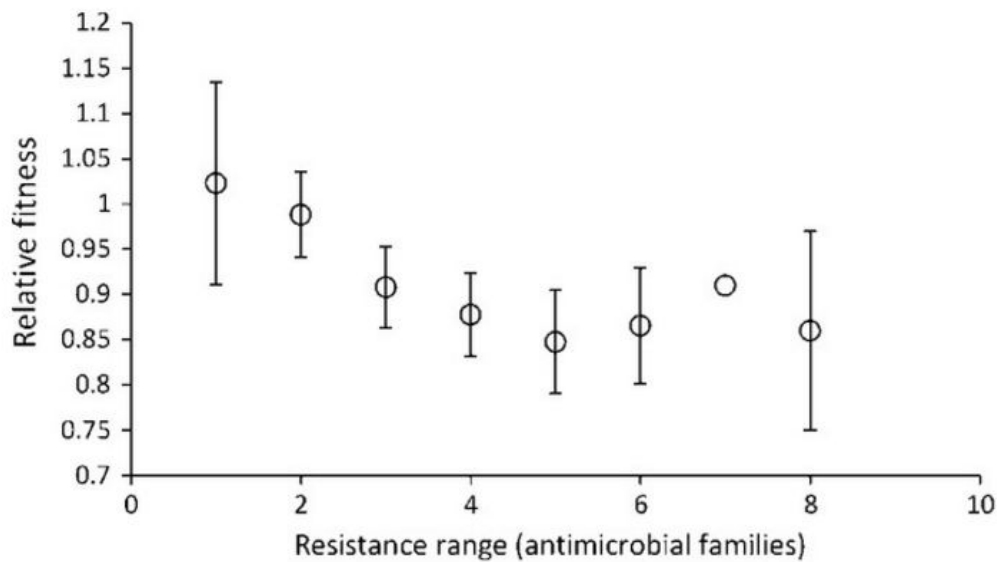


Figure 23 : Le coût de la résistance plasmidique dépend du nombre de gènes de résistance portés. D'après Vogwill and MacLean, 2015

Données issues de l'analyse de 49 plasmides (6, 6, 14, 7, 8, 5, 1 et 2 plasmides pour chaque nombre de résistance de gauche à droite). Le coût du plasmide augmente avec le nombre de résistances portées.

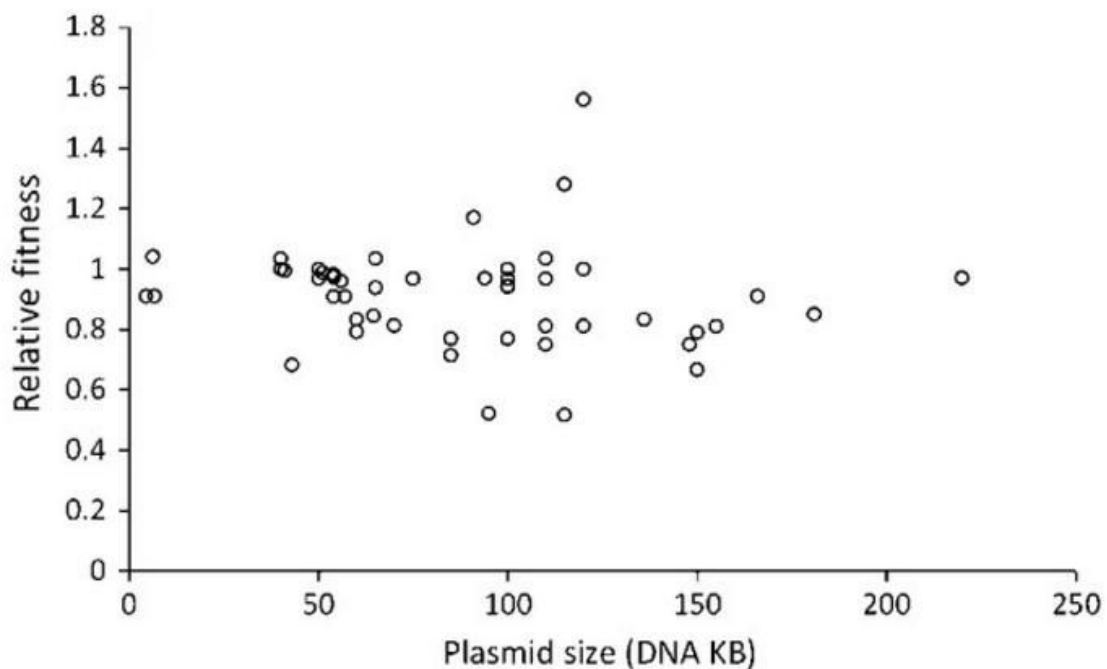


Figure 24 : Coût de la résistance plasmidique et taille des plasmides. D'après Vogwill and MacLean, 2015

Données issues de l'analyse de 49 plasmides. A priori, la taille des plasmides n'influerait pas sur le coût de ces derniers. A nuancer sachant qu'il existerait une corrélation inverse entre la taille des plasmides et le nombre de copies de ces derniers, un autre paramètre qui lui influence le coût de la résistance (San Millan et al., 2015).

fait que les mutations de résistances chromosomiques affectent souvent des gènes clés du métabolisme bactérien (gènes codant des ARN polymérases, des ARN ribosomiaux, des topoisomérases...). Le fort coût des résistances chromosomiques s'expliquerait ainsi par l'effet pléiotropique engendré par de telles mutations.

Le coût des plasmides de résistance est aussi corrélé au nombre de marqueurs de résistance présents sur le plasmide (Vogwill and MacLean, 2015). Un plasmide codant une seule résistance sera généralement moins coûteux qu'un plasmide de multirésistance avec plusieurs gènes de résistance (Figure 23).

Le nombre de copies d'un plasmide semble avoir également un impact sur le coût. Une étude récente réalisée sur *Haemophilus influenzae* suggère que le coût consécutif à l'introduction d'un plasmide de résistance dans une bactérie en absence de pression de sélection serait rapidement suivi d'une réduction du nombre de copies de ce plasmide ; réduction elle-même corrélée à une restauration du fitness de l'hôte (San Millan et al., 2015). En d'autres termes, un plasmide en réduisant son nombre de copies est capable de diminuer son coût.

Selon les données de la méta-analyse de Vogwill et MacLean, le coût d'un plasmide ne serait pas lié à sa taille (Figure 24). Ces résultats sont néanmoins à nuancer ; en effet il existerait une corrélation inverse entre la taille des plasmides et le nombre de copies (Smith and Bidochka, 1998 ; Zhong et al., 2011). On peut donc imaginer que le coût des grands plasmides serait compensé par un nombre de copies plus faible. A nombre de copie égal, un plus grand plasmide serait probablement plus coûteux.

Enfin l'environnement génétique dans lequel le plasmide est introduit affecte lui aussi son coût. Plusieurs études ont notamment démontré que l'introduction d'un même plasmide dans différents fonds génétiques parfois proches se traduisait par

des coût différents (Humphrey et al., 2012 ; Mongkolrattanothai et al., 2009; Søndergaard et al., 2015). L'étude de Vogwill et MacLean soulève également le fait que la variance liée à l'introduction d'un même plasmide dans différentes souches et celle liée à l'introduction de différents plasmides dans une même souche ne sont significativement pas différentes (Vogwill and MacLean, 2015). Une observation qui suggère que le fond génétique de l'hôte est tout aussi important que les caractéristiques du plasmide lorsque l'on considère le coût de ce dernier.

Si l'on s'intéresse à présent aux rares études concernant le coût des EGM, la leçon principale à en tirer reste que le coût de la résistance associée aux EGM est plus faible que celui associé à la résistance chromosomique. On estime que la résistance liée aux EGM réduit en moyenne le fitness de l'hôte à hauteur de 10% (Vogwill and MacLean, 2015).

Tous ces résultats soulignent le caractère avantageux des résistances associées aux EGM qui en plus d'être transférables sont peu coûteuses, ce qui explique sans doute leur succès évolutif.

A retenir :

Le coût biologique d'une résistance est un paramètre essentiel pour appréhender son maintien en absence de pression de sélection et sa sélection en présence de faibles quantités d'antibiotiques.

Des outils ont donc été développés pour évaluer ce coût ; ces outils étant soit la comparaison des taux de croissance horaire entre bactéries sensibles et résistantes, soit la réalisation d'expériences de compétitions bactériennes beaucoup plus sensibles.

Ces expériences ont permis de faire la lumière sur le coût de la résistance au sens large. La principale idée à retenir étant que la résistance qu'elle soit chromosomique, plasmidique ou portée par d'autres EGM reste coûteuse dans la majorité des cas. En outre, le coût de la résistance « mobile » est généralement plus faible que celui de la résistance chromosomique, ce qui explique sans doute la forte prévalence et le succès évolutif des EGM porteurs de résistances.

La principale raison du maintien de ces résistances pourtant coûteuses, au delà de la co-sélection, demeure l'adaptation des bactéries résistantes et l'apparition de mutations compensatoires. Il est donc là aussi essentiel de développer des outils permettant d'appréhender la dynamique d'apparition des mutations dans le cadre de l'évolution. Des expériences qui peuvent aussi bien s'appliquer à l'apparition de mutations de résistance en réponse à une pression antibiotique ou à l'apparition de mutations compensatoires comme évoqué précédemment.

III. L'évolution expérimentale : un moyen d'apporter des réponses.

A. Définition.

L'évolution expérimentale consiste à tester des hypothèses basées sur les principes de l'évolution dans le cadre d'expériences contrôlées. Ces expériences considèrent généralement des populations homogènes qui au cours du temps vont se différencier par accumulation de mutations. La sélection naturelle va alors faire son œuvre et sélectionner les individus les plus adaptés au contexte de l'expérience. L'idée est d'étudier à l'échelle des génomes les différences entre les organismes de départ et les organismes évolués pour ainsi appréhender les déterminants génétiques de l'évolution (Kawecki et al., 2012).

Des expériences d'évolution ont été appliquées à des organismes tels que la drosophile (Rose et al., 1992) ou la souris (Dohm et al., 1994 ; Dumke et al., 2001). Néanmoins elles impliquent généralement des micro-organismes dont les temps de générations sont courts et permettent donc de visualiser des phénomènes d'adaptation rapidement. Ainsi des bactéries telles que *E. coli* (Lenski and Travisano, 1994) ou *Pseudomonas fluorescens* (Rainey and Travisano, 1998), la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Paquin and Adams, 1983) ou encore l'algue *Chlamydomonas* (Colegrave et al., 2002) sont des modèles d'évolution très courants.

Les expériences d'évolution impliquent deux conditions : être capables de propager l'organisme d'intérêt (bactéries dans le cas présent) sur de nombreuses générations et être en mesure à l'issue de l'expérience de faire le lien entre le phénotype et le génotype de l'organisme évolué.

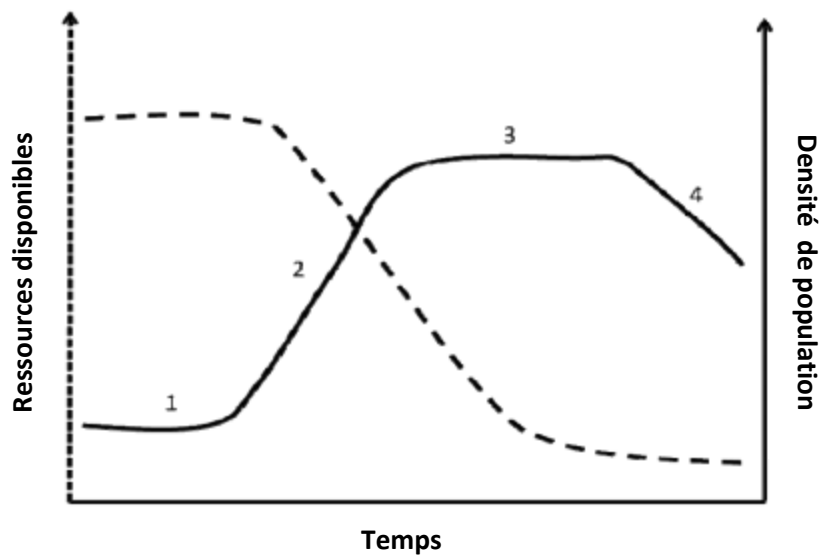


Figure 25 : Cinétique d'une population bactérienne lors d'une culture en batch. Adapté de Madigan et al., 2009

Le trait pointillé correspond à la concentration en ressources dans le milieu tandis que la ligne pleine représente la densité de population dans la culture.

La phase 1 correspond à une phase de latence où les bactéries synthétisent les enzymes nécessaires à la métabolisation des ressources disponibles. La phase 2 exponentielle correspond une phase de croissance bactérienne sans limitation de ressources. A mesure que les bactéries se divisent, les ressources du milieu s'épuisent. La phase 3 stationnaire correspond à une phase où les ressources commencent à manquer. Autant de bactéries apparaissent par division qu'il n'en meure par manque de nutriment, la croissance est nulle. A long terme, le manque de nutriment se traduit par une phase de déclin où la densité de population diminue du fait d'une carence prolongée.

B. Comment propager des bactéries sur de nombreuses générations ?

1. Repiquage successif : culture discontinue dite en batch.

Le repiquage successif, particulièrement simple, est la technique la plus couramment utilisée pour propager des bactéries sur de longues générations. Des bactéries sont inoculées dans un milieu de culture dans lequel elles vont pousser jusqu'à épuisement des ressources. Une fois les ressources épuisées, l'expérimentateur récupère une partie des bactéries évoluées et les ré-inocule dans du milieu neuf où elles pourront à nouveau croître. Des repiquages sont ainsi réalisés quotidiennement jusqu'à atteindre un nombre suffisant de générations bactériennes.

Le milieu étant non renouvelé, la croissance des bactéries va suivre chaque jour une cinétique particulière (Figure 25). Celle-ci commence par une phase de latence durant laquelle les bactéries synthétisent les enzymes nécessaires à la métabolisation des substrats présents dans le milieu. La croissance est alors nulle. La durée de la phase de latence tend à diminuer à mesure que les bactéries évoluent et s'adaptent au milieu. S'en suit une phase de croissance exponentielle durant laquelle les bactéries se divisent par scissiparité jusqu'à épuisement des ressources du milieu puis elles entrent en phase stationnaire de croissance. La croissance y apparaît nulle : le nombre de bactéries en phase stationnaire N_{stat} est constant. Autant de bactéries apparaissent qu'il en disparaît. Ce nombre de bactéries est fonction de la quantité initiale de bactéries N_0 et du nombre de générations bactériennes n réalisées. Mathématiquement, N_{stat} peut s'exprimer de la façon suivante :

$$N_{stat} = N_0 2^n \Leftrightarrow \frac{N_{stat}}{N_0} = 2^n$$

En passant l'équation précédente au logarithme, on obtient :

$$\ln \frac{N_{stat}}{N_0} = \ln 2^n \Leftrightarrow \ln \frac{N_{stat}}{N_0} = n \ln 2$$

Soit :

$$n = \frac{\ln \frac{N_{stat}}{N_0}}{\ln 2}$$

Le nombre moyen de générations bactériennes obtenues lors d'une culture en batch est donc fonction de l'inoculum de départ et du nombre de bactéries en phase stationnaire de croissance.

Ainsi dans le cadre d'une expérience d'évolution, si les cultures sont repiquées tous les jours alors que les bactéries sont en phase stationnaire de croissance, le paramètre $\frac{N_{stat}}{N_0}$ se résume au facteur de la dilution réalisée chaque jour. Ainsi, si par exemple on réalise une inoculation au 100^e pour propager les bactéries, tous les jours seront réalisées $n = \frac{\ln 100}{\ln 2} \approx 6.64$ générations bactériennes. En choisissant un facteur de dilution, l'opérateur peut ainsi moduler la « vitesse » à laquelle les bactéries vont se multiplier et donc évoluer.

La technique d'évolution en batch présente donc plusieurs avantages. C'est une technique simple qui ne nécessite aucun matériel particulier autre que celui couramment utilisé en routine dans les laboratoires de microbiologie. L'utilisateur peut en outre choisir le nombre de divisions bactériennes générées chaque jour *via* la dilution opérée à l'inoculation.

Elle possède également quelques limites. Une telle expérience nécessite une assiduité particulière car les repiquages doivent être effectués tous les jours. En outre, à chaque repiquage, les bactéries passent par les différentes phases de croissance inhérentes à la culture en batch. La physiologie des bactéries va ainsi osciller périodiquement entre des phases de croissance (phase exponentielle) et de

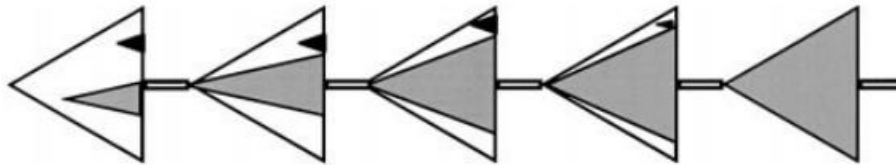


Figure 26 : Illustration du goulot d'étranglement inhérent à la culture discontinue en batch. D'après Levin et al., 2000

Les triangles représentent la dynamique d'évolution de la population bactérienne au cours du temps dans une culture discontinue en batch. La pointe gauche du triangle représente le moment de l'inoculation où la densité bactérienne est faible tandis que sa base représente la phase stationnaire de croissance où la densité bactérienne est maximale. Dans la première culture initialement homogène (population blanche), émergent deux sous-populations avantageuses, une grise apparue plus tôt et une noire apparue un peu plus tard. Du fait de son émergence plus précoce, la population grise s'est plus divisée et est par conséquent plus fréquente dans la population totale que la population noire. La population grise aura donc statistiquement plus de chance d'être inoculée dans la prochaine culture. Dans l'exemple présenté ci-dessus, la population noire émerge 4 fois mais n'est jamais propagée d'une culture à l'autre en raison de ce goulot d'étranglement inhérent au repiquage.

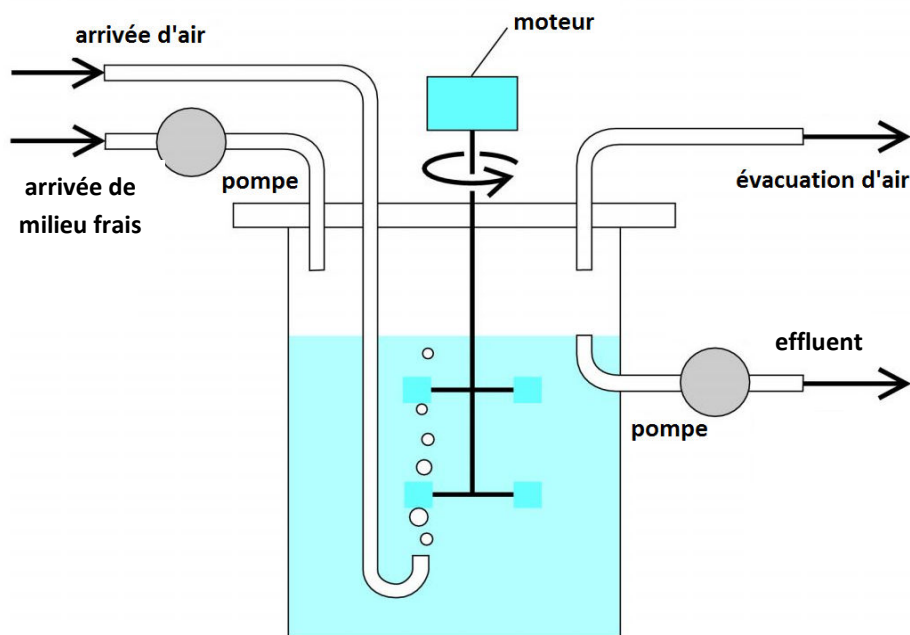


Figure 27 : Principe de fonctionnement d'un chemostat.

Un chemostat est constitué d'un bioréacteur continuellement alimenté en milieu de culture neuf par l'intermédiaire d'une pompe. A l'intérieur du réacteur, une arrivée d'air et un système mécanique fournissent oxygénation et agitation aux bactéries. Le volume de milieu dans le réacteur est maintenu constant grâce à une seconde pompe expulsant du milieu de culture (effluents).

carence (phase stationnaire). Une autre limitation de cette technique est qu'il existe un goulot d'étranglement à chaque repiquage (Figure 26) (Levin et al., 2000). Ce goulot d'étranglement implique notamment que d'un repiquage à l'autre on ne propage pas nécessairement les bactéries les plus avantageuses mais plutôt les bactéries les plus fréquentes dans l'échantillon (Figure 26). Par repiquage, il est donc possible d'éliminer une population bactérienne rare ayant un fitness pourtant avantageux.

La plus célèbre expérience d'évolution en batch reste sans aucun doute celle de Richard Lenski. Dans cette expérience, douze réplicats isogéniques de *E. coli* ont été (et sont encore) propagés sur des dizaines de milliers de générations dans un milieu carencé en source de carbone (Blount et al., 2012 ; Lenski et al., 1991 ; Tenaillon et al., 2016).

2. Culture continue en chemostat.

La culture en chemostat, encore appelée culture continue, est une technique de propagation bactérienne mise au point et théorisée au début des années 50 par Jacques Monod, Aaron Novick et Leo Szilard (Monod, 1950 ; Novick and Szilard, 1950). Cette technique permet de propager des bactéries sur un grand nombre de générations en leur fournissant du milieu renouvelé à un débit constant. La culture s'opère dans un « bioréacteur » qui fournit aux bactéries aération, agitation ainsi qu'un système d'efflux du milieu afin de maintenir un volume constant (Figure 27). Dans le réacteur, la biomasse **N** est alors fonction du nombre de bactéries générées par division et de la quantité de bactéries évacuées par le système de pompage. Mathématiquement la variation de biomasse au cours du temps s'exprime comme telle :

$$\frac{dN}{dt} = \mu N - F \frac{N}{V}$$

avec μ = taux de croissance horaire en h^{-1} , F = vitesse d'efflux en $mL.h^{-1}$, et V = volume de culture en mL.

Dans un chemostat, le débit d'alimentation en milieu de culture neuf va donc contrôler la croissance des bactéries. Un des composants du milieu devenu limitant va empêcher la croissance au-delà d'une certaine densité bactérienne. Dans des conditions de ressources limitantes, un équilibre de biomasse va s'opérer dans le chemostat. La variation de biomasse au cours du temps sera donc nulle, ce qui mathématiquement se traduit par :

$$\frac{dN}{dt} = 0$$

Cet équilibre implique donc d'après l'équation (1) :

$$\mu N - F \frac{N}{V} = 0 \Leftrightarrow \mu = \frac{F}{V} = D$$

Dans un chemostat, le taux de croissance horaire μ des bactéries est donc constant et égal au taux de dilution D . Cette égalité est d'un intérêt particulier puisque le taux de dilution est un paramètre qui peut être modifié par l'expérimentateur. Autrement dit dans un chemostat, l'opérateur peut choisir, par l'intermédiaire du taux de dilution, la vitesse à laquelle les bactéries vont se diviser.

La technique de propagation en chemostat présente donc le même avantage que la technique de repiquage en batch à savoir que l'expérimentateur est en mesure de choisir la « vitesse » à laquelle les bactéries vont évoluer. En outre contrairement aux approches de culture discontinue, les bactéries inoculées en chemostat poussent à une vitesse constante dans un environnement contrôlé et à une densité de population contrôlée (Gresham and Dunham, 2014). L'expérience n'est donc pas affectée par les changements physiologiques liés aux transitions

métaboliques inhérentes à la culture en batch. Autre avantage de la culture en chemostat, les conditions de ressources limitantes vont stimuler la compétition entre bactéries et sélectionner les bactéries les mieux adaptées au contexte de l'expérience (Ferenci, 2008). Contrairement à la culture en batch, il n'y a donc aucun goulot d'étranglement et ce sont bien les populations les plus adaptées qui seront sélectionnées au cours de l'expérience.

Si la technique de culture en chemostat présente de nombreux avantages, elle possède néanmoins quelques inconvénients, son coût notamment. Le prix d'un bioréacteur selon son volume peut atteindre plusieurs milliers d'euros voire dizaine de milliers d'euros. En outre, le dispositif de culture nécessite un espace de travail non négligeable notamment lorsque plusieurs réplicats expérimentaux sont réalisés en parallèle. Ces dernières années plusieurs équipes ont mis au point des systèmes de chemostats miniatures et bon marché utilisables en laboratoire (Ferenci, 2008 ; Miller et al., 2013 ; Nanchen et al., 2006). Ces systèmes de chemostats miniatures bien que fonctionnels nécessitent des considérations techniques et une mise au point parfois longue. Autant de points qui font que l'usage des chemostats en laboratoire reste relativement anecdotique comparé à l'usage très répandu de la propagation en batch.

C. Comment faire le lien entre le phénotype et le génotype ?

Un des enjeux des approches d'évolution est d'être en mesure d'identifier les mutations ayant conduit à l'émergence de phénotypes évolués afin de comprendre les mécanismes adaptatifs à l'œuvre.

L'analyse des transcriptomes, bien qu'insuffisante pour expliquer finement les mutations impliquées, peut s'avérer informative. Une étude récente sur des bactéries *E. coli* propagées pendant 90 jours en présence d'antibiotiques (11 antibiotiques

testés) a permis de démontrer que le profil d'expression de 15 gènes était suffisant pour prédire la résistance d'une souche (Suzuki et al., 2014). Des travaux sur des souches de *E. coli* exposées à des concentrations sub-inhibitrices d'amoxicilline (β -lactamine) sur 100 générations ont également permis de corrélérer la résistance à des profils de gènes particuliers (Händel et al., 2013). Dans ces souches évoluées, de nombreux gènes impliqués dans la perméabilité membranaire, le transport actif et la tolérance des espèces à l'oxygène réactif, affichaient des profils d'expression significativement différents de ceux des souches sensibles.

Les techniques de séquençage à haut débit restent des approches de choix pour identifier les déterminants génétiques de l'évolution (Bryant et al., 2012 ; Köser et al., 2014). Elles permettent par exemple d'identifier précisément les mutations à l'origine des résistances. La résistance aux quinolones acquise par des souches de *E. coli* propagées en présence de norfloxacine a par exemple pu être corrélée à cinq événements génétiques précis (Lee et al., 2010). Ces événements incluent une mutation de résistance dans le gène *gyrB* (modification de cible), une délétion dans l'opérateur *marR* entraînant la dérégulation de l'opéron *marRAB*, une mutation dans le promoteur du gène *mdtK* codant une pompe d'efflux et des mutations dans les gènes *soxR* et *yciW* qui confèrent à la bactérie une meilleure tolérance au stress oxydatif. Des approches couplant évolution et séquençage haut débit sont également appliquées à l'étude des mutations compensatoires. Par exemple, l'analyse par séquençage de souches de *Mycobacterium tuberculosis* résistantes à la rifampicine propagées en absence de pression de sélection antibiotique a permis de mettre en évidence des mutations dans les gènes *rpoA* et *rpoC* permettant de réduire le coût biologique de la résistance (Comas et al., 2012).

Plus récemment le développement de techniques dites de **deep-sequencing** ouvre la voie à l'identification de mutations très rares. Ces techniques de séquençage à très haute profondeur de lecture permettent de mieux dissocier des événements rares du bruit de fond lié à la technique de séquençage employée. Dans une étude récente, une équipe démontre, par analyse de profils de mutations obtenus par deep-sequencing, que la présence d'ampicilline à des concentrations sub-inhibitrices favorise l'apparition de mutations de transition*, signe d'une sous-expression des protéines impliquées dans la réparations des mésappariements (Jee et al., 2016). De façon intéressante, la même analyse sur une souche sur-exprimant la catalase, une enzyme impliquée dans la réduction du stress oxydatif, ne montre aucune augmentation du taux de transition. Ces travaux suggèrent donc que la présence d'ampicilline à des concentrations sub-inhibitrices favorise la mutagénèse en générant un stress oxydatif qui induirait une sous expression des protéines impliquées dans la réparation des mésappariements. Au delà de la simple identification de mutations, les approches de séquençage peuvent donc aussi renseigner sur des mécanismes plus fins impliqués dans la dynamique d'évolution des populations bactériennes.

D. Ce que nous apprend l'évolution expérimentale.

1. Plusieurs réponses à un stress donné.

La plupart du temps, les expériences d'évolution démontrent qu'il n'existe pas une seule et unique réponse adaptative à un stress donné (Palmer and Kishony, 2013). Bien que l'évolution converge vers la meilleure solution adaptative, le chemin pour y parvenir n'est pas prédéfini. Bien au contraire, plusieurs événements génétiques sont en mesure d'améliorer le fitness des bactéries. Si l'on représente

* substitution d'une purine par une autre purine ou d'une pyrimidine par une autre pyrimidine

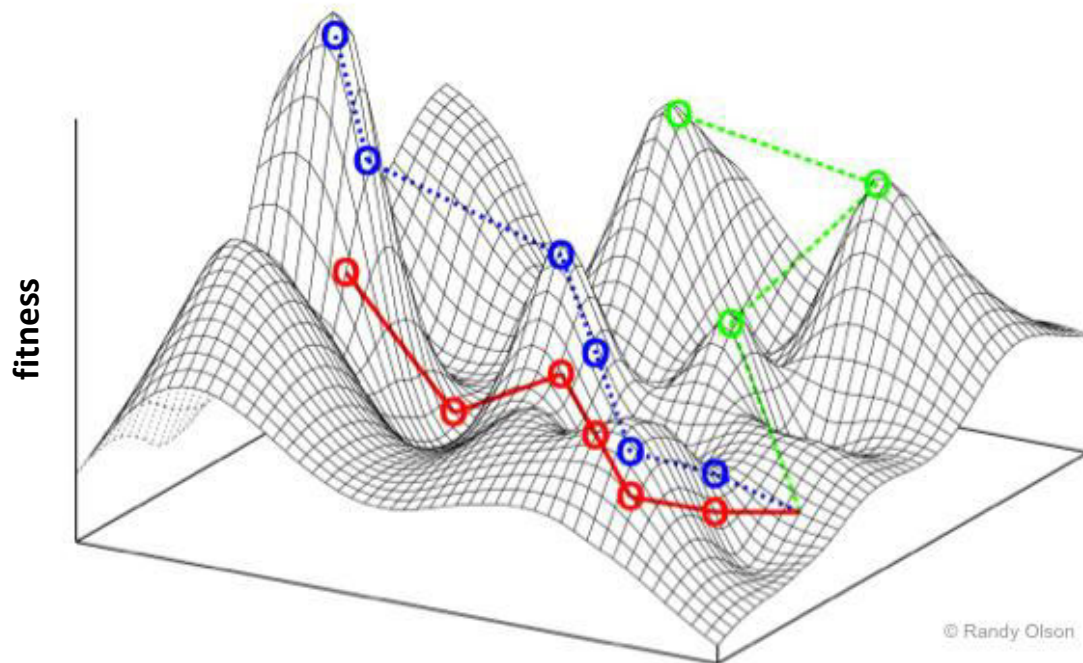


Figure 28 : Illustration du paysage adaptatif ou « fitness landscape » d'une bactérie.

Propriété de Randy Olson

A chaque mutation aléatoire, une bactérie progresse dans son paysage adaptatif. L'évolution tend à faire converger les bactéries vers la meilleure solution adaptative représentée par le plus haut pic de fitness. Dans l'exemple ci-dessus, le répliat isogénique en bleu est en passe d'atteindre ce sommet. Chacun des autres répliat a suivi son propre chemin le long de ce paysage adaptatif.

conceptuellement le fitness d'une bactérie en fonction de ses possibilités d'adaptation sur un graphique en 3 dimensions, les différentes réponses adaptatives de la bactérie se traduisent par un paysage vallonné composé de « monts » qualifiés en anglais de « **fitness landscape** » (Figure 28). Dans ce paysage vallonné, la meilleure réponse adaptative correspond au sommet le plus haut. L'évolution tend à faire converger les bactéries vers ce sommet. Toutes les bactéries n'atteindront pas forcément ce sommet, se contentant d'un sommet un peu moins haut rencontré en chemin. L'équipe de Roy Kishony a beaucoup contribué à l'illustration de ce concept. En faisant évoluer en parallèle cinq souches isogéniques de *E. coli* en présence de différents antibiotiques, ils ont pu mettre en évidence par séquençage des réponses adaptatives différentes dans les réplicats expérimentaux cultivés en présence de chloramphénicol ou de doxycycline (Toprak et al., 2012). Bien que toutes les trajectoires évolutives convergent vers une augmentation de la résistance, les combinaisons de mutations de résistance dans chacun des réplicats étaient différentes. Dans une expérience très récente, cette équipe a aussi mis au point un dispositif de culture permettant de visualiser, spatialement et en temps réel, les différentes trajectoires évolutives d'une population bactérienne (Baym et al., 2016). Dans cette expérience, des bactéries sont inoculées sur de l'agar solide contenant un gradient spatial d'antibiotique et recouvert de gélose molle. Les bactéries vont localement épuiser les ressources nutritives et se déplacer par chimiotaxie vers une nouvelle région riche en nutriments. A mesure qu'elles vont se propager, les bactéries vont être confrontées à des concentrations croissantes d'antibiotique. Elles ne pourront donc se développer plus loin que si elles s'adaptent à ces pressions croissantes de sélection. Le suivi en temps réel de la culture par le biais d'un dispositif d'enregistrement vidéo ainsi que des analyses phénotypiques et

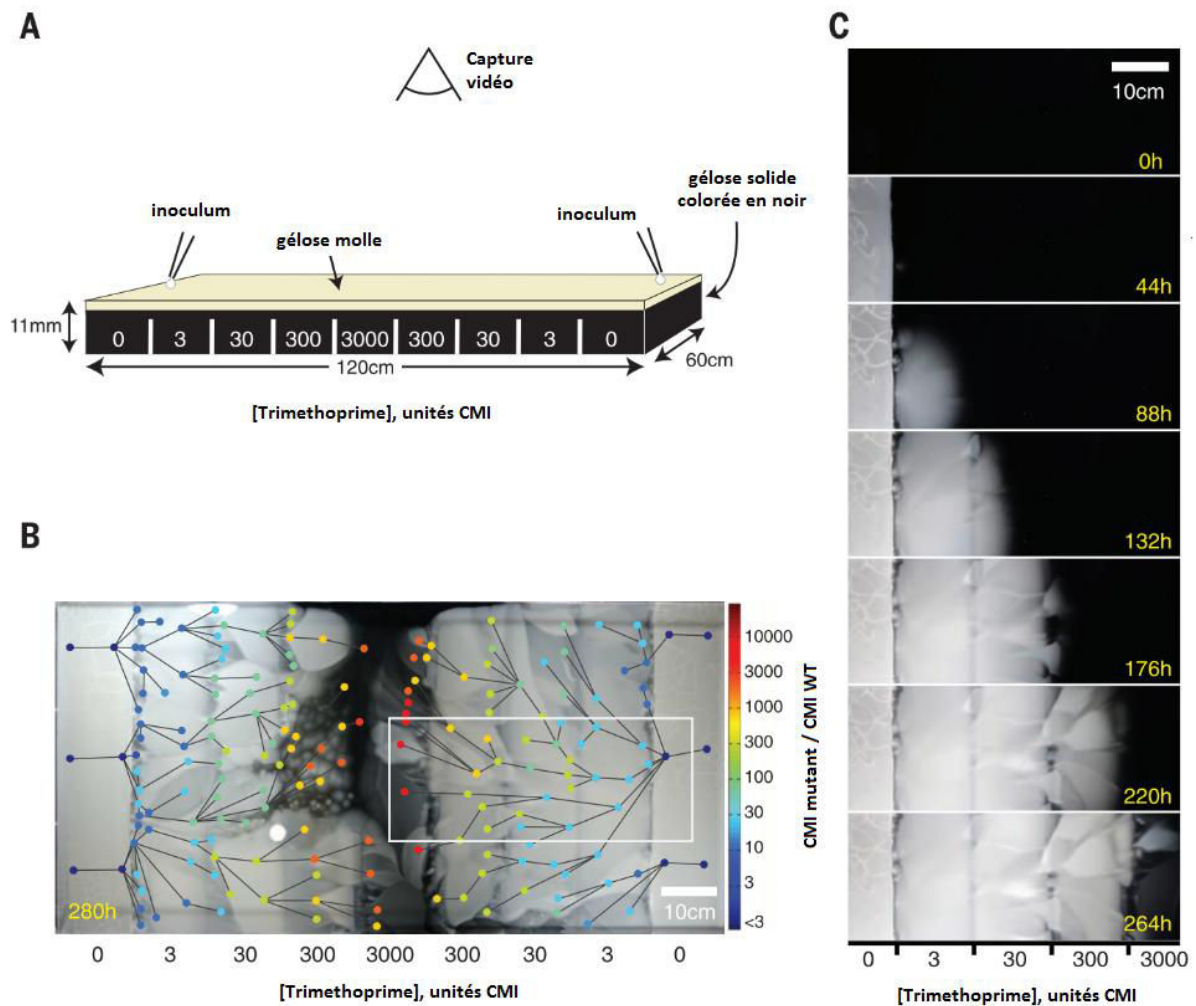


Figure 29 : Trajectoire évolutive des bactéries résistantes dans un environnement spatialement structuré. D'après Baym et al., 2016

A. Dispositif expérimental.

Le gradient de concentration de triméthoprine croit de l'extérieur vers l'intérieur. La gélose solide est colorée en noir pour faciliter la visualisation des bactéries se déplaçant dans la gélose molle.

B. Résultat de l'expérience après 12 jours de croissance.

Les points représentent les différents prélèvements de bactéries. Les lignes reliant un prélèvement à un autre sont déduites des analyses vidéo et génotypique des bactéries.

C. Images issues du dispositif de capture vidéo.

génomiques ont ensuite permis de retracer le chemin suivi par chaque population bactérienne (Figure 29). Bien que l'adaptation fasse converger les bactéries vers des phénotypes de haute résistance, la dynamique spatiale, temporelle et mutationnelle pour y parvenir est différente d'un réplicat à l'autre.

Cette part d'imprévisibilité a pour principale origine le caractère aléatoire des mutations. Les mutations sont générées au hasard des erreurs des ADN polymérases et sont par conséquent difficiles à anticiper. Ce phénomène a trait à ce que l'on nomme la **dérive génétique**. Au-delà de ça, des phénomènes plus complexes d'épigénétiques peuvent également être à l'œuvre. Un exemple de ce phénomène réside dans l'apparition de mutants capables de métaboliser le citrate lors de l'expérience de Lenski. En essayant de « rejouer » l'évolution de cette innovation à partir d'ancêtres isolés à différents moments de l'expérience, Zachary Blount se rend compte que la caractéristique Cit⁺ est plus encline à apparaître à partir de bactéries ayant déjà évolué sur plus de 20000 générations (Blount et al., 2012). Il y a donc eu un événement génétique particulier qui a potentialisé l'émergence du caractère Cit⁺. En outre, la dynamique d'évolution d'une population peut également être bouleversée par l'émergence de phénotypes dits hypermutateurs qui présentent un taux de mutation anormalement élevé. Ces phénotypes impliquent le plus souvent des mutations impactant la réparation de l'ADN ou l'activité de correction de certaines ADN polymérases. Ces populations souvent rencontrées dans le cadre d'expériences d'évolution (Baym et al., 2016 ; Sniegowski et al., 1997) ont leur fitness réduit au profit d'une meilleure évolutivité. Du fait de leur taux accru de mutation, ces populations auront néanmoins une dynamique d'évolution particulière.

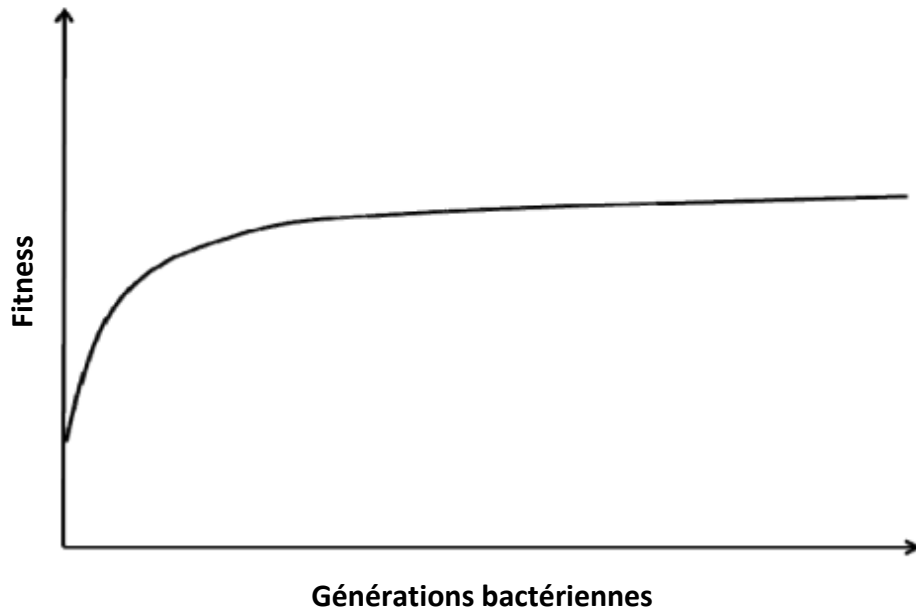


Figure 30 : Représentation simplifiée de la dynamique adaptative d'une population bactérienne dans un milieu homogène. D'après Lenski et Travisano, 1994

Tous ces phénomènes concourent à rendre l'évolution difficile à anticiper. C'est donc vers l'analyse des traits convergents de l'évolution qu'il faut se tourner pour appréhender les principes moteurs de l'adaptation.

2. Dynamique temporelle de l'adaptation.

Les expériences d'évolution nous apprennent que les mutations les plus bénéfiques apparaissent généralement tôt, souvent lors des premières centaines de générations (Wiser et al., 2013) qu'il s'agisse de mutations de résistance ou de mutations compensatoires. Ces mutations à haut potentiel adaptatif permettent à l'hôte d'améliorer rapidement son fitness en réponse à une pression environnementale donnée. L'évolution se poursuit ensuite avec de nouvelles innovations qui vont améliorer graduellement le fitness de la bactérie par petits incréments (Figure 30).

3. Et la résistance dans tout ça ?

La plupart des études mentionnées précédemment démontrent que les pressions de sélections antibiotiques sont capables de favoriser l'émergence et la propagation de la résistance (Baym et al., 2016 ; Jee et al., 2016 ; Lee et al., 2010 ; Suzuki et al., 2014 ; Toprak et al., 2012), notion à mettre en perspective avec l'effet mutagène de certains antibiotiques (voir chapitre précédent).

Au delà de cette observation, les études d'évolution ont aussi permis de mieux comprendre pourquoi la résistance se maintient en dépit de coûts parfois non négligeables.

En ce qui concerne les mutations de résistance chromosomique, la majorité des travaux démontre qu'il est plus rare de réverser la mutation que de la compenser (Comas et al., 2012 ; Schrag and Perrot, 1996). Ceci s'explique notamment par le fait

que la réversion implique un événement de mutation précis alors que la compensation peut impliquer différents événements génétiques (Andersson and Hughes, 2010).

Le maintien des plasmides de résistances a lui aussi longtemps posé question à tel point qu'on parle souvent d'un « paradoxe du plasmide ». En absence de pression de sélection les plasmides devraient être perdus en raison de leur coût tandis qu'en présence d'antibiotique la meilleure réponse adaptative serait d'intégrer les gènes de résistance au niveau du chromosome bactérien et de se débarrasser des plasmides alors devenus obsolètes (MacLean and San Millan, 2015). Une solution à ce paradoxe serait de considérer seulement les plasmides comme des « parasites » qui voyageraient d'un hôte à l'autre avant d'être perdus. Cette hypothèse suppose néanmoins un taux de conjugaison important, capacité dont la majorité des plasmides sont dépourvus (Bergstrom et al., 2000). Cette hypothèse est donc insuffisante pour expliquer la persistance des plasmides à long terme. Ce sont donc principalement des phénomènes de co-évolution entre l'hôte et son plasmide qui vont favoriser le maintien de ce dernier (Harrison and Brockhurst, 2012). Co-évolution car non seulement le plasmide s'adapte à son hôte mais réciproquement l'hôte s'adapte pour maintenir un plasmide avantageux ou non dans certaines conditions. Des mutations dans les gènes *gacA* et *gacS* de l'hôte sont par exemple responsables d'une nette diminution du coût plasmidique (Harrison et al., 2015). Le plasmide peut lui aussi s'adapter en perdant ou réduisant sa capacité à conjuguer (Dahlberg and Chao, 2003) ou encore en perdant certains gènes coûteux (Modi et al., 1991).

A retenir :

L'évolution expérimentale permet dans le cadre d'expériences contrôlées de tester des hypothèses sur la dynamique évolutive des populations bactériennes.

En propageant des bactéries sur de longues générations en batch ou en chemostat, il est désormais possible grâce à des techniques de transcriptomiques et génomiques toujours plus puissantes d'appréhender les modifications adaptatives directement à l'échelle du génome.

Bien que l'évolution soit liée à des phénomènes aléatoires, la distinction des caractères convergents de l'évolution de la simple dérive génétique a permis d'apporter des réponses.

Ces réponses ont tout d'abord permis de préciser la dynamique temporelle de l'adaptation dans laquelle les mutations les plus avantageuses apparaissent tôt.

Ces études ont également permis de montrer à plusieurs reprises que les pressions de sélection antibiotiques sont capables de favoriser l'émergence et la propagation de la résistance. En outre, elles ont aussi permis de préciser les modalités de certains mécanismes de compensation parmi lesquels la co-évolution d'un plasmide et son hôte.

Chapitre 3 - Modèle d'étude : les intégrons de multirésistance

Durant les années 80, le séquençage de différents EGM va révéler l'existence de fortes similitudes entre transposons et plasmides porteurs de gènes de résistance (Cameron et al., 1986 ; Hall et Vockler, 1987). Dans ces EGM, les gènes de résistance bien que différents sont pourtant précédés en 5' d'une séquence conservée. Quelques années plus tard, Hatch Stokes et Ruth Hall démontrent que cette plateforme conservée, qu'ils baptisent intégron, est capable de capturer et d'exprimer des gènes de résistance sous forme de cassettes (Stokes et Hall, 1989). Deux grandes familles d'intégrons ont par la suite été définies :

- Les intégrons de multirésistance (IM), ou intégrons mobiles (Nivina et al., 2016), portant un nombre limité de cassettes codant le plus souvent pour des résistances aux antibiotiques. Véhiculés par des plasmides ou transposons, les IM jouent un rôle majeur dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques.
- A l'inverse les intégrons chromosomiques sédentaires (SCI) (Nivina et al., 2016) jusqu'alors appelés super-intégrons sont des intégrons strictement chromosomiques et peuvent arborer jusqu'à 200 cassettes souvent de fonction inconnue. Ils constituent un réservoir important de gènes adaptatifs, permettant aux bactéries de mieux répondre à divers stress environnementaux.

La suite de ce travail portera exclusivement sur les intégrons de multirésistance (IM).

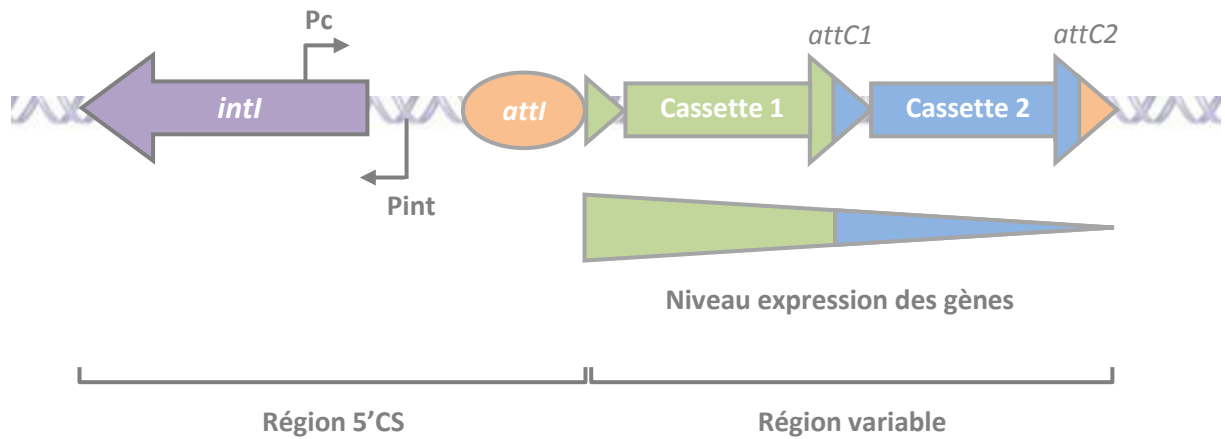


Figure 31 : Organisation fonctionnelle d'un intégron.

Un intégron se compose d'une plateforme fonctionnelle, nommée 5'CS, et d'une partie variable contenant des cassettes. La 5'CS se compose de 3 éléments clés : le gène *intI* qui code pour une intégrase, un site de recombinaison *attI* où sont insérées les cassettes et enfin un promoteur *Pc* qui assure l'expression des cassettes. Le niveau d'expression d'une cassette est fonction de sa distance avec le *Pc* : plus la cassette est proche du *Pc* plus son niveau d'expression est élevé. Une cassette se compose d'un cadre ouvert de lecture encodant le plus souvent une résistance à un ou des antibiotique(s) et d'un site de recombinaison *attC* indispensable à l'insertion ou l'excision d'une cassette dans l'intégron. Il existe environ 130 cassettes différentes encodant des résistances à la quasi-totalité des familles d'antibiotiques.

I. Les IM : une plateforme fonctionnelle contenant 3 éléments clés.

Stricto-sensu, un intégron se résume à la présence d'une plateforme fonctionnelle, appelée région 5' conservée (5'CS). Cette région 5'CS contient trois éléments clés (Figure 31) :

- Un gène *intl* qui code une intégrase Intl responsable de la capture et de l'insertion des cassettes.
- Un site spécifique de recombinaison, appelé site *attI*, qui sert de point d'insertion aux cassettes.
- Un promoteur *Pc* permettant l'expression des gènes contenus dans les cassettes.

A. Le gène *intl* et la protéine Intl.

Transcrit à partir du promoteur *Pint*, le gène *intl* code une protéine appartenant à la famille des recombinases à tyrosine spécifique de site : l'intégrase Intl (Nunes-Düby et al., 1998). Cette protéine dont la mécanistique sera développée ultérieurement est la clé du système intégron. C'est elle qui lui confère sa plasticité si particulière (voir paragraphe IV).

Outre son importance mécanistique, la séquence de la protéine Intl est à la base de la classification des intégrons. Chez les IM, cinq classes sont à distinguer dont trois d'intérêt clinique :

- Les IM de classe 1 (IM1), codant l'intégrase Intl1, protéine de 337 acides aminés.

Table 4 : Pourcentage d'identité (en rouge) et de similarité (en vert) entre les séquences protéiques des intégrases de classe 1, 2 et 3. D'après Hall, 1999

Intégrases	IntI1	IntI2	IntI3
IntI1	100	46,5	59,6
IntI2	63	100	46,3
IntI3	72,8	59,7	100

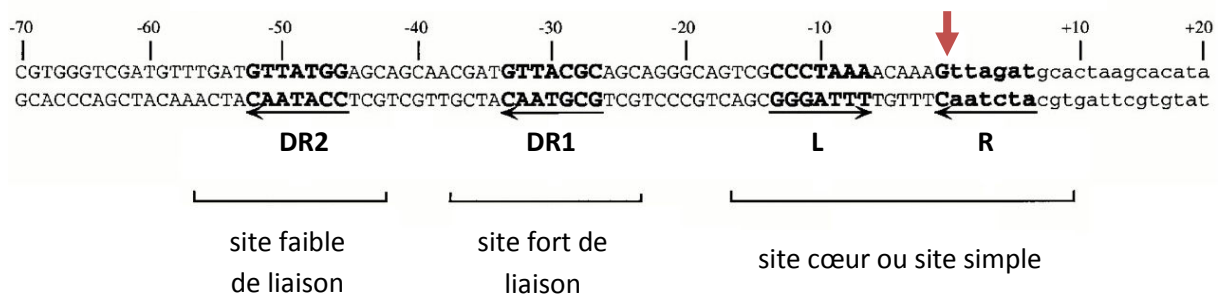


Figure 32 : Structure du site attI. D'après Partridge *et al.* 2000

Le site *attI* contient quatre points de liaison à l'intégrase. Les boîtes L et R constituent le « site cœur » ou « site simple » de liaison. La présence de ces deux boîtes est indispensable à l'activité de l'intégrase. Les boîtes DR1 et DR2 ne sont pas nécessaires à l'activité catalytique de la protéine mais en renforcent l'efficacité. Elles piègent l'intégrase à proximité du site cœur grâce à leur plus ou moins forte affinité pour IntI. Les flèches horizontales indiquent l'orientation des sites de liaison.

La réaction de recombinaison a lieu dans la boîte R au niveau du motif conservé GTT (flèche rouge).

- Les IM de classe 2 (IM2), codant l'intégrase IntI2, protéine de 178 acides aminés, le plus souvent non fonctionnelle du fait d'un codon STOP prématuré dans le gène *intl2* (Hansson *et al.*, 2002).
- Les IM de classe 3 (IM3), codant l'intégrase IntI3, protéine de 346 acides aminés.

Les séquences protéiques de ces intégrases présentent une forte similitude avec 40 à 60% d'identité protéique (Hall, 1999) (Table 4).

B. Le site de recombinaison *attI*.

Le site *attI* est reconnu spécifiquement par la protéine IntI et sert de point d'insertion aux cassettes. Composé à minima de 63 paires de base, la séquence du site *attI* varie fortement d'une classe d'intégron à l'autre. A chaque classe d'intégron correspond son site *attI* (Collis *et al.*, 1998).

Bien qu'ayant des séquences variables, les sites *attI* possèdent un motif conservé de 7 pb, nommé boîte R, de consensus GTTRRRY (R : Purine, Y Pyrimidine) (Figure 32). Avec la boîte L, la boîte R constitue un site dit « site simple » ou « site cœur » de liaison à la protéine IntI (Collis *et Hall*, 2004). Deux autres sites de fixation à la protéine IntI1, baptisés DR1 et DR2, sont également présents (Gravel *et al.*, 1998) (Figure 32). Non indispensables à l'activité de IntI1, DR1 et DR2 augmentent néanmoins son efficacité (Partridge *et al.*, 2000) en permettraient de piéger la protéine IntI à proximité du « site cœur » favorisant ainsi l'interaction entre IntI et la boîte R où a lieu la recombinaison, entre le G et le premier T (Figure 32).

Chaque intégrase IntI présente une forte spécificité pour son site *attI* associé mais restent néanmoins capables de reconnaître et recombiner les sites *attI* d'autres

classes d'IM avec une efficacité moindre. L'intégrase IntI1, bien que plus efficace sur le site *attI1*, peut par exemple recombinaison avec les sites *attI2* et *attI3* (Collis et al., 2002).

C. Le promoteur Pc.

Sauf exceptions, les cassettes de gènes insérées dans la partie variable de l'intégron ne contiennent pas de promoteur propre. Leur expression est donc assurée par le promoteur Pc situé dans la région 5'CS des intégrons (Figure 31, page 79).

A ce jour la région promotrice la mieux caractérisée est celle des IM1. Dans cette classe le promoteur Pc est localisé dans la séquence codante du gène *intI1*, environ 200 bases en amont de la première cassette. Ce promoteur est soumis à un polymorphisme important. Différents variants de Pc, de forces différentes, existent (Papagiannitsis et al., 2009 ; Jové et al, 2010). Cette diversité sera développée dans une partie dédiée (voir paragraphe III).

Chez les IM2, le promoteur Pc est situé au sein du site *attI*. Sa séquence a pu être déterminée par des approches combinées de séquençage et 5'RACE sur des souches de *K. pneumoniae* (da Fonseca et al., 2011). Chez les IM3, le promoteur Pc est localisé dans la séquence du gène *intI3*. A ce jour, quatre variants de Pc d'IM3 ont été décrits mais sont encore mal caractérisés.

A retenir :

Un IM est une plate-forme de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes. La capture se fait par l'intermédiaire d'une recombinase encodée dans l'intégron, la protéine IntI. L'insertion d'un nouveau gène est réalisée par recombinaison au niveau d'un site spécifique, le site *attI*. Une fois insérés, les gènes sont exprimés par l'intermédiaire du promoteur Pc.

Selon la séquence protéique de l'intégrase IntI, différentes classes d'intégrons ont été définies. Les classes 1, 2 et 3 sont les plus étudiées car souvent impliquées en clinique.

II. Les cassettes : la partie variable de l'intégron.

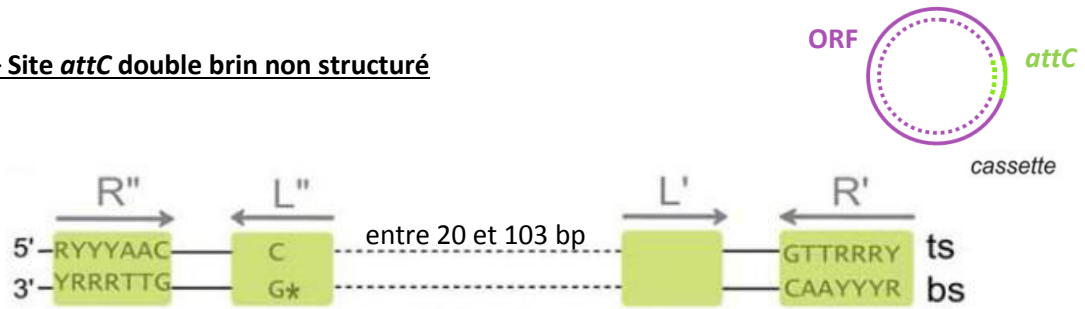
Insérées en aval de la plateforme 5'CS, les cassettes constituent la partie variable de l'intégron (Figure 31, page 79). Une cassette est composée d'un cadre ouvert de lecture (ORF) et d'un site de recombinaison *attC* reconnu par l'intégrase IntI. Sous forme linéaire lorsqu'elles sont insérées au sein des intégrons, les cassettes se présentent, à l'état libre, sous forme d'unités circulaires non répliquatives et mobilisables (Collis et Hall, 1992). Chez les IM, les cassettes sont généralement présentes en nombre limité, deux ou trois en moyenne (Partridge et al., 2009). Des réseaux plus complexes contenant jusqu'à dix cassettes ont toutefois été décrits (GenBank : KC170993). A l'inverse certains IM ne portent aucune cassette (Bissonnette et Roy, 1992).

A. Les cassettes, un réservoir de gènes de résistance.

La majorité des gènes contenus dans les cassettes code une résistance à un ou des antibiotiques. En 2009, une revue fait état de plus de 130 cassettes différentes codant la résistance aux antibiotiques (Partridge et al., 2009). La plupart des familles d'antibiotiques sont concernées : β -lactamines, aminosides, triméthoprime, chloramphénicol, fosfomycine, macrolides, rifampicine mais aussi quinolones.

Certaines cassettes contiennent également des gènes de fonction inconnue dites cassettes *gcu* (gene of unknown function).

A – Site *attC* double brin non structuré



B – Structuration du site *attC* : apparition d'un motif cruciforme composé de deux motifs « tige-boucle » simple brin

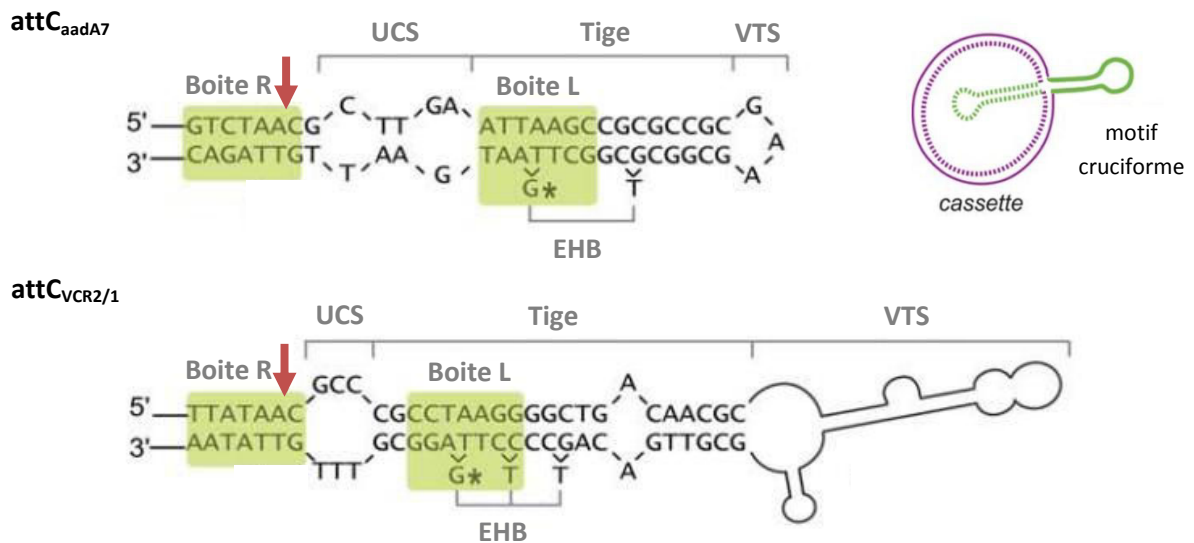


Figure 33 : Structure des sites de recombinaison *attC*. D'après Escudero *et al.* 2015

A- Site *attC* double brin non structuré.

Présence de deux séquences inversées répétées R''-L'' et L'-R'. En s'appariant sous forme simple brin, ces séquences inversées répétées vont conduire à la structuration du site *attC*. Dans la représentation de la cassette circulaire, le brin en pointillé représente le brin du haut (top strand ou ts) tandis que le brin du bas (bottom strand ou bs) est représenté en trait continu.

B- Structuration du site *attC* : apparition d'un motif cruciforme composé de deux motifs « tige-boucle » simple brin. Exemples des sites *attC_{aadA7}* et *attC_{VCR2/1}*.

Une fois structuré sous forme simple brin, le site *attC* présente deux boîtes R et L qui seront reconnues par la protéine IntI. La réaction de recombinaison aura lieu dans la boîte R entre le deuxième A et le C du motif AAC conservé (flèche rouge). La recombinaison s'opère sur le brin du bas (bs) plus recombinogène.

Trois éléments structuraux importants sont à remarquer :

- la tige qui contient des bases dites extra-hélicoïdales ou EHB issues de mésappariement entre les séquences inversées répétées
- la région UCS (Unpaired Central Spacer) comprise entre les boîtes R et L
- la boucle ou région VTS (Variable Terminal Structure) de taille et de structure variable

L'importance de ces 3 structures sera détaillée ultérieurement (voir paragraphe IV)

B. Le site *attC*, un site indispensable à la mobilité des cassettes.

Chaque cassette possède un site *attC* spécifique, reconnu par l'intégrase, qui va permettre, par recombinaison avec un site *attI*, sa capture au sein de l'intégron (voir paragraphe IV).

Bien que n'ayant que très peu d'identité de séquence, les sites *attC* possèdent une organisation palindromique conservée (Hall et al., 1991) constituée de deux séquences inversées répétées, dites R''-L'' et L'-R'(Figure 33-A) encadrant une région de taille et séquence variable (Stokes et al., 1997). Grâce à ces séquences inversées répétées, un site *attC* sous forme simple brin va adopter une structure secondaire cruciforme de type « tige-boucle » (Figure 33-B). Cette structure secondaire « tige-boucle » sera reconnue par l'intégrase IntI et servira de substrat à la réaction de recombinaison (Francia et al., 1999 ; Johansson et al., 2004). Récemment, il a aussi été montré que l'intégrase pouvait se fixer sur des sites *attC* non totalement structurés (Loot et al., 2014).

Une fois fixée, l'intégrase va catalyser des événements de recombinaison mettant en jeu les sites R'' et R'. Ces deux sites sont constitués de 7pb de consensus RYYAAC et GTTRRRY (R : purines, Y : pyrimidine) dont des résidus conservés 5'-AAC-3' et 5'GTT3' (Stokes et al., 1997). Une fois structurées, les boîtes R'' et R' reconstituent une boîte R fonctionnelle contenant un triplet AAC conservé. La recombinaison a lieu dans ce triplet, entre le A et le C (Figure 33) (Bouvier et al., 2009) sur le brin anti-sens du site *attC* permettant ainsi la correcte insertion des cassettes dans l'intégron afin qu'elles soient exprimées *via* le promoteur Pc (Nivina et al., 2016).

Ce système de reconnaissance mettant en jeu des sites reconnus non pas sur la base de leur séquence mais sur la base de leur structure secondaire explique comment l'intégrase IntI peut reconnaître et recombinaison autant de sites *attC* de séquence différente.

A retenir :

Les cassettes sont des unités fonctionnelles composées d'une ORF et d'un site de recombinaison *attC*. L'ORF contient le plus souvent un gène de résistance à un ou des antibiotique(s). La majorité des familles d'antibiotiques est concernée. Aussi, une bactérie portant un IM pourra potentiellement résister à de nombreux antibiotiques à condition de capturer la cassette adéquate.

La capture des cassettes est rendue possible grâce au site *attC* spécifiquement reconnu par l'intégrase IntI. Une recombinaison entre le site *attC* d'une cassette mobile conduit à l'insertion de la cassette en aval du promoteur *Pc* afin d'y être exprimée.

Table 5 : Principaux variants de promoteurs Pc des IM de classe 1. D'après Jové *et al.* 2010

Variant Pc	Séquence nucléotidique	Fréquence	Force relative
PcW	TGGACA-N₁₄-TCNTAAGCT	16,5%	1
PcH1	TGGACA-N₁₄-TCNTAAACT	28%	6
PcW_{TGN-10}	TGGACA-N₁₄-T<u>G</u>NTAAGCT	16,8%	18
PcH2	TTGACA-N₁₄-TCNTAAGCT	4,4%	20
PcS	TTGACA-N₁₄-TCNTAAACT	24,3%	25

Les boîtes -35 et -10 du promoteur sont représentées en gras. La base G du motif TGN du PcW_{TGN-10} est soulignée. Les valeurs des fréquences ont été obtenues suite à une analyse *in silico*. La force des variants est rapportée à celle du Pc le plus faible, le PcW. PcW (Pc Weak), PcH1 (Pc Hybride 1), PcW_{TGN-10} (PcW avec une région TGN dans la boîte -10), PcH2 (Pc Hybride 2) et PcS (Pc Strong).

III. Paramètres influençant l'expression des gènes contenus dans les cassettes.

Comme mentionné précédemment, les cassettes sont généralement dépourvues de promoteur et sont exprimées par le promoteur Pc situé dans la région 5'CS des intégrons. Lorsque plusieurs cassettes sont présentes, ces dernières sont co-transcrites, comme dans un opéron, à partir de Pc (Stokes et Hall, 1989). Si ce postulat de départ semble simple, de nombreux paramètres vont pourtant conditionner l'expression des cassettes.

A. La force du promoteur Pc.

Chez les IM1, 13 variants de Pc ont été décrits sur la base de variations dans leurs boîtes « -35 » et « -10 » et sur la présence d'un motif « -10 étendu » (motif TGN localisé en amont de la boîte « -10 » améliorant l'efficacité de transcription) (Burr et al., 2000 ; Jové et al., 2010). Même si la majorité de ces promoteurs n'a été décrite qu'occasionnellement, cinq d'entre eux sont retrouvés plus fréquemment : PcW, Pch1, PcW_{TGN-10}, Pch2 et PcS (Table 5).

La force relative de ces variants est fonction de leur degré d'identité avec la séquence consensus reconnue par le facteur de transcription σ^{70} chez *E. coli*. Plus la séquence du promoteur est proche de la séquence consensus TTGACA-N₁₇-TATAAT, plus le niveau d'expression des gènes en aval est important. Par ordre croissant de force, on distingue donc le PcW, le Pch1, le PcW_{TGN-10}, le Pch2 et enfin le PcS. A titre indicatif le PcS est 25 fois plus fort que le PcW (Jové et al., 2010).

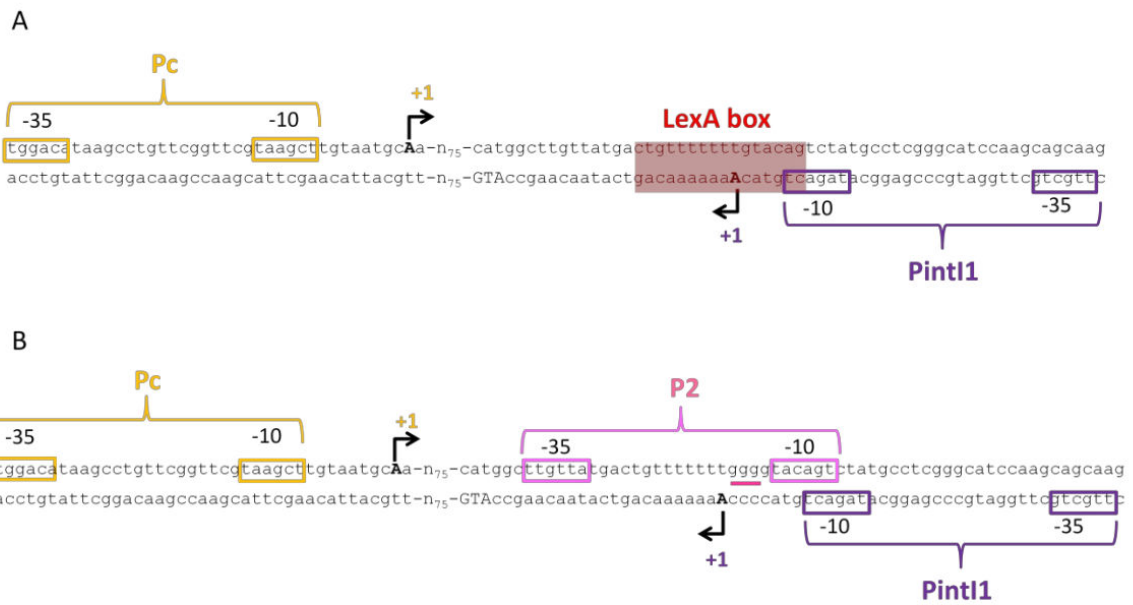


Figure 34 : Organisation de la région promotrice des IM de classe 1.

A- En absence du promoteur P2.

Les éléments -10 et -35 sont encadrés en violet pour Pint1 et en jaune pour Pc. Les +1 de transcription sont indiqués par une flèche et en gras. Le codon d'initiation de la traduction de l'intégrase est indiqué en caractères majuscules. Le site de fixation de LexA est encadré en rouge. L'intérêt de ce site particulier sera détaillé dans le paragraphe V.

B- En présence du promoteur P2

Les éléments -35 et -10 sont encadrés en rose pour P2. Les 3 G insérés créant le promoteur P2 sont soulignés en rose ; cette insertion inactive le site de fixation de LexA. (Guérin, Jové *et al.*, 2010).

Ainsi, la force du variant Pc va directement impacter les niveaux d'expression des gènes de résistance. Plus le Pc sera fort, plus le niveau d'expression des cassettes sera élevé et plus le niveau de résistance sera augmenté.

Chez environ 10% des IM1, le promoteur Pc peut être associé à un second promoteur, le promoteur P2 localisé au sein du site *attI* (Figure 34). L'insertion de 3 G entre deux boîtes -10 et -35 potentielles (Collis et Hall, 1995), crée un espace suffisant entre les 2 boîtes pour rendre le promoteur fonctionnel. Il est plus souvent associé au PcW pour lequel il améliore nettement l'efficacité de transcription (Jové et al., 2010).

B. La position de la cassette.

Des travaux ont permis de démontrer l'influence de la position d'une cassette sur son niveau d'expression (Collis et Hall, 1995). Plus la cassette est proche du promoteur Pc, plus son niveau d'expression est élevé. (Figure 31, page 79).

En 2009, une étude démontre que cette atténuation est liée à la structuration du transcrite d'ARN en « tige-boucle » au niveau des sites *attC*. Cette structuration affecterait la progression du ribosome le long des transcrits au cours de la traduction (Jacquier et al., 2009). Ainsi, les ribosomes ont moins de chance d'atteindre et de traduire la séquence codante des cassettes les plus éloignées.

C. Les signaux internes de traduction.

Une fois co-transcrites, la traduction des ARN est initiée à partir de régions d'initiations de la transcription (TIR) contenue dans chaque cassette. Une TIR est constituée d'un site de fixation au ribosome (RBS) de consensus AAGGA espacé de quelques nucléotides d'un codon d'initiation de la traduction. Néanmoins, toutes les

cassettes ne disposent pas d'une bonne TIR (Hanau-Berçot et al., 2002). En effet, selon la séquence du RBS les ribosomes sont plus ou moins bien recrutés et démarrent plus ou moins facilement la traduction (Laursen et al., 2005). Des cassettes portant une TIR inefficace seront donc difficilement traduites.

Néanmoins, un grand nombre d'IM1 possède, à l'extrémité 3' de leur site *attI*, un cadre ouvert de lecture, baptisée *orf11*, précédé d'une TIR efficace (GGAG-N₈-ATG) et terminé par un codon STOP apporté par la première cassette. Il a été proposé un modèle de couplage traductionnel dans lequel une partie des ribosomes recrutés par le RBS de *orf11*, après avoir traduit *orf11*, ré-initie une traduction au niveau du gène contenu dans la première cassette (Hanau-Berçot et al., 2002). L'*orf11* serait ainsi en mesure d'améliorer l'efficacité de traduction d'une cassette possédant une TIR peu efficace à condition qu'elle soit située en première position dans le réseau.

A retenir :

Une fois la cassette de résistance insérée dans l'intégron, son expression est conditionnée par sa transcription puis sa traduction. La transcription de la cassette est principalement influencée par la force du variant Pc. Plus le promoteur est fort, plus le phénotype de résistance est important. Dans certain cas, la présence d'un promoteur secondaire P2 peut améliorer l'efficacité de transcription des gènes de résistance.

La bonne traduction des cassettes est quant à elle conditionnée à la présence d'une région d'initiation de la transcription (TIR) efficace.

La position de la cassette dans le réseau est également déterminante. De fait, les cassettes sont toutes co-transcrites par le Pc en un seul transcrit. Malheureusement la structuration de l'ARN au niveau des sites *attC* va perturber le transit des ribosomes. Plus une cassette sera éloignée dans le réseau, moins elle aura de chance d'être traduite.

Pour être bien exprimée, une cassette a donc tout intérêt à être en première position.

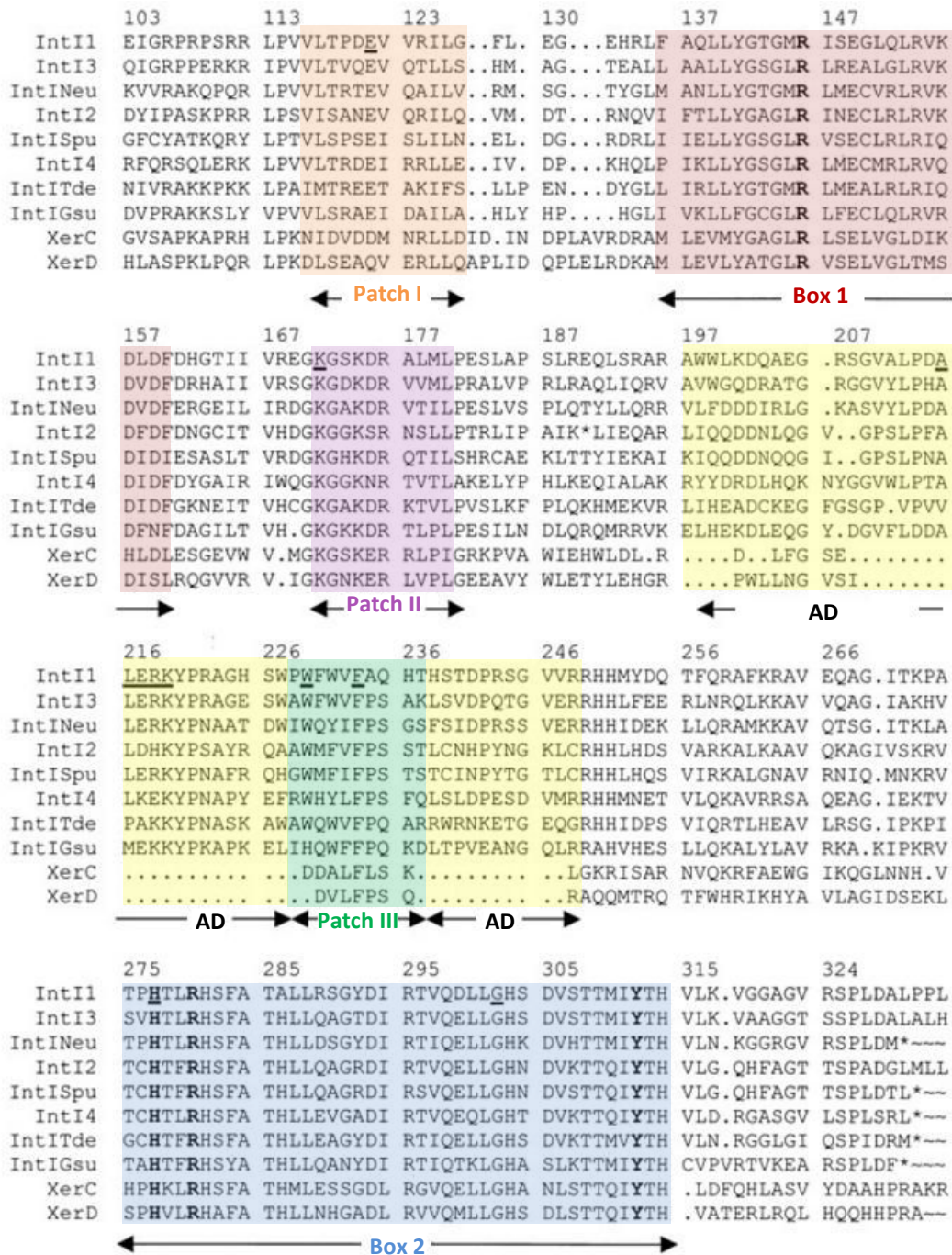


Figure 35 : Alignement des domaines C-ter de recombinases à tyrosine. D'après Messier et Roy, 2001

IntI1 : intégrase des IM1, IntI2 : intégrase des IM2, IntI3 : intégrase des IM3, IntI4 : intégrase des IM4, IntINeu : intégrase d'un intégron de *Nitrosomonas europaea*, IntISpu : intégrase d'un intégron de *Shewanella putrefaciens*, IntITde : intégrase d'un intégron de *Treponema denticola*, IntIGsu : intégrase d'un intégron de *Geobacter sulfurreducens*, XerC : recombinase à tyrosine de *E. coli*, XerD : recombinase à tyrosine de *E. coli*. Les alignements révèlent la présence de deux boîtes conservées, box 1 (rouge) et box 2 (bleu), contenant les acides aminés catalytiques (en gras). Trois autres domaines conservés, les patches I, II et III (respectivement en orange, violet et vert) servent à la structuration du domaine catalytique. Un domaine supplémentaire (AD en jaune), présent uniquement chez les intégrases d'intégron, est responsable de l'activité catalytique particulière de ces dernières.

IV. Un réseau de cassettes dynamique.

L'intégrase *IntI* est capable de catalyser des réarrangements de cassettes par l'intermédiaire de réactions de recombinaison mettant en jeu les sites *attI* et *attC* :

- La recombinaison entre un site *attI* et le site *attC* d'une cassette sous forme circulaire conduira à l'insertion de cette cassette en aval du site *attI*.
- La recombinaison entre deux sites *attC* entourant une cassette dans un intégron conduira à l'excision de cette cassette.

A. Une dynamique reposant sur l'intégrase *IntI1*, une recombinase à tyrosine spécifique.

L'intégrase *IntI*, est une recombinase à tyrosine spécifique de site (Nunes-Düby et al., 1998). La réaction de recombinaison catalysée par ce type d'enzyme a pour particularité de faire intervenir une tyrosine catalytique qui, par attaque nucléophile sur un phosphate, va permettre la coupure de l'ADN. Contrairement à leurs cousines les recombinases à sérine qui catalysent des coupures double brin, les recombinases à tyrosine réalisent des coupures en 2 temps. Un brin du duplex d'ADN de chacun des 2 sites est coupé, échangé formant un intermédiaire réactionnel appelé jonction de Holliday. La résolution de cette jonction se fait ensuite par coupure et échange du second brin d'ADN (Grindley et al., 2006).

Bien que présentant peu d'identité de séquence, les recombinases à tyrosine sont généralement organisées en 2 domaines dont un catalytique. Ce domaine catalytique, situé dans la partie C-terminale de la protéine, possède des résidus catalytiques RHYR conservés (Figure 35). Ces résidus catalytiques se situent dans deux boîtes conservées, dites « box 1 » et « box 2 » qui encadrent les patches I, II et III servant à structurer le site catalytique (Messier et Roy, 2001).

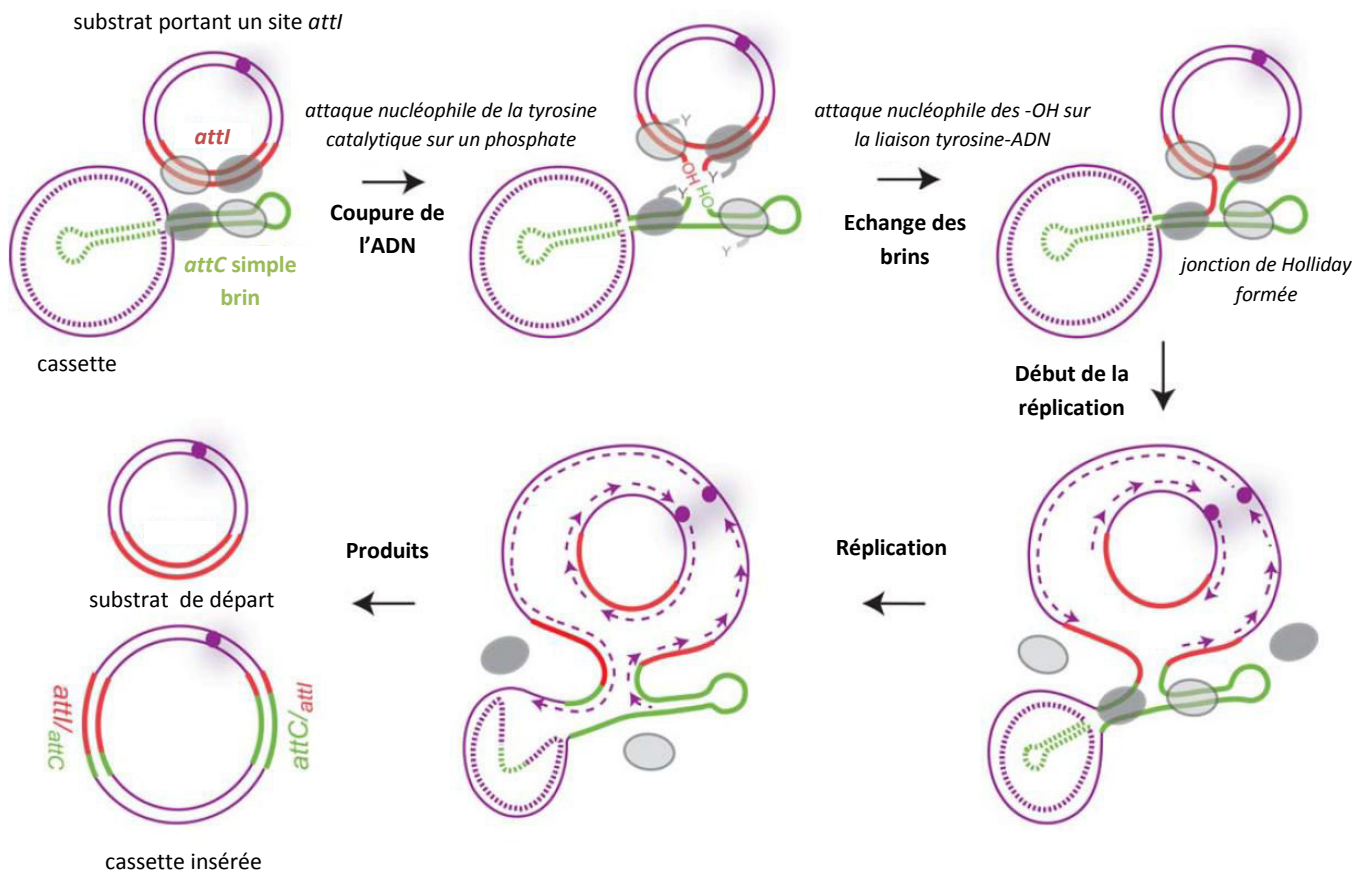


Figure 36 : Recombinaison *attI/attC*. D'après Escudero *et al.* 2015

La réaction met en jeu un site *attI* double brin (en rouge) et un site *attC* simple brin structuré (en vert). Le brin du haut de la cassette est représenté en pointillé, tandis que le brin du bas, substrat de la réaction est représenté en trait plein. Le complexe synaptique de la réaction met en jeu quatre monomères de la protéine IntI. Les monomères actifs qui réalisent la coupure sont représentés en gris foncé. La réaction se fait en trois temps. L'ADN est tout d'abord clivé par la tyrosine catalytique de la protéine IntI. S'en suit l'échange des brins et la formation d'une jonction de Holliday atypique « double brin / simple brin ». La résolution de cette jonction se fait par réplication de l'ADN. Les origines de réplication sont représentées par les points violets. La recombinaison conduit à la formation de 2 produits : le substrat de départ et le substrat ayant inséré la cassette. La recombinaison génère des sites *attI* et *attC* hybrides : les 6 derniers nucléotides du site *attI* appartiennent au site *attC* et inversement.

Les intégrases IntI des intégrons constituent néanmoins une sous-famille particulière des recombinases à tyrosine car leur mécanisme de recombinaison diffère légèrement de celui de la majorité des recombinases à tyrosine.

B. Réactions de recombinaison catalysées par IntI.

1. Recombinaison *attI/attC* : insertion de cassette.

La recombinaison *attI/attC* est la réaction la plus facilement catalysée par l'intégrase IntI (Collis et al., 2001).

Le complexe catalytique est constitué de 4 monomères de la protéine IntI : 2 fixés sur les boîtes L et R du site *attI* et 2 fixés sur les boîtes L et R d'un site *attC* structuré (Escudero et al., 2015).

La réaction de recombinaison met en jeu une tyrosine catalytique (Y³¹² chez IntI1). Cette tyrosine nucléophile va attaquer le phosphate électrophile d'une liaison phosphodiester. La tyrosine se lie alors de façon covalente avec le phosphate, induisant la rupture de la liaison phosphodiester et donc la coupure de l'ADN. Seuls les monomères liés aux boîtes R'' des sites *attI* et *attC* réalisent une coupure qui a lieu sur le brin du bas au niveau d'un motif 5'-AAC-3' entre le 2^e A et le C.

S'en suit l'échange de brin, par attaque nucléophile des groupements OH libérés par la première coupure sur les phosphates liés aux tyrosines. Le groupement hydroxyle du site *attI* attaque le phosphate de la liaison Y³¹²-P-*attC* tandis que le -OH libre du site *attC* attaque le complexe Y³¹²-P-*attI*. Une jonction de Holliday est alors formée (Figure 36).

Cette réaction de recombinaison est néanmoins atypique. Traditionnellement les réactions catalysées par les recombinases à tyrosine mettent en jeu des ADN double brin. Ici, le site *attC* est un ADN simple brin. La jonction de Holliday résultant

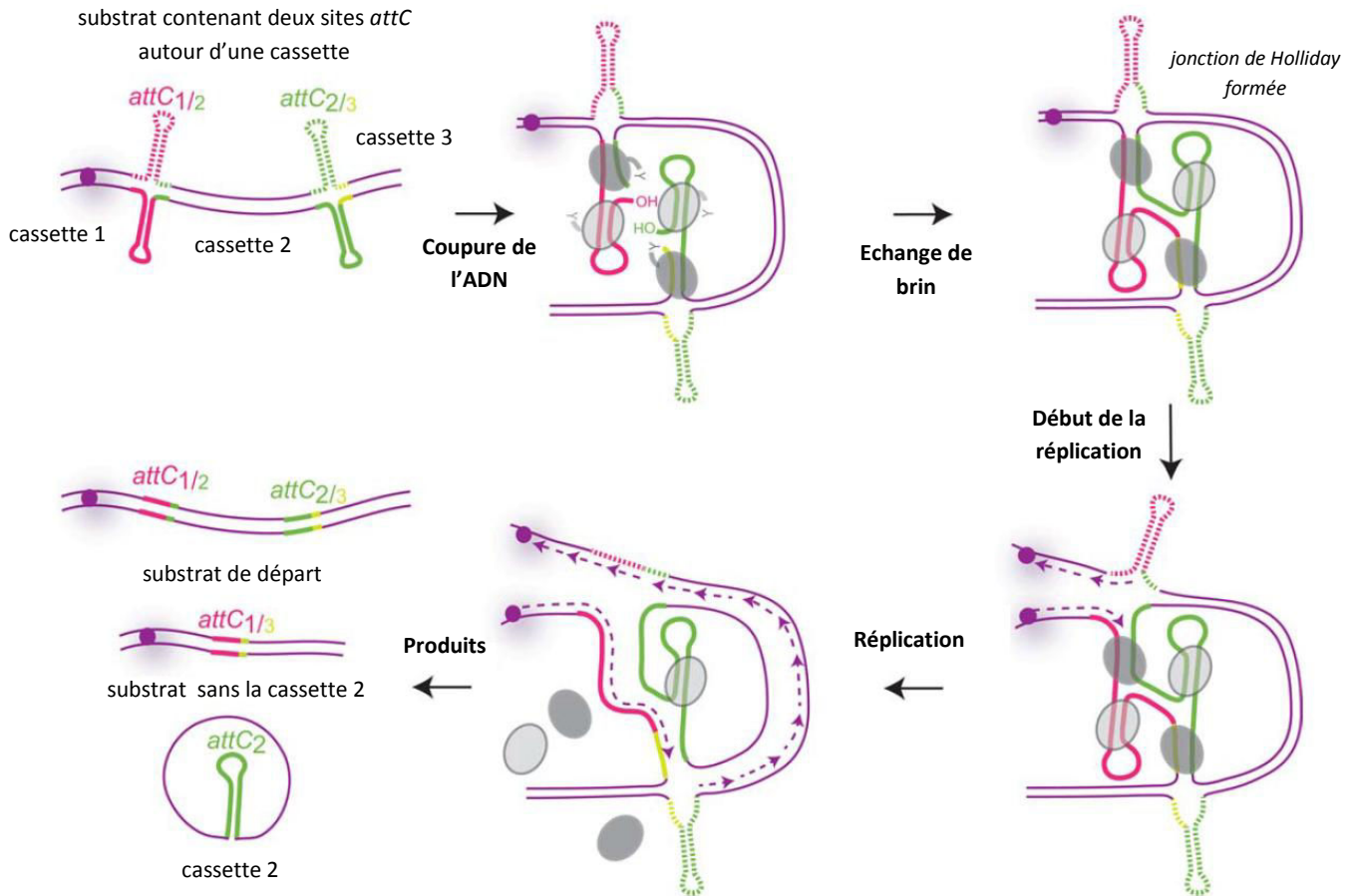


Figure 37 : Recombinaison *attC/attC*. D'après Escudero *et al.* 2015

La réaction met en jeu deux sites *attC* hybrides (rose et vert) entourant une cassette. Ces sites sont hybrides car l'insertion des cassettes s'est faite au préalable par une recombinaison *attI/attC* (voir figure précédente). Le brin du haut des sites *attC* est à nouveau représenté en pointillés, tandis que le brin du bas, substrat de la réaction est représenté en trait plein. Le complexe synaptique de la réaction met en jeu quatre monomères de l'intégrase IntI. Les monomères actifs qui réalisent la coupure sont représentés en gris foncé. La réaction se fait en trois temps. L'ADN est tout d'abord clivé par la tyrosine catalytique de la protéine IntI. S'en suit l'échange des brins et la formation d'une jonction de Holliday atypique « simple brin / simple brin ». La résolution de cette jonction se fait par réplication de l'ADN. Les origines de réplication sont représentées par les points violets. La recombinaison conduit à la formation de 3 produits : le substrat de départ, le substrat ayant excisé la cassette et la cassette excisée sous forme simple brin (celui du bas). La cassette simple brin peut servir de substrat pour une nouvelle réaction d'intégration (recombinaison *attI/attC*).

de cette recombinaison « double brin / simple brin » possède donc une forme atypique (Figure 36). Sa résolution ne peut passer par le mécanisme traditionnel des recombinases à tyrosine impliquant une deuxième coupure (Mazel, 2006).

Il a récemment été démontré que la résolution de cette jonction atypique se fait par l'intermédiaire d'une étape de réplication de l'ADN (Loot et al., 2012). Cette étape de réplication conduit à la formation de 2 produits : le substrat de départ sans insertion de cassette et le même substrat ayant inséré la cassette (Figure 36).

Le résultat de la recombinaison produit un site *attI* chimérique dans lequel les 6 derniers nucléotides de sa boîte R appartiennent à la boîte R du site *attC* de la cassette insérée. De même, le site *attC* de la dernière cassette dans le réseau sera toujours terminé par les 6 derniers nucléotides du site *attI* (Escudero et al., 2015).

2. Recombinaison *attC/attC* : excision de cassette.

La réaction de recombinaison entre les deux sites *attC* entourant une cassette conduit à l'excision de cette cassette et à sa libération sous forme circulaire (Collis et Hall, 1992).

La mécanistique de cette réaction de recombinaison est similaire à celle décrite dans le paragraphe précédent : coupure des ADN au niveau des sites R de chaque site *attC*, échange des brins, formation d'une jonction de Holliday simple brin et résolution de cette dernière par réplication des ADN (Figure 37) (Escudero et al., 2015).

Là encore le mécanisme est semi-conservatif et conduit à la formation de 2 produits : un produit ayant excisé la cassette, l'autre non (Figure 37). Il convient de noter que la cassette libérée le sera sous forme simple brin (le brin du bas initial). Par structuration en tige-boucle, le site *attC* de cette cassette simple brin pourra servir de site de fixation à la protéine IntI pour une nouvelle réaction d'intégration.

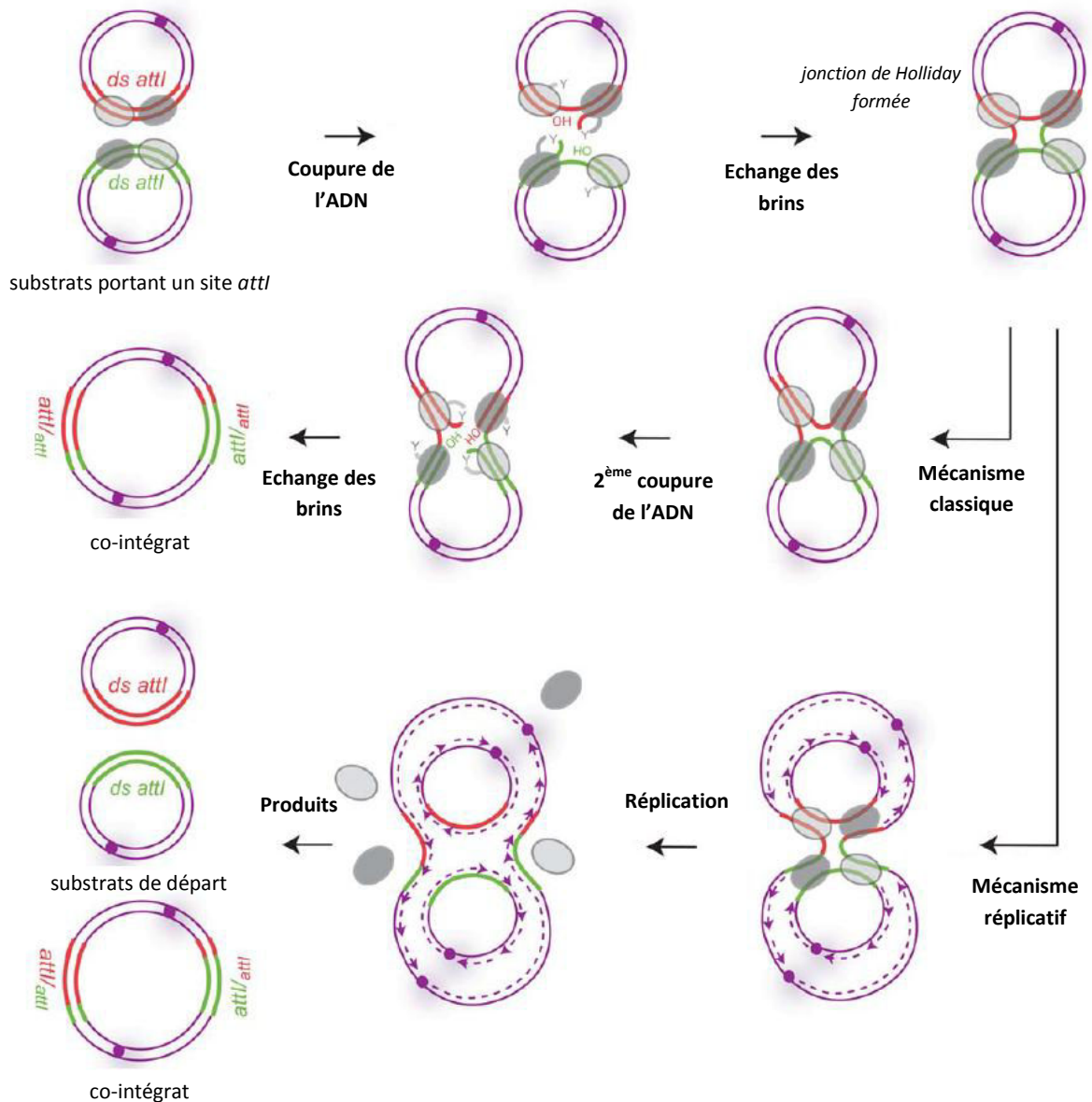


Figure 38 : Recombinaison *attI/attI*. D'après Escudero *et al.* 2015

La réaction met en jeu deux sites *attI* double brin (rouge et vert). Le complexe synaptique de la réaction met en jeu quatre monomères de la protéine IntI. Les monomères actifs qui réalisent la coupure sont représentés en gris foncé. La réaction commence comme dans les cas précédents avec coupure de l'ADN et échange du premier brin. Néanmoins ici, la jonction de Holliday « double brin » formée est une jonction classique des recombinases à tyrosine. La résolution de cette jonction peut donc se faire par coupure et échange du second brin selon le mécanisme classique des recombinases. La résolution de la jonction peut toutefois être réalisée par mécanisme réplcatif comme dans les cas précédents. Quelque soit le mode de résolution, la recombinaison *attI/attI* conduit à la formation d'un produit nommé « co-intégré » dans lequel les 2 substrats de départ ont fusionné.

Néanmoins cette réaction d'insertion devra se faire rapidement sans quoi l'ADN simple brin sera rapidement dégradé.

3. Autres types de recombinaisons.

Deux sites *attI* peuvent également recombinaison entre eux. Cette réaction reste néanmoins 1000 fois moins efficace que la recombinaison entre un site *attI* et un site *attC* (Collis et al., 2001).

Cette réaction est particulière car contrairement aux réactions précédentes, les deux substrats de la recombinaison sont doubles brins. La jonction de Holliday formée après échange du premier brin est donc une jonction de Holliday classique (Figure 38). Cette dernière pourra être résolue de deux façons : classiquement selon le mécanisme standard des recombinases à tyrosine par clivage et échange du second brin ou bien comme précédemment par un mécanisme réplcatif (Escudero et al., 2015). Dans les deux cas, la réaction aboutie à la fusion des deux substrats de départ en un « co-intégrat » (Figure 38).

Enfin les sites *attI* et *attC* peuvent recombinaison sur des sites secondaires contenant un motif GNT (Recchia et al., 1994). Des recombinaisons *attC*/site secondaire ont déjà été observées naturellement sur des plasmides (Recchia et Hall, 1995). Les réactions *attI*/site secondaire n'ont pour l'instant été observées qu'*in vitro* et se sont avérées très peu fréquentes (Hansson et al., 1997). Dans tous les cas, l'excision d'une cassette insérée au niveau d'un site secondaire est peu probable. Ces réactions aspécifiques pourraient conduire à l'acquisition stable de gène de résistance mais aussi créer de l'instabilité génomique.

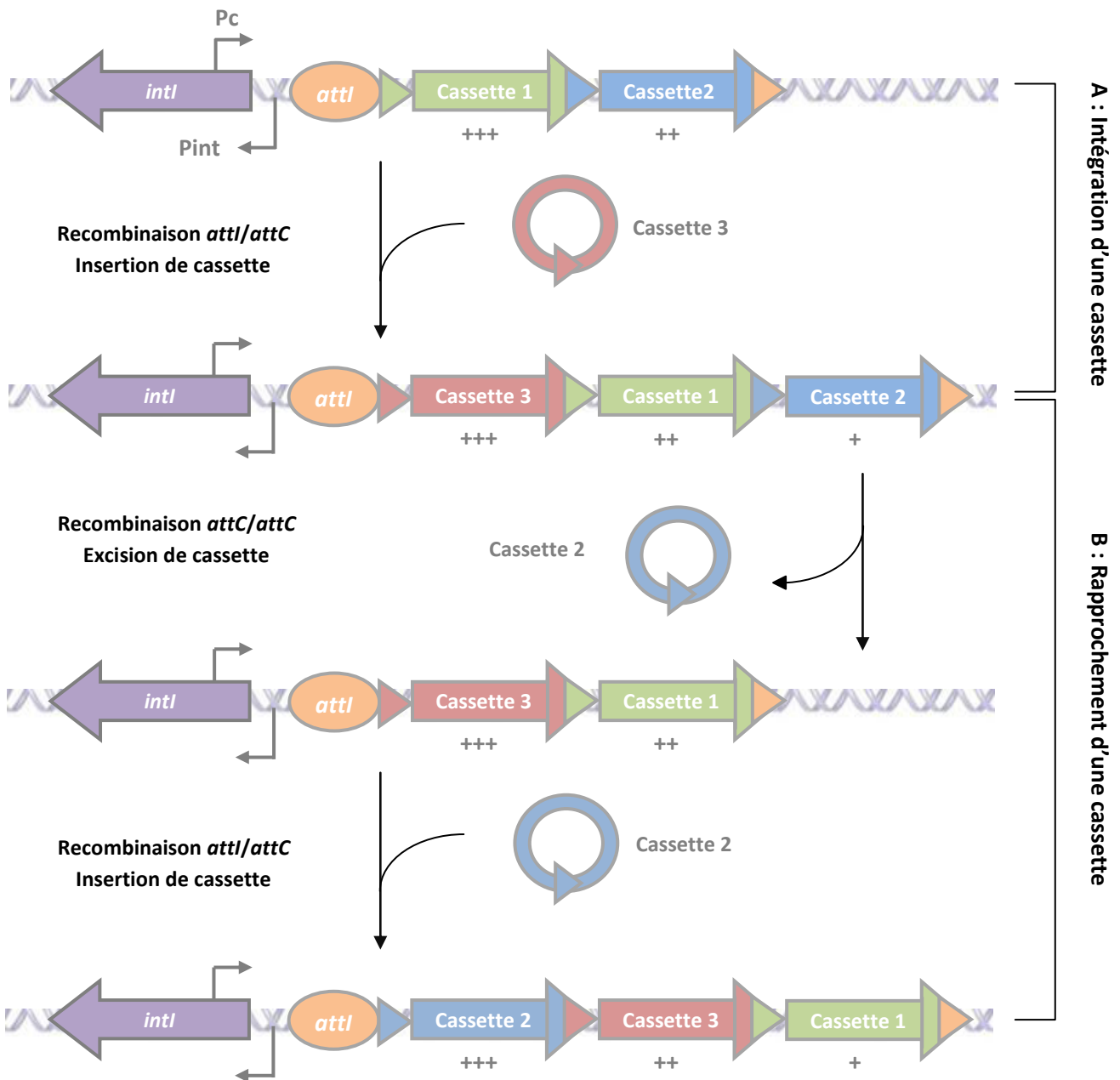


Figure 39 : Modèle de réarrangement du réseau de cassettes en réponse à un stress antibiotique.

Les sites *attI* et *attC* sont représentés respectivement par des sphères oranges et des triangles. Les triangles bicolores représentent les sites *attC* hybrides générés par les recombinaisons *attI/attC* (voir Figure 6). Les croix sous les cassettes attestent de leur niveau d'expression.

A - L'intégron est capable de répondre à un stress antibiotique en intégrant une cassette de résistance (cassette rouge). Cette intégration se fait préférentiellement au niveau du site *attI*, par recombinaison entre le site *attI* de l'intégron et le site *attC* de la cassette. La cassette est toujours insérée en première position à proximité du *Pc*. Son niveau d'expression est alors maximal ce qui permet de résister d'autant mieux à l'antibiotique.

B- Si l'intégron porte déjà dans son réseau une cassette permettant de résister à l'antibiotique, il est proposé que son rapprochement à côté du *Pc* se fasse en 2 étapes : tout d'abord par excision de la cassette (recombinaison *attC/attC*) puis par sa réinsertion en première position (recombinaison *attI/attC*). A proximité du *Pc*, la cassette est mieux exprimée : la bactérie résiste mieux à l'antibiotique.

C. Réarrangement de cassettes en réponse à un stress antibiotique.

Compte tenu des mécanismes de recombinaison présentés précédemment, il est proposé qu'en réponse à un stress antibiotique un intégron puisse :

- Intégrer une cassette de résistance permettant de lutter efficacement contre cet antibiotique (Figure 39-A). Les recombinaisons *attI/attC* étant bien plus efficaces que les recombinaisons *attC/attC* (Collis et al., 2001), l'intégration se fait préférentiellement au niveau du site *attI* de l'intégron. La nouvelle cassette est donc insérée en première position dans le réseau de cassettes ce qui maximise son niveau d'expression (Collis and Hall, 1995) et le niveau de résistance de la bactérie.
- Rapprocher une cassette de résistance déjà présente dans son réseau (Figure 39-B). La cassette déjà présente dans le réseau serait rapprochée du Pc pour une expression plus importante. Il est proposé que ce rapprochement se fasse en deux temps. La cassette de résistance serait tout d'abord excisée par une recombinaison *attC/attC* avant d'être réintégrée en première position dans le réseau par une recombinaison *attI/attC* (Figure 39-B). Néanmoins ce modèle a récemment été mis à mal par des travaux s'intéressant aux réarrangements de cassettes en réponse à un stress antibiotique (Barraud and Ploy, 2015). Dans ces travaux, il a été montré que le mouvement d'une cassette (*catB9*, résistance au chloramphénicol) se faisait plus par excision des cassettes situées en amont que par excision de la cassette d'intérêt pour une réinsertion au site *attI*.

Table 6 : Polymorphisme du Pc et activité de l'intégrase associée. D'après Jové *et al.* 2010

Variant Pc	Variant Intl	Force Pc	Activité d'excision de Intl
PcW	Intl _{R32_H39}	1	1
PcH1	Intl _{R32_H39}	X 6	1
PcW _{TGN-10}	Intl _{P32_H39}	X18	÷ 336
PcH2	Intl _{R32_N39}	X 20	÷ 51
PcS	Intl _{R32_N39}	X 25	÷ 51

La force des variants Pc est rapportée à celle du Pc le plus faible, le PcW. Les activités d'excision sont également rapportées à celle du PcW. On observe une corrélation inverse entre la force de promoteur et l'activité d'excision de l'intégrase associée. Les Pc faibles (PcW et PcH1) sont associés à des intégrases plus efficaces en activité d'excision.

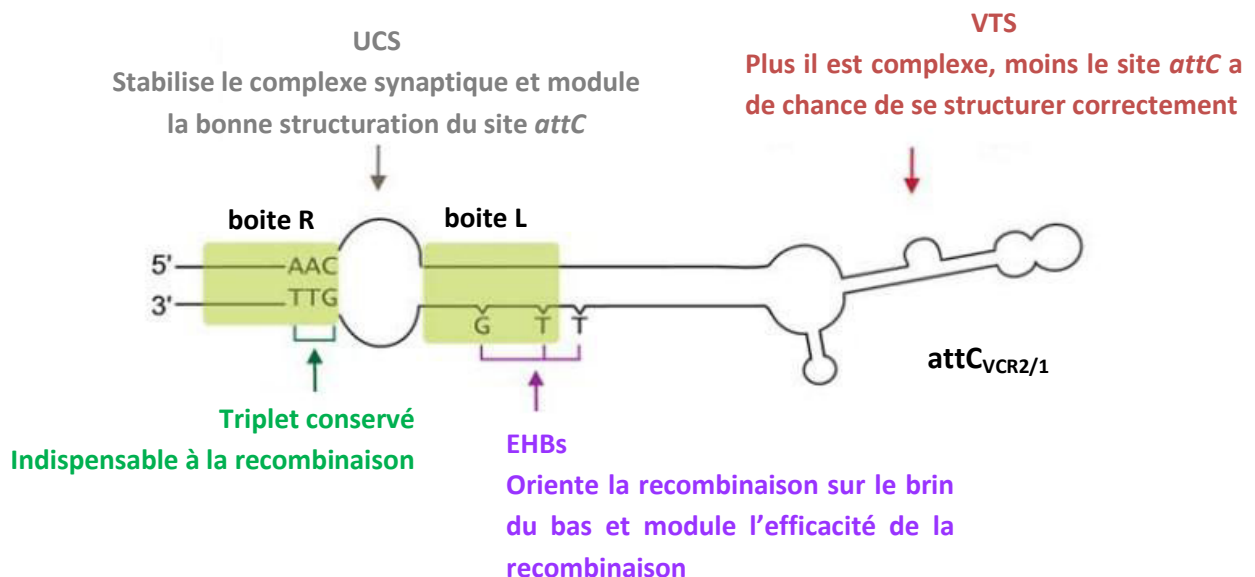


Figure 40 : Motifs structuraux impactant le pouvoir recombinogène des sites *attC*. D'après Escudero *et al.* 2015

Le pouvoir recombinogène d'un site *attC* est fonction de 2 paramètres : une bonne structuration sous forme « tige-boucle » et l'efficacité avec laquelle l'intégrase va recombiner ce site.

La structure du VTS (Variable Terminal Sequence) peut jouer sur l'efficacité avec laquelle un site *attC* va se structurer. Plus la structure du VTS est complexe, plus le site *attC* aura du mal à adopter une structure « tige-boucle »

L'efficacité de la recombinaison est quant à elle conditionnée à la présence du triplet AAC conservé. Sans ce triplet pas de recombinaison. De même la région UCS (Unpaired Central Spacer) en stabilisant le complexe synaptique va pouvoir moduler l'efficacité de la recombinaison. Enfin les EHBs (Extra-Helical Bases) en plus d'orienter la recombinaison vont également impacter l'efficacité de la recombinaison. Certains couples d'EHBs sont plus favorables à la recombinaison que d'autres. Par exemple, les intégrases Intl1 sont plus efficaces sur les sites *attC* présentant deux EHB espacés de 6 nucléotides de type G-N₆-T ou C-N₆-T (Larouche et Roy, 2011).

D. Paramètres influençant le potentiel recombinogène des l'intégron.

1. Influence du polymorphisme du Pc.

Du fait de sa localisation dans la séquence codante du gène *intl1*, le polymorphisme du Pc influence la séquence en acides aminés de la protéine IntI1. Aux cinq variants de Pc les plus fréquents sont associés trois variants protéiques d'IntI1 : IntI_{R32_N39} (PcH2 et PcS), IntI_{P32_H39} (PcW_{TGN-10}) et IntI_{R32_H39} (PcW et PcH1). De façon intéressante, il a été démontré qu'il existe une corrélation inverse entre la force du Pc et l'activité de recombinaison de la protéine IntI1 associée : plus le promoteur est faible, plus l'activité d'excision de la protéine IntI1 est forte (Table 6) (Jové et al., 2010).

2. La structure des sites attC.

Différentes structures au sein des sites *attC* conditionnent le pouvoir recombinogène de ces derniers (Figure 40).

Parmi ces structures, on retrouve tout d'abord une région appelée UCS (Unpaired Central Spacer). Cette région, comprise entre les boîtes R et L des sites *attC*, contient des nucléotides non complémentaires qui confèrent à cette structure une forme de boucle. La région UCS intervient dans la stabilisation du complexe synaptique lors de la recombinaison (MacDonald et al., 2006). La forme de cette boucle d'ADN va ainsi pouvoir moduler l'efficacité de la recombinaison. En outre cette région empêcherait l'intégrase de re-échanger un brin déjà échangé (Bouvier et al., 2009).

Les bases dites extra hélicoïdales ou EHB (pour Extra Helical Bases) jouent également un rôle déterminant lors de la recombinaison. Les EHB sont issues du

mésappariement de certaines bases au sein de la tige des sites *attC* structurés (Figure 33, page 83). Typiquement une EHB est présente au sein de la boîte L, souvent un G, suivie entre 6 et 8 nucléotides plus loin d'une deuxième EHB, souvent un T (Bouvier et al., 2009). Les EHB ont 3 rôles majeurs. Tout d'abord elles orientent la recombinaison sur le bon brin d'ADN structuré, celui du bas permettant ainsi l'insertion de la cassette dans le bon sens (Bouvier et al., 2009). Elles stabilisent également le complexe synaptique lors de la recombinaison en établissant des contacts avec la protéine IntI. Selon les bases extrudées, l'efficacité de la recombinaison sera différente. Par exemple, les intégrases IntI1 seront particulièrement efficaces sur les sites *attC* présentant deux EHB espacées de 6 nucléotides de type G-N₆-T ou C-N₆-T (Larouche et Roy, 2011). Enfin elle empêche une seconde coupure du site *attC* en repoussant la tyrosine catalytique du monomère d'IntI fixé sur la boîte L (MacDonald et al., 2006).

Enfin l'activité recombinogène d'un site *attC* est conditionnée par sa bonne structuration. Cette structuration en un motif « tige-boucle » est fortement influencée par la séquence et la structure de l'élément VTS (Variable Terminal Sequence) (Figure 40). Les VTS peuvent avoir des tailles mais surtout des structures différentes. Par exemple le VTS du site *attC_{aadA7}* est constitué de 3 nucléotides mésappariés (Figure 33, page 83). A l'inverse le site *attC_{VCR2/1}* (site retrouvé dans un SI de *Vibrio cholerae*), beaucoup plus long, disposera lui-même d'une structure secondaire (Figure 33, page 83). Selon la séquence et la taille du VTS, la structuration en une « tige-boucle » sera plus ou moins simple. De façon général, il est admis que les sites VTS longs sont peu favorables à l'extrusion de motifs tige-boucle au niveau du site *attC* (Loot et al., 2010).

A retenir :

L'incroyable plasticité du réseau de cassettes des IMs est liée à l'activité de l'intégrase Intl capable :

- d'intégrer une cassette pour répondre à un stress antibiotique par recombinaison entre le site *attI* de l'intégron et le site *attC* d'une cassette.
- d'exciser une cassette par recombinaison entre les deux sites *attC*.
- de rapprocher une cassette du Pc pour mieux l'exprimer par excision puis réinsertion.

Les intégrations se font préférentiellement en première position dans le réseau, ce qui maximise l'expression de la dernière cassette ajoutée.

Toutes les cassettes ne sont néanmoins pas aussi « recombinogènes » les unes que les autres. Certains sites *attC* sont plus facilement mobilisés par la protéine Intl ou recombinent plus efficacement.

Le dynamisme de l'intégron est aussi impacté par la séquence de son promoteur Pc. Il a été montré que les Pc faibles étaient associés à des intégrases très actives alors que les Pc forts étaient associés à des intégrases à faible activité. Autrement dit l'intégron semble devoir « choisir » entre dynamisme et forts niveaux d'expression des gènes de résistance.

Enfin, il est important de noter que les intégrons peuvent être source d'instabilité génomique en provoquant des réactions de recombinaison aspécifiques dans les génomes bactériens.

V. Un système dynamique finement régulé.

En dépit de l'incroyable plasticité des intégrons, les réseaux de cassettes sont pourtant relativement stables (Dubois et al., 2007 ; Partridge et al., 2009). De même, les réseaux contiennent encore souvent des cassettes codant des résistances à des antibiotiques pourtant peu utilisés (*sat*, *aad*). Autant d'éléments qui suggèrent que le système pourrait être constitutivement réprimé.

A. Régulation par la réponse SOS.

En 2009, des travaux au laboratoire ont permis de mettre en évidence l'existence d'une boîte LexA fonctionnelle, au niveau du promoteur Pint, capable de fixer le répresseur LexA (Figure 34, page 86) (Guerin et al., 2009). Dans les mêmes travaux, il a également été montré que des antibiotiques inducteurs du SOS (mitomycine, ciprofloxacine et triméthoprime) étaient capables d'induire l'expression du gène *intI1* chez *E. coli* et *V. cholerae* (Guerin et al., 2009). Par la suite, des études *in silico* ont permis de démontrer l'existence de cette boîte LexA chez plus de 600 intégrons dont des ISC (Cambray et al., 2011)

Aussi il est proposé qu'en réponse à un stress antibiotique générant des ADNs simple brin, l'expression du gène *intI* soit induite favorisant ainsi les réarrangements de cassettes et le rapprochement d'un gène permettant de répondre au stress antibiotique.

B. Autres régulations connues.

D'autres types de régulation du gène *intI* ont aussi été mis en évidence. La protéine CRP (protéine réceptrice d'AMP cyclique) serait notamment impliquée dans la régulation du gène *intIA* de l'intégron chromosomique de *Vibrio cholerae*

(Baharoglu et al., 2012). Les protéines FIS (Factor for Inversion Stimulation) et H-NS (Histone-like Nucleoid Structuring protein), deux protéines associées aux protéines du nucléotide, seraient également des répresseurs négatifs de l'expression du gène *intI1* (Cagle et al., 2011).

En plus de ces mécanismes mettant en jeu des protéines régulatrices, le promoteur Pint peut aussi dans certains cas être régulé par un phénomène d'interférence transcriptionnelle, comme cela a été démontré pour les IM1. De fait, les promoteurs Pc et Pint se font face et l'initiation de la transcription sur un de ces promoteurs peut dans certains cas interférer avec celle de l'autre. Une telle interférence a été démontrée lorsque le Pint fait face au variant PcS, très affiné pour les ARN polymérases (Guérin et al., 2011). Dans ces conditions, le PcS va préférentiellement initier la transcription des gènes contenus dans les cassettes inhibant au passage la transcription du gène *intI*.

A retenir :

Parmi les mécanismes de régulation du gène *intI*, on retiendra principalement la régulation SOS dépendante.

Cette régulation est intéressante car elle suggère que l'expression du gène *intI*, constitutivement réprimé, peut être induite par certains stress antibiotiques (triméthoprime, quinolone, ...). Induite, la protéine IntI va alors pouvoir capturer la cassette permettant de résister à cet antibiotique.

L'intégron de par sa mécanistique et sa régulation est donc capable de répondre efficacement à un stress antibiotique. Ils confèrent aux bactéries un incroyable potentiel adaptatif.

Ce potentiel adaptatif est sans doute la clé du succès épidémiologique des intégrons. Ils permettent aux bactéries de résister toujours mieux aux antibiotiques.

VI. Diversité épidémiologique des IM.

Les IM sont souvent associés à des éléments génétiques mobiles de type plasmide ou transposon. De ce fait, ils sont largement impliqués dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries (Daikos et al., 2007 ; Leverstein-van Hall et al., 2003 ; Martinez-Freijo et al., 1998).

A. Diversité des IM.

1. Les IM1.

Les IM1 sont les intégrons très prévalents en clinique et sont par conséquent les plus étudiés. Ils ont été décrits chez de nombreuses bactéries à Gram négatif (BGN) et plus rarement chez des bactéries à Gram positif (BGP).

Les IM1 sont souvent associés au transposon Tn402 et/ou à des transposons de la famille Tn3 (Tn21 ou Tn1696) (Hall, 1997).

Leur séquence en 3', en aval des cassettes, est aussi souvent conservée. Cette région, baptisée 3'CS, encode 3 gènes : *qacEΔ1* (résistance aux ammoniums quaternaires), *sul1* (résistance aux sulfamides) et une *orf*, baptisée *orf5*, de fonction inconnue. Cette 3'CS est probablement un vestige de l'histoire évolutive des IM1 (voir paragraphe VII)

La plupart des cassettes a déjà été décrite au sein d'IM1 (Partridge et al., 2009). Il existe donc une multitude de réseaux de cassettes différents et il serait bien ambitieux de tenter de tous les décrire. Depuis quelques années, une base de données, baptisée INTEGRALL*, recense et annoté des séquences d'intégrons (Moura et al., 2009). Pas moins de 3000 séquences d'IM1 y sont répertoriées. Les cassettes *aad* et *dfr* sont y particulièrement représentées (dans plus de 60% des réseaux de cassettes chez *E. coli*, d'après INTEGRALL).

* <http://integrall.bio.ua.pt>

Différentes études se sont aussi intéressées à l'épidémiologie des variants de Pc. Pour rappel, 13 différents variants de Pc ont été décrits chez les IM1. Tous les travaux sur le sujet s'accordent à dire que les promoteurs faibles (PcW et PcH1) sont plus prévalents (Cocchi et al., 2007; Moura et al., 2012; Wei et al., 2013a). En 2001, une étude sur des souches d'Entérobactéries collectées entre 1993 et 1999 montre néanmoins des prévalences de Pc forts en augmentation : 14% en 1993, 24% en 1996 contre 46% en 1999 (Schmitz et al., 2001).

La présence d'IM1 a aussi souvent été corrélée à des phénotypes de multirésistance (Koczura et al., 2014; Leverstein-van Hall et al., 2003). De ce fait, les IM 1 sont des acteurs majeurs de la dissémination de l'antibiorésistance.

2. Les IM2.

Cette classe d'intégron est généralement associée au transposon Tn7, assurant à ces derniers une mobilité importante (Wolkow et al., 1996).

Les IM2 portent souvent les cassettes *dfrA1* (résistance au triméthoprim), *sat2* (résistance à la streptothricine), et *aadA1* (résistance à la spectinomycine et streptomycine) (Hansson et al., 2002). Des cassettes plus atypiques ont aussi été décrites ces dernières années. En 2003, l'équipe de Didier Mazel a par exemple décrit un IM2 encodant un gène *ereA* (Biskri and Mazel, 2003). Autre exemple en 2005 où des souches de *A. baumannii*, porteuses d'un IM2 contenant les cassettes *aadB*, *catB2* et *dfrA1*, ont été décrites (Ramírez et al., 2005a). Cette faible diversité de cassettes s'explique en partie par la non-fonctionnalité de l'intégrase IntI2 empêchant la capture de nouvelles cassettes. Pour rappel, le gène *intl2* présente un codon STOP prématuré en son sein.

Pourtant des IM2 contenant des gènes *intl2* sans codon stop (encodant donc des protéines IntI2 fonctionnelles) ont aussi été décrits. Les premiers ont été

observés dans des souches de *Providencia stuartii* d'origine bovine en 2006 (Barlow and Gobius, 2006). En 2008, une souche de *E. coli* uruguayenne est aussi porteuse d'un IM2 encodant une protéine IntI2 fonctionnelle (Márquez et al., 2008). Plus récemment en 2014, un de ces IM2 a été décrit en Chine dans un isolat de *Proteus mirabilis* (Wei et al., 2014).

Bien que moins prévalents que les IM1, les IM2 sont souvent retrouvés en clinique.

3. Les IM3.

Seule une petite dizaine d'IM3 a été décrite. Ils portent généralement un réseau contenant des gènes de type *bla* (résistance aux β -lactamines) et *aacA4* (résistance à la tobramycine, nétilmicine et amikacine) (Arakawa et al., 1995 ; Correia et al., 2003 ; Barraud et al., 2013).

La première description d'un IM 3 a été réalisée chez une souche de *Serratia marcescens* résistante aux carbapénèmes en 1995 (Arakawa et al., 1995). Par la suite des IM3 ont été décrits chez des souches de *Pseudomonas putida* (Shibata et al., 2003), *K. pneumoniae* (Correia et al., 2003), *Delftia* (Xu et al., 2007), *E. coli* (Poirel et al., 2010), *Enterobacter cloacae* (Barraud et al., 2013) et plus récemment chez *Acinetobacter johnsonii*, *Aeromonas allosacharophila* et *Citrobacter freundii* (Simo Tchuinte et al., 2016).

Si l'impact clinique des IM3 reste anecdotique, des approches métagénomiques ont montré d'importantes quantités d'IM3 dans des échantillons environnementaux (Moura et al., 2010 ; Stalder et al., 2014). Les IM3 pourraient donc être d'importants acteurs de la dissémination de l'antibiorésistance dans l'environnement.

B. Les bactéries hôtes.

1. Les bactéries à Gram négatif (BGN).

La quasi-totalité des IM décrits a été isolée à partir de BGN. Les IM1 y sont particulièrement prévalents. En 2015, une revue recense des prévalences d'IM1 allant de 21% à 59% chez les BGN (Deng et al., 2015b).

De nombreux IM ont été isolés à partir de bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. Les principaux genres concernés sont les genres *Escherichia* (Gassama et al., 2004 ; Machado et al., 2005 ; Skurnik et al., 2005), *Klebsiella* (Poirel et al., 2000; Rao et al., 2006), *Enterobacter* (Jeong et al., 2003 ; Perilli et al., 2008), *Serratia* (Bagattini et al., 2004 ; Yum et al., 2002), *Salmonella* (Ahmed et al., 2016 ; Krauland et al., 2009) et *Shigella* (Dubois et al., 2007 ; Pan et al., 2006). Les descriptions au sein des genres *Proteus* (Wei et al., 2014), *Citrobacter* (Ferreira et al., 2010), *Morganella* (Tsakris et al., 2007) et *Yersinia* (Soto et al., 2003) sont plus rares.

Chez les *Pseudomonadales*, les genres *Pseudomonas* (Ruiz-Martínez et al., 2011; Yan et al., 2006) et *Acinetobacter* (Ruiz et al., 2003; Turton et al., 2005) sont aussi des hôtes fréquents.

Des IM ont aussi été trouvés plus rarement chez les genres *Stenotrophomonas* (Barbolla et al., 2004), *Burkholderia* (Ramírez et al., 2005b), *Vibrio* (Rajpara et al., 2009), *Aeromonas* (L'Abée-Lund and Sørum, 2001), *Campylobacter* (Lee et al., 2002), *Helicobacter* (Crespo et al., 2005) ou *Bordetella* (Kadlec et al., 2007).

2. Les bactéries à Gram positif (BGP).

Seule une dizaine de publications fait état d'IM chez des BGP. La majorité des IM décrits chez des BGP étaient des IM1. La première description d'un IM1 chez une BGP remonte à 1990 avec la découverte d'un IM dans une souche de *Mycobacterium fortuitum* (Martin et al., 1990). A l'instar du genre *Mycobacterium*, des IM sont souvent retrouvés dans des BGP à haut GC% : *Corynebacterium* (Barraud et al., 2011 ; Nešvera et al., 1998), *Arcanobacterium* (Liu et al., 2009), *Arthrobacter* (Agersø and Sandvang, 2005) ou *Actinotignum* (Barraud et al., 2016).

C. Les réservoirs.

1. L'homme.

Plusieurs centaines de publications font état d'IM chez l'homme. Leur présence pose un problème majeur en pratique clinique car ces derniers sont souvent associés à des phénotypes de multirésistance.

La majorité des IM décrites en contexte clinique a été retrouvée chez des BGN entéropathogènes. En 2009, une étude sur plus de 800 souches cliniques de salmonelles révèle que 13% de souches étaient porteuses d'IM1. Les shigelles sont aussi des hôtes fréquents. Si les IM1 y sont peu prévalents, 13% de souches sont concernées selon une étude espagnole (Navia et al., 2004), des IM2 y sont fréquemment retrouvés. Deux études, sénégalaise et coréenne, rapportent des prévalences d'IM de classe 2 de 93% et 100% respectivement chez des shigelles multirésistantes (Gassama-Sow et al., 2006 ; Jin et al., 2010).

En contexte d'infection urinaire, les études révèlent des prévalences d'IM élevées souvent supérieures à 40%. Une étude australienne réalisée sur des souches tout venant, sans tenir compte des phénotypes de résistance, révèlent par

exemple une prévalence de 49% d'intégrons toutes classes confondues (White et al., 2001). Une autre étude sur des souches d'*E. coli* isolées entre 1980 et 2002 fait état de 54% de souches porteuses d'IM1 et de 5 % de souches porteuses d'IM2 (Yu et al., 2003).

Des intégrons ont également souvent été retrouvés dans des échantillons d'hémocultures avec des prévalences qui varient de 5 % à 40% selon les espèces bactériennes isolées (Heir et al., 2004 ; Schmitz et al., 2001 ; Vinué et al., 2010). Les intégrons seraient en outre de très bon marqueurs prédictifs des hémocultures positives dans des cas de septicémies à germes Gram négatif (Barraud et al., 2014).

Quelques études ont décrit la prévalence des IM dans la flore commensale. Généralement les prévalences rapportées oscillent entre 15 et 30% (Leverstein-van Hall et al., 2002 ; Vasilakopoulou et al., 2009 ; Vinué et al., 2008). De façon intéressante, il a été démontré que ces valeurs étaient affectées par différents facteurs notamment l'âge (Sepp et al., 2009), le mode de vie (Skurnik et al., 2005) mais aussi les séjours hospitaliers et l'antibiothérapie.

2. Le monde animal.

De nombreux IM ont été mis en évidence chez des bactéries commensales ou pathogènes animales. Les espèces concernées sont nombreuses : chiens, chats (Cocchi et al., 2007), bovins, ovins, porcins, volailles (Goldstein et al., 2001), chevaux (Vo et al., 2007), mouettes (Dolejska et al., 2007), tortues (Díaz et al., 2006), animaux de zoo (Ahmed et al., 2007) ou même poissons (Jacobs and Chenia, 2007). Globalement, plus une espèce animale est exposée à des traitements antibiotiques, plus son portage en intégrons est élevé.

Ainsi les animaux de ferme, fortement exposés aux antibiotiques, affichent des prévalences élevées d'intégrons. Le portage digestif des porcs semble

particulièrement important. Une étude chilienne sur des salmonelles commensales rapporte des fréquences d'intégrons atteignant 57% pour les IM de classe 1 et 35% pour les IM de classe 2 (Lapierre et al., 2008). Dans une étude similaire au Japon, 51% des isolats étaient porteurs d'intégrons (Futagawa-Saito et al., 2010). La volaille est aussi particulièrement concernée. Deux études, grecque et coréenne, révèlent des taux de portage de l'ordre de 45%-50% chez des souches commensales de *E. coli* (Kang et al., 2005 ; Vasilakopoulou et al., 2009). Les animaux domestiques affichent également des taux de portage importants. Une étude réalisée en 2007 chez des chat et chiens rapporte que 22% des isolats commensaux portent des intégrons (Cocchi et al., 2007). Une étude plus récente sur des chats et chiens américains semble confirmer cette fourchette de valeur en affichant des prévalences en intégrons de 29% (Shaheen et al., 2010). Une étude sur des bactéries isolées d'animaux vivant dans des environnements à faible, moyenne ou forte anthropie montre qu'il existe une corrélation entre le portage d'intégron et la proximité de l'Homme (Skurnik et al., 2006).

Il est important de noter que toutes les études citées jusqu'à présent portaient sur des BGN. Pourtant l'occurrence de BGP porteurs d'intégrons dans le monde animal, bien que moins étudiée, semble tout aussi alarmante. Une étude réalisée sur des litières de poulets aux Etats Unis a montré une prévalence d'intégrons supérieure à 90% imputable essentiellement à des BGP présentes à 85% dans les échantillons analysés (Nandi et al., 2004). Une étude similaire sur des *Arthrobacter* et *Corynebacterium* issus de porcherie révèle des prévalences d'intégrons de l'ordre de 15% (Agersø and Sandvang, 2005).

Autre constat alarmant, des intégrons ont été retrouvés plusieurs fois dans le circuit alimentaire. Une étude américaine réalisée sur 200 lots de viande hachée a

montré que 20% des lots contenaient des salmonelles et que 50% d'entre elles étaient porteuses d'intégrons (White et al., 2001). Même constat en Chine, Allemagne, Tunisie et Norvège avec de la viande contaminée par des bactéries porteuses d'intégrons (Chen et al., 2004 ; Miko et al., 2005 ; Soufi et al., 2009 ; Sunde, 2005). La présence d'IM dans la chaîne alimentaire est problématique et renforce le risque de transfert de gènes de résistance au consommateur.

3. L'environnement.

Les sols et milieux aquatiques sont une source non négligeable d'IM (Stalder et al., 2012).

Plusieurs études ont essayé d'évaluer la prévalence des intégrons en milieu aquatique à partir d'isolats bactériens issus d'échantillons d'eaux de rivières, fleuves ou estuaires. Les fréquences rapportées oscillent entre 1 et 15% (Laroche et al., 2009 ; Ozgumus et al., 2009 ; Rosser and Young, 1999). En ne considérant que les bactéries environnementales résistantes aux antibiotiques, ces prévalences augmentent fortement et atteignent les 30-40% (Henriques et al., 2006 ; Mukherjee and Chakraborty, 2006).

Des études métagénomiques ont estimé que 1 à 5% des bactéries issues d'échantillons de rivière seraient porteuses d'un intégron (Hardwick et al., 2008 ; Rosewarne et al., 2010). Ces valeurs sont corrélées à l'activité humaine. En effet, des échantillons prélevés dans un estuaire préservé de toute activité humaine révèlent une fréquence de bactéries porteuses d'intégrons de l'ordre de 0.01% (Wright et al., 2008). A l'inverse dans des eaux polluées ou issues d'effluents hospitaliers, la quantité d'intégrons détectée est plus importante à hauteur de 10% (Rosewarne et al., 2010 ; Stalder et al., 2014, 2012).

Peu d'études ont cherché à déterminer la prévalence d'intégrons dans les sols. Une approche métagénomique sur des sols agricoles a révélé de faibles prévalences d'IM1 inférieures à 1% (Gaze et al., 2011). Ce pourcentage était aussi corrélé à l'activité anthropique. Plus le sol est exposé à des traitements biocides plus ce pourcentage augmente.

De façon intéressante, les IM environnementaux diffèrent de ceux retrouvés en clinique. Ils sont généralement véhiculés par des bactéries non impliquées en infectiologie humaine notamment les genres *Acidovorax* et *Azoarcus* et portent également souvent des cassettes ne codant pas de résistance aux antibiotiques (Stokes et al., 2006).

A retenir :

La dissémination des IMs est aggravée par la diversité des bactéries et réservoirs concernés.

Des IMs ont en effet été retrouvés chez un grand nombre d'espèces bactériennes. Ils affectent aussi bien des bactéries à Gram négatif, à Gram positif, cliniques, commensales, environnementales...

Ils sont aussi retrouvés dans des contextes variés : chez l'homme, chez les animaux, dans l'eau ou même dans les sols.

Dans le contexte clinique, les IMs sont tellement prévalents qu'aujourd'hui les phénotypes de multirésistance sont souvent corrélés à la présence d'intégrons.

Dans un contexte où les nouveaux antibiotiques sont de plus en plus rares, les intégrons sont en passe de devenir un problème majeur de santé publique.

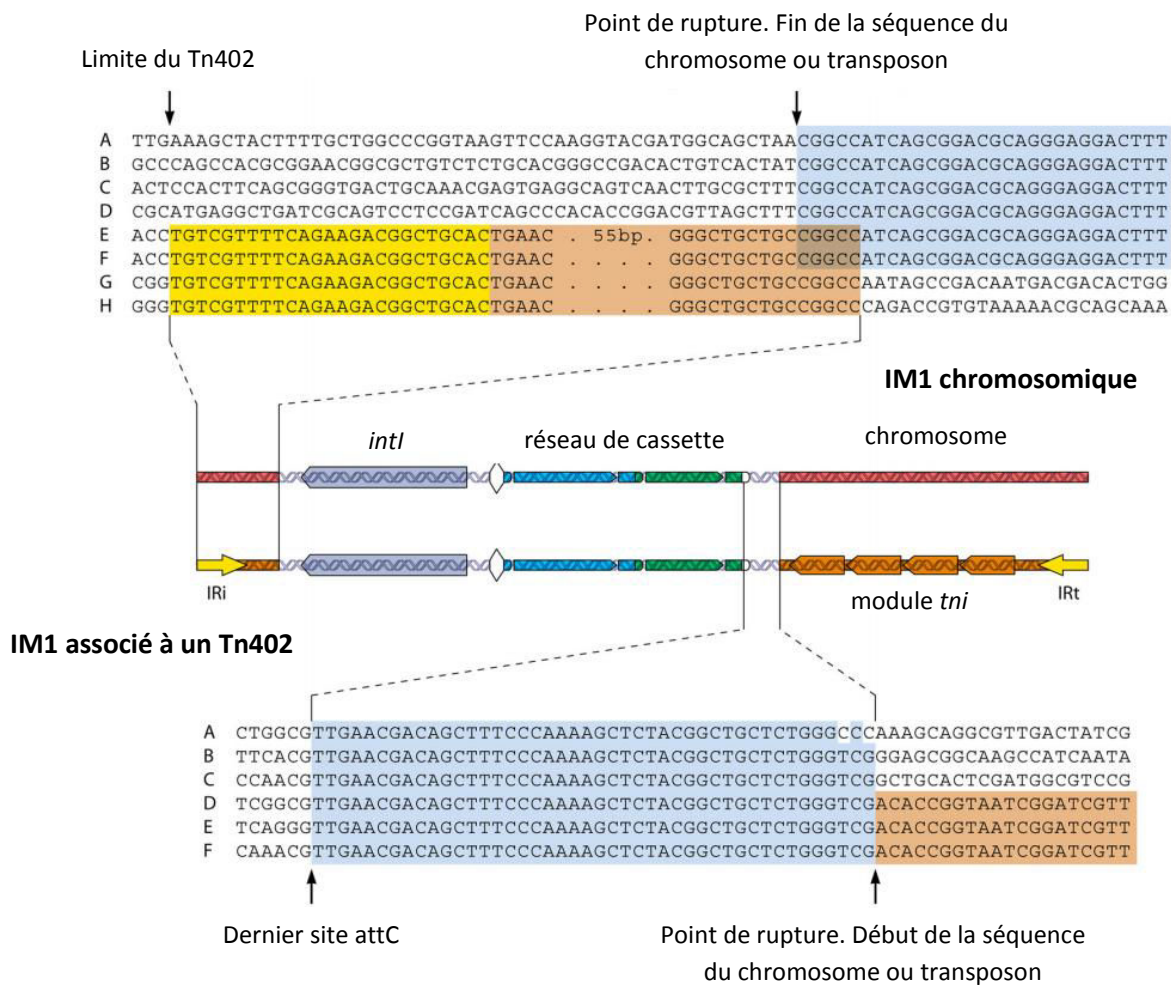


Figure 41 : Alignements de séquences d'IM1 chromosomiques et d'IM1 associés à des Tn402.

D'après Gillings 2014

Des représentations schématiques de l'IM1 chromosomique et de l'IM1 inséré dans le transposon Tn402 sont fournies. Les gènes sont indiqués sous forme de pentagones colorés (la pointe du pentagone indique le sens de transcription du gène) et le site attI sous forme de losange. Les flèches jaunes représentent les séquences inversées répétées bornant le transposon indispensables à sa transposition. Le module *tni* contient 4 gènes nécessaires à la transposition du Tn402.

Les séquences utilisées pour les alignements sont les suivantes : (A) IM1 chromosomique retrouvé chez une bactérie *Hydrogenophaga*, (B) IM1 chromosomique retrouvé chez une bactérie *Aquabacterium*, (C) IM1 chromosomique retrouvé chez une bactérie *Acidovorax*, (D) IM1 chromosomique retrouvé chez une bactérie *Imtechium*, (E) IM1 associé à un Tn402 retrouvé sur un plasmide IncP-1, (F) IM1 associé à un Tn402 retrouvé au sein d'un plasmide R751 chez *Enterobacter aerogenes*, (G) Tn402 sans intégron.

L'homologie de séquence (en bleu) entre des IM1 chromosomique (A,B, C et D) et des IM associés au transposon Tn402 (E et F) suggère qu'un transposon de la famille des Tn402 aurait pu « capturer » un IM1 chromosomique. Cette capture serait à l'origine des IM tels qu'on les connaît.

VII. Origine et histoire évolutive des intégrons.

L'origine des IM reste floue. Néanmoins on suppose aujourd'hui qu'ils seraient issus des intégrons chromosomiques sédentaires (ICS).

Différentes observations étayent cette hypothèse. Tout d'abord, les IM et ICS ont des structures et organisations similaires. Néanmoins les ICS seraient bien plus anciens que les IM. Des études de phylogénie sur des ICS de γ -protéobactéries semblent indiquer que l'ancêtre commun des *Vibrionales* et *Pseudomonales* portait un ICS chromosomique (Rowe-Magnus et al., 2001). Pour repère, les genres *Vibrio* et *Pseudomonas* auraient divergé il y a 300 à 800 millions d'années (Ochman and Wilson, 1987). Les ICS seraient donc des structures très anciennes. Autre observation étayant cette hypothèse, certaines cassettes retrouvées chez des IM1 possèdent des sites *attC* très similaires à ceux d'ICS retrouvés chez *Xanthomonas* et *Vibrio* (Rowe-Magnus et al., 2001). En outre, il a été montré que des sites *attC* d'ICS pouvaient être reconnus par l'intégrase IntI1 (Mazel et al., 1998). Les cassettes des IM dériveraient donc de celles des ICS.

La suite de l'histoire s'est précisée avec la découverte d'IM1 chromosomiques chez un certain nombre de β -protéobactéries environnementales (Gillings et al., 2008; Gillings, 2014; Stokes et al., 2006). L'alignement de certains de ces IM1 chromosomiques avec des IM1 associés à des transposons de type Tn402 semble démontrer que des IM1 chromosomiques auraient pu être capturés par le transposon Tn402 (Figure 41) (Gillings, 2014).

Cette capture *via* un mécanisme de recombinaison homologue (Figure 42, page suivante) aurait permis à l'intégron de disséminer *via* le transposon. C'est le début de l'histoire évolutive des IM1. Par la suite différentes recombinaisons et délétions auraient conduit à façonner la région 3'CS retrouvée chez une grande

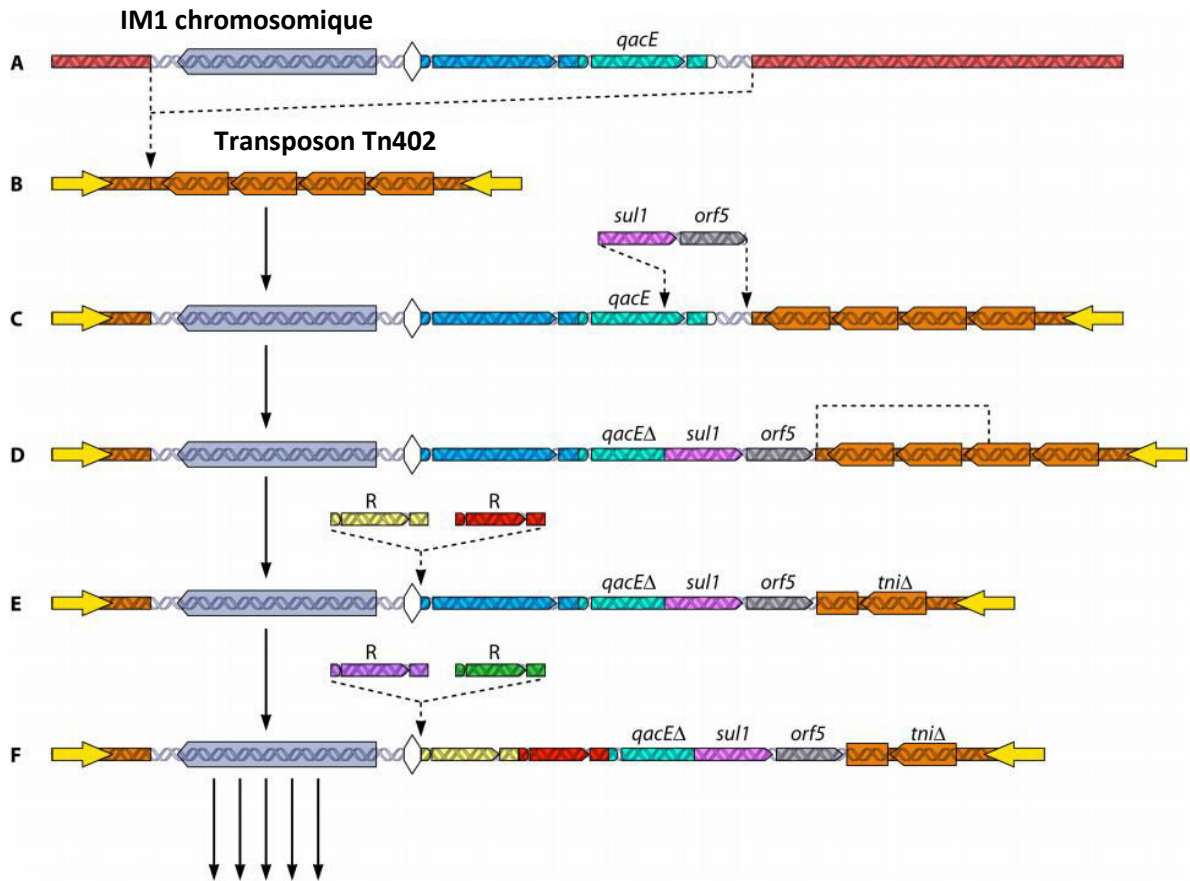


Figure 42 : Histoire évolutive des IM1. D'après Gillings 2014

- (A) L'ancêtre commun aux IM1 serait un IM localisé sur le chromosome d'une β -protéobactérie. Cet intégron contenait probablement le gène *qacE* dont on retrouve aujourd'hui les traces dans leur 3'CS.
- (B) Capture de l'ancêtre commun par un transposon de la famille des Tn402 probablement *via* un mécanisme de recombinaison homologue.
- (C) Un hybride transposon/intégron est créé. L'intégron gagne en mobilité et peut disséminer.
- (D) Capture d'un gène *sul1* (résistance aux sulfonamides) et de *orf5* par recombinaison homologue. Cette insertion délète la partie terminale du gène *qacE*. Le 3'CS des intégrons est formé et demeure aujourd'hui chez certains intégrons tel un vestige de cette histoire passée.
- (E) Au cours de l'évolution, des délétions au sein du module *tni* rendent le Tn402 non fonctionnel. Néanmoins, post inactivation, le transposon a pu s'insérer dans d'autres transposons (Tn3/Tn21) ou plasmides. Dans le même temps, l'intégron commence à acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques.
- (F) L'intégron continue à capturer de nouveaux gènes de résistance tout en continuant à disséminer jusqu'à devenir aujourd'hui la structure très prévalente et problématique que l'on connaît.

majorité des IM1 (Figure 42). Il est important de noter qu'au cours de l'évolution la machinerie de transposition du Tn402 a été perdue. Aujourd'hui peu d'IM1 sont encore associés à des Tn402 fonctionnels. Néanmoins avant de perdre leur mobilité, Tn402 a pu transposer au sein même d'autres transposons ou plasmides assurant aux intégrons leur mobilité.

De la même façon, les IM2 et IM3 seraient issus d'ICS capturés respectivement par un transposon de type Tn7 et Tn402 (Gillings, 2014).

L'origine des cassettes est elle aussi très floue. L'absence de promoteur au sein de ces éléments suggère qu'elles seraient issues d'éléments génétiques mobiles dont la mobilité inclut une étape de transcription (rétroéléments : rétrotransposons, introns) (Recchia and Hall, 1997). En 2009, a été proposé un modèle dans lequel les cassettes seraient formées par recombinaison homologue entre deux copies d'introns, l'une liée à un gène, l'autre à un site *attC* (Léon and Roy, 2009). Plus généralement, il est admis que les ICS sont un réservoir de cassettes pour les IM.

A retenir :

L'origine et l'histoire des intégrons reste ambiguës. Il est néanmoins admis que les IMs dérivent des ICS. L'histoire des IMs aurait commencé par la capture d'un intégron chromosomique par un transposon. Cette capture lui aurait permis de commencer à disséminer.

Néanmoins la suite de l'histoire n'est qu'hypothèse et atteste de la réelle nécessité d'études sur la dynamique évolutive des IMs.

Table 7 : Richesse en sites de recombinaison secondaires pour IntI chez différentes bactéries.

D'après Harms *et al.* 2013

Espèce bactérienne	Nombre de chromosomes étudiés	Ratio du nombre de sites de recombinaison secondaires observés sur attendus
<i>Acinetobacter baylyi</i>	1	1.002
<i>Acinetobacter baumannii</i>	12	1.223
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	0.387
<i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i>	8	0.791
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7	0.607
<i>Escherichia coli</i>	10	0.825

Pour évaluer le nombre de motifs potentiellement reconnus par la protéine Int au sein des chromosomes bactériens, le nombre d'occurrence du motif « GTTRRRY » (motif reconnu par la protéine au sein des sites *attI* et *attC*) a été compté grâce au programme pDraw (<http://acaclone.com>). Cette valeur a ensuite été rapportée au nombre de fois où le motif « GTTRRRY » serait attendu dans un chromosome de même taille généré aléatoirement. Les ratios dans le tableau renseignent donc de l'abondance de sites secondaires au sein des chromosomes bactériens. Un ratio de 1 atteste d'une espèce dans laquelle le nombre de site observée est égal au nombre de site attendu dans un chromosome de cette taille. Un ratio supérieur à 1 atteste d'un génome riche en sites de recombinaison aspécifiques. A l'inverse, plus le ratio tend vers 0, plus le chromosome de la bactérie est pauvre en site de recombinaison secondaire.

VIII. Coût biologique des intégrons.

Bien que les intégrons confèrent aux bactéries un extraordinaire potentiel adaptatif, très peu d'études se sont intéressées à leur coût biologique.

Les seuls travaux sur le sujet ont été réalisés dans le laboratoire du professeur Kaare Nielsen. Dans cette étude, trois IM1 isolés chez *Acinetobacter baumannii* et *Salmonella enterica* ont été insérés indépendamment dans le chromosome d'une souche de *Acinetobacter baylyi*. Le fitness des bactéries contenant l'intégron a ensuite été comparé à celui des bactéries sans intégron afin d'évaluer le coût biologique de la structure. Quelque soit l'intégron inséré dans le chromosome, le fitness de la bactérie était diminué. Les travaux rapportaient des coefficients de sélection de l'ordre de -0,07 à -0,11 signifiant que les bactéries porteuses d'intégron poussent entre 7 et 11% moins bien que les bactéries qui en sont dépourvues (Starikova et al., 2012). En parallèle de ces expériences de compétition, des expériences d'évolution sur quelques jours ont montré que très rapidement le gène *intl1* était inactivé chez *A. baylyi* par différentes mutations. L'inactivation du gène *intl1* restaurait également le fitness de l'hôte. Nielsen et son équipe en ont conclu que le coût biologique des intégrons chez *A. baylyi* était lié à l'expression du gène *intl1*. Ce coût serait lié à l'activité de recombinaison aspécifique de la protéine IntI1 et à l'instabilité génomique qu'elle produirait via des sites de recombinaison secondaires. Le lien a ensuite été fait entre la richesse en sites de recombinaison secondaires, chez le genre *Acinetobacter* et l'instabilité génomique (Table 7) (Harms et al., 2013).

Néanmoins ce résultat pose problème. Si l'expression du gène *intl1* est si délétère, pourquoi ce dernier a-t-il été conservé par l'évolution ? Pour répondre à cette problématique, Nielsen et son équipe ont développé un modèle mathématique en

partenariat avec une équipe australienne (Engelstadter et al., 2016). Ce modèle simule l'évolution de bactéries porteuses d'intégron dans un environnement sujet à des concentrations d'antibiotiques fluctuantes. La principale observation de ce modèle est que le coût biologique associé à un gène *intl* fonctionnel est compensé par le dynamisme qu'il procure à l'intégron dans un milieu soumis à des variations de pression antibiotique. Avec un gène *intl* fonctionnel, la bactérie est plus à même de s'adapter. C'est donc pourquoi il aurait été conservé.

Une autre réponse à cette problématique pourrait reposer sur la répression constitutive du gène *intl* par la réponse SOS. Chez les bactéries du genre *Acinetobacter*, la protéine LexA est absente (Robinson et al., 2010). L'expression du gène *intl* n'y est donc pas réprimée. Les résultats reportés par Nielsen et son équipe sont donc spécifiques d'un contexte bactérien dans lequel le gène *intl* n'est pas réprimé. La répression par la protéine LexA pourrait avoir été une réponse évolutive pour réduire le coût lié à l'expression du gène *intl* et favoriser sa persistance.

A retenir :

Si quelques travaux ont soulevé la question du coût biologique des intégrons, aucune étude n'a évalué ce coût dans un contexte où le gène *intl* était réprimé par la réponse SOS. Un contexte SOS qui est pourtant représentatif d'une grande partie des intégrons (Cambray et al., 2011).

En outre, il n'existe toujours aucune donnée concernant l'impact du polymorphisme du Pc sur le coût des intégrons. De même, la contribution du réseau de cassette à ce coût n'a jamais été évaluée.

Autant d'inconnues qui justifient une nouvelle étude du coût biologique des intégrons en contexte SOS-réprimé.

Objectifs du travail de thèse

Les intégrons sont des plateformes génétiques permettant aux bactéries de s'adapter facilement à des pressions environnementales. Ils leur permettent de capturer et d'exprimer une vaste panoplie de gènes sous forme de cassettes. Une centaine de cassettes de résistance aux antibiotiques existe et fait des intégrons une menace pour la santé publique dans un contexte où la lutte contre la résistance bactérienne est de plus en plus difficile. De plus, les intégrons sont également capables de disséminer entre les espèces bactériennes par l'intermédiaire de plasmides et/ou de transposons. Aujourd'hui, les intégrons sont retrouvés dans un grand nombre de bactéries à Gram négatif et sont une réalité à la fois clinique, vétérinaire et environnementale.

Si l'aspect mécanistique et la régulation des intégrons ont largement été étudiés, leur dynamique d'évolution est elle très mal caractérisée. Les rares études à ce sujet ont analysé l'effet de pressions antibiotiques sur la dynamique de réarrangement des cassettes. De même, les études sur le coût biologique des intégrons restent rares. Ce paramètre pourrait pourtant expliquer le succès et la distribution des intégrons.

Les travaux présentés dans ce manuscrit visent à préciser deux aspects de la **dynamique d'évolution des intégrons** :

- d'une part leur maintien dans les populations bactériennes dépendant du **coût biologique** de la structure,
- d'autre part l'**évolution du promoteur Pc** des intégrons en réponse à un stress antibiotique.

Pour répondre à ces questions, ce travail de thèse sera divisé en trois volets différents.

Dans le premier volet, nous évaluerons le **coût biologique des intégrons chez *E. coli***. De précédents travaux, évoqués en introduction, ont déjà évalué ce coût mais chez une espèce dans laquelle l'expression du gène *intl* n'est pas régulée par la réponse SOS. L'un des enjeux de cet axe sera donc d'évaluer l'effet de cette régulation sur le coût des intégrons. Nous évaluerons également l'impact de différents paramètres sur le coût de cette structure génétique notamment l'impact du polymorphisme du Pc et de la structure du réseau de cassette. Enfin, nous testerons dans quelle mesure une pression sub-inhibitrice d'antibiotiques influence la sélection de bactéries porteuses d'intégrons dans une population mixte. Tous ces résultats devraient permettre à terme de mieux appréhender le maintien et la dissémination des intégrons.

Dans un second volet, nous décrirons la **mise au point d'un système de chemostat** simple et abordable au laboratoire. Ce système devrait permettre à terme de réaliser des expériences d'évolution en s'affranchissant des limites de la propagation en batch. Dans ce volet, nous détaillerons brièvement quelques paramètres clés de l'optimisation du système avant de procéder à sa validation.

Enfin dans un troisième volet, nous mettrons à profit ce système de chemostat pour propager des bactéries porteuses d'intégrons sur un grand nombre de générations afin de suivre l'évolution du promoteur Pc au cours du temps. Ce travail s'appuie sur l'hypothèse que le promoteur PcW, retrouvé chez les ancêtres des IM1 (Gillings et al., 2008), serait le promoteur originel duquel auraient émergés les autres principaux variants de Pc. Cette évolution vers des Pc forts serait une réponse adaptative à des stress antibiotiques et se serait faite au détriment de l'activité de l'intégrase (Jové et al., 2010). Cette hypothèse n'a pourtant jamais été vérifiée

expérimentalement. Pour y répondre, nous évaluerons donc dans ce dernier volet **la dynamique d'évolution du promoteur Pc en réponse à un stress antibiotique.**

Résultats

**Axe 1 : Etude du coût biologique des
intégrons de classe 1 chez *E. coli*.**

La persistance des intégrons dans les bactéries va grandement dépendre de leur coût biologique. De précédents travaux avaient examiné le biologique des intégrons (Starikova et al., 2012). Néanmoins, cette étude a choisi un modèle particulier (*Acinetobacter baylyi*) dans lequel le répresseur LexA régulant l'expression de l'intégrase est absent (Hare et al., 2012). Il a pourtant été montré que l'expression de l'intégrase était régulée par la réponse SOS dans la majorité des intégrons (Cambray et al., 2011).

Dans ce travail, nous avons donc évalué le coût biologique des intégrons chez *E. coli*, une espèce bactérienne dans laquelle l'intégrase des intégrons est régulée par la réponse SOS. Par le biais d'expériences de compétitions bactériennes mettant en jeu des bactéries avec ou sans intégron, nous avons évalué l'impact de différents facteurs sur le coût de ces structures génétiques.

Class 1 integrons are low-cost structures in *Escherichia coli*

Yohann Lacotte ¹, Marie-Cécile Ploy* ¹ and Sophie Raherison * ¹

¹ Université de Limoges, INSERM, CHU Limoges, UMR_S 1092, Limoges, France.

***Corresponding authors:**

Sophie Raherison

Marie-Cécile Ploy

UMR-S 1092, Centre de Biologie et de Recherche en Santé

rue Bernard Descottes, 87042 Limoges, FRANCE

Phone: (+33) 5 19 56 42 56

Fax: (+1) 33 5 55 05 67 22

sophie.raherison@unilim.fr; marie-cecile.ploy@unilim.fr

Conflict of interest:

The authors declare no conflict of interest.

Abstract

Resistance integrons are bacterial genetic platforms that can capture and express antibiotic resistance genes embedded within gene cassettes. The capture and shuffling of gene cassettes are mediated by the integrase *IntI*, the expression of which is regulated by the SOS response in *E. coli*. Gene cassettes are expressed from a common *P_c* promoter. Despite the clinical and environmental relevance of integrons, the selective forces responsible for their evolution and maintenance are poorly understood. Here, we conducted pairwise competition experiments in order to assess the fitness cost of class 1 integrons in *E. coli*. We found that integrons are low-cost structures and that their cost is further reduced by their tight regulation. We show that the SOS response prevents the expression of costly integrases whose cost is activity-dependent. Thus, when an integron is repressed, its cost depends mostly on the expression of its gene cassettes array and increases with *P_c* strength and the number of cassettes in the array. Furthermore, different cassettes have different costs. Lastly, we showed that subinhibitory antibiotic concentrations promoted the selection of integron-carrying bacteria, especially those with a strong *P_c* promoter. These results provide new insights into the evolutionary dynamics of integron-carrying bacterial populations.

Introduction

The development and spread of antibiotic resistance among bacterial pathogens is a major public health issue (Levy and Marshall, 2004). Among the genetic elements involved in this spread, integrons are especially important, given their ability to capture and express resistance genes embedded within gene cassettes (Stokes and Hall, 1989).

Integrons are composed of three key elements: (i) an *intI* gene encoding an integrase that mediates the insertion, excision and shuffling of gene cassettes, (ii) an *attI* recombination site where cassettes are inserted, and (iii) a *Pc* promoter responsible for gene cassette expression (Cambray *et al.*, 2010). Several integron classes have been defined according to their integrase amino acid sequence (Mazel, 2006). Among them, class 1 integrons are highly prevalent in antibiotic-resistant Gram-negative bacteria (Escudero *et al.*, 2015).

In class 1 integrons, *intI1* gene expression is regulated by the SOS response (Guerin *et al.*, 2009), a bacterial stress response that can be triggered by various antibiotics (Baharoglu and Mazel, 2011). This regulation involves a specific repressor, LexA protein, which prevents *intI1* gene transcription. Upon activation of the SOS response by a stress generating single-strand DNA, the LexA repressor is cleaved and integrase expression is thereby enabled.

Gene cassettes are expressed from the common promoter *Pc*; at least 13 different *Pc* variants have been described in class 1 integrons. Four variants predominate, namely *PcW*, *PcH1*, *PcW_{TGN-10}* and *PcS*, from the weakest to the strongest (Jové *et al.*, 2010). Moreover, the closer a gene cassette is to the *Pc*, the stronger its expression (Collis and Hall, 1995). As *Pc* is located within the *intI1* gene, its polymorphism impacts the *IntI1* integrase amino acid sequence. Three *IntI1* variants

are thus associated with the four Pc variants: IntI1_{R32_H39} (PcW or PcH1), IntI1_{P32_H39} (PcW_{TGN-10}) and IntI1_{R32_N39} (PcS). A negative correlation between the strength of the Pc and the activity of its associated integrase has been shown: the weaker the Pc, the more active the integrase (Jové *et al.*, 2010).

Relatively few studies have focused on the evolution dynamics of class 1 integrons, with the exception of studies assessing the effect of antibiotic pressure on gene cassette reshuffling (Barraud and Ploy, 2015; Pérez-Valdespino *et al.*, 2016). Rearrangement of a gene cassette to a position closer to the Pc relies mainly on the excision of upstream cassettes rather than excision and reintegration of the cassette just ahead of the Pc (Barraud and Ploy, 2015). This suggests that gene cassette rearrangements *via* excision are probably more cost-effective than excision and integration of a distal gene cassette closer to the Pc. Indeed, the “cut and paste” mechanism leading to excision and re-integration of a gene cassette in the first position would require two recombination events, whereas excision of upstream cassettes requires only one recombination event. This raises questions as to the fitness cost associated with integrase activity and gene cassette expression.

Few studies have assessed the fitness cost of integrons. In particular, Starikova *et al.* assessed the impact of class 1 integrons in *Acinetobacter baylyi* (Starikova *et al.*, 2012). They showed that integron acquisition strongly reduced the fitness of *A. baylyi*, due to an active integrase and that inactivated integrases rapidly emerged to compensate for this biological cost. These data were used to create a mathematical model simulating the evolution of an integron-carrying bacterial population in response to fluctuating antibiotic pressure (Engelstadter *et al.*, 2016). The main conclusion was that gene cassette reshuffling, necessary to tolerate the fluctuating antibiotic pressure, could compensate for the integrase cost, enabling the

maintenance of functional integrases within bacterial populations. However, both studies relied on data retrieved from *Acinetobacter* which lacks LexA protein (Hare *et al.*, 2012). Yet, evidence of SOS regulation was found for most integrons (Cambray *et al.*, 2011).

The aim of the present study was thus to assess the fitness cost of class 1 integrons in *E. coli*, a species in which integrase expression is regulated by the SOS response. We show that class 1 integrons are low-cost structures and that their cost is further reduced by the repressive system. LexA protein prevents the expression of costly integrases, whose cost is linked to their catabolic activity. We also show that the fitness of a given integron is dependent both on Pc polymorphism and the gene cassettes content. Finally, we show that subinhibitory antibiotic concentrations can select integron-carrying bacteria. These results provide new insights into the evolutionary dynamics of integron-carrying bacterial populations.

Table 1. Strains and plasmids.

Strains or plasmids	Genotype or description	Source	
Strains			
<i>Escherichia coli</i> MG1656	MG1655 (K-12 F ⁻ λ ⁻ <i>ilvG</i> ⁻ <i>rfb-50 rph-1</i>) Δ <i>lacMluI</i>	(Espéli et al., 2001)	
<i>Escherichia coli</i> MG1656 <i>λatt::gfp</i>	MG1656 strain containing the <i>gfpmut3</i> gene at the <i>λatt</i> site	This study	
<i>Escherichia coli</i> MG1656 Δ <i>cpXl::km-frt</i>	<i>cpXl</i> gene replaced by the <i>km-frt</i> cassette in strain MG1656	(Beloin et al., 2004)	
Plasmids			
pKOBEGA	λ red recombination system expression plasmid	(Chaveroche et al., 2000)	
pCP20	FLP flippase expression plasmid	(Cherepanov and Wackernagel, 1995)	
pZE1- <i>gfpmut3</i>	<i>gfpmut3</i> gene under the control of the constitutive pλ _R promoter	Gift from C. Guet	
pZE- <i>km-frt-gfpmut3</i>	<i>km-frt</i> cassette amplified from MG1656Δ <i>cpXl::km-frt</i> using primers 7-8 (Table 1S) and cloned into pZE1R- <i>gfpmut3</i> (SacI-XhoI).	This study	
p1W	integron <i>intI1-aac(6')-Ib-dfrA15-aadA1-catB9</i> with PcW promoter cloned into pSU38Δ <i>totlacZ</i>	(Barraud and Ploy, 2015)	
p1S	integron <i>intI1-aac(6')-Ib-dfrA15-aadA1-catB9</i> with PcS promoter cloned into pSU38Δ <i>totlacZ</i>	(Barraud and Ploy, 2015)	
p1W _{TGN-10}	integron <i>intI1-aac(6')-Ib-dfrA15-aadA1-catB9</i> with PcW _{TGN-10} promoter cloned into pSU38Δ <i>totlacZ</i>	(Barraud and Ploy, 2015)	
p16S ^a	integron <i>intI1-aac(6')-Ib-dfrA15-aadA1-catB9-aac(6')-Ib-dfrA15-aadA1-catB9</i> cloned into pSU38Δ <i>totlacZ</i>	(Barraud and Ploy, 2015)	
p8741	pBAD:: <i>intI1</i> _{Y312F}	(Loot et al., 2014)	
#	pZA2 and derivatives		
1	pZA2	pZA2 plasmid, Km ^r	(Lutz and Bujard, 1997)
2	pW-4GC	integron <i>intI1-aadA1-catB9-aac(6')-Ib-dfrA15</i> with PcW promoter cloned into pZA2	This study
3	pH1-4GC	integron <i>intI1-aadA1-catB9-aac(6')-Ib-dfrA15</i> with PcH1 promoter cloned into pZA2	This study
4	pW _{TGN-10} -4GC	integron <i>intI1-aadA1-catB9-aac(6')-Ib-dfrA15</i> with PcW _{TGN-10} promoter cloned into pZA2	This study
5	pS-4GC	integron <i>intI1-aadA1-catB9-aac(6')-Ib-dfrA15</i> with PcS promoter cloned into pZA2	This study
6	pW PintI*-4GC	pW-4GC with inactivated PintI promoter (no <i>intI1</i> expression)	This study
7	pH1 PintI*-4GC	pH1-4GC with inactivated PintI promoter (no <i>intI1</i> expression)	This study
8	pW _{TGN-10} PintI*-4GC	pW _{TGN-10} -4GC with inactivated PintI promoter (no <i>intI1</i> expression)	This study
9	pS PintI*-4GC	pS-4GC with inactivated PintI promoter (no <i>intI1</i> expression)	This study
10	pW*PintI*-4GC	pW-4GC with inactivated Pc promoter and inactivated PintI promoter (no <i>intI1</i> expression nor cassette expression)	This study
11	pW*-4GC	pW-4GC with inactivated PcW promoter (silent mutation, IntI1 _{R32-H39} integrase variant, no cassette expression)	This study
12	pW _{TGN-10} *-4GC	pW _{TGN-10} -4GC with inactivated PcW _{TGN-10} promoter (silent mutation, IntI1 _{P32-H39} integrase variant, no cassette expression)	This study
13	pS*-4GC	pS-4GC with inactivated PcS promoter (silent mutation, IntI1 _{R32-N39} integrase variant, no cassette expression)	This study
14	pW*lexA*-4GC	pW-4GC with inactivated PcW promoter (no cassette expression) and IntI1 _{R32-H39} constitutive expression (mutated LexA box)	This study
15	pW _{TGN-10} *lexA*-4GC	pW _{TGN-10} -4GC with inactivated PcW _{TGN-10} promoter (no cassette expression) and IntI1 _{P32-H39} constitutive expression (mutated LexA box)	This study

Materials and Methods

Bacteria and plasmids

The bacteria and plasmids used in this study are listed in Table 1. Strains were grown in Luria-Bertani broth (LB) (MoBio laboratories, Carlsbad, CA USA) or Davis Minimal (DM) broth (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO USA) supplemented with 25 µg/ml glucose (DM25 medium). Kanamycin (Km, 25 mg/L) and tobramycin (Tob, various concentrations) were added when necessary.

All integrons were generated by assembly PCR, as described in Figure 1S, and cloned into a pZA2 backbone *via* the XhoI and BamHI restriction sites.

Construction of the MG1656 $\lambda att::gfp$ strain

The MG1656 $\lambda att::gfp$ strain, expressing green fluorescent protein (GFP), was constructed by integrating a *km-frt-gfpmut3* cassette at the *E. coli* λatt site in a three-step PCR-based approach as previously described (Cherepanov and Wackernagel, 1995). Primers used are available in Table 1S.

Determination of minimal inhibitory concentrations

MICs were determined by broth dilution with an inoculum of 10^5 CFU/mL in DM25 medium. Each test was done at least three times.

Competition experiments

The fitness of the MG1656 strain carrying a given plasmid, relative to the MG1656 $\lambda att::gfp$ strain containing another plasmid, was estimated in pairwise competition experiments (Lenski *et al.*, 1991). Briefly, independent pre-cultures of both competitors were grown in DM25 overnight and mixed at a 1:1 volume ratio the following day. Fresh DM25 cultures were then inoculated with this mix performing a

16	pS*lexA*-4GC	pS-4GC with inactivated PcS promoter (no cassette expression) and Int11 _{R32-N39} constitutive expression (mutated LexA box)	This study
17	pW _{Y312F} *lexA*-4GC	pW* lexA*-4GC encoding an inactive integrase (catalytic amino-acid Y312 mutated)	This study
18	pS-2GC	integron <i>int11-aadA1-catB9</i> with PcS promoter cloned into pZA2	This study
19	pW*PintI*-2GC	pS-2GC with inactivated Pc promoter and inactivated PintI promoter (no <i>int11</i> expression nor GCs expression)	This study
20	pS- <i>aadA1</i>	integron <i>int11-aadA1</i> with PcS promoter cloned into pZA2	This study
21	pS- <i>catB9</i>	integron <i>int11- catB9</i> with PcS promoter cloned into pZA2	This study
22	pS- <i>aac(6')-Ib</i>	integron <i>int11- aac(6')-Ib</i> with PcS promoter cloned into pZA2	This study
23	pS- <i>dfrA15</i>	integron <i>int11- dfrA15</i> with PcS promoter cloned into pZA2	This study
24	pW*PintI*- <i>aadA1</i>	pW- <i>aad</i> with inactivated Pc promoter and inactivated PintI promoter (no <i>int11</i> expression nor GCs expression)	This study
25	pW- <i>aac(6')-Ib</i>	integron <i>int11- aac(6')-Ib</i> with PcW promoter cloned into pZA2	This study

GC = gene cassette

100-fold dilution. Cultures were then propagated for four days with a daily 100-fold dilution in fresh medium. Samples were taken each day to follow the relative frequency of the two competitors by flow cytometry.

Flow cytometry

The relative frequency of GFP bacteria was determined with a BD FACSCalibur™ flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA). Measurements were performed directly on bacterial cultures. Bacterial cells were gated on the basis of their distribution on forward vs side scatter plots. GFP bacteria were then separated from non GFP bacteria by using the fluorescent marker. Green fluorescence was collected in the FL1 channel (530 ± 15 nm). Thresholds were applied manually to determine the boundaries between the two populations, and remained constant throughout all the experiments. The relative frequency of the two competitors was calculated by counting 10 000 bacterial cells. All measurements were made in triplicate. Controls were performed to assess the level of false positives and false negatives in GFP quantification. Both were shown to be negligible and constant throughout independent daily measurements (Supplementary data, Figure 2S).

Calculating the selection coefficient

For each competition, the selection coefficient of the non GFP strain was determined from the slope of the regression $\ln [\text{freq}_{\text{nonGFP}}/\text{freq}_{\text{GFP}}]$ plotted against the time course in generations (Lenski, 1991). Experiments were performed in at least 12 replicates. A single regression line was then fitted through the points from all replicates (Rodríguez-Verdugo *et al.*, 2013 and Schrag *et al.*, 1997). Reported standard errors and *p* values were calculated for the regression coefficient. Error bars correspond to the 99% confidence interval. The fluorescent reporter used in the MG1656 $\lambda\text{att}::\text{gfp}$

strain had no cost when compared with the MG1656 parental strain (Supplementary data, Table 2S).

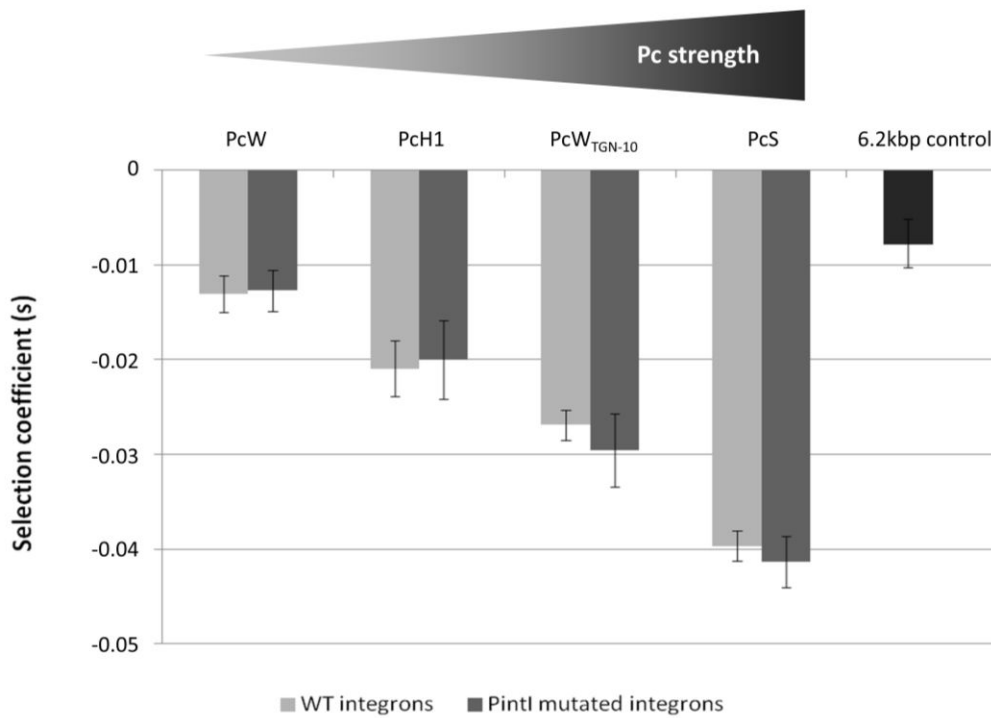


Figure 1: Effect of Pc polymorphism on the cost of a class 1 integron in *E. coli*.

MG1656 strains containing plasmid-borne integrons varying only by their Pc sequence were placed in competition with the MG1656 $\lambda att::gfp + pZA2$ strain (Figure 3S.A). Experiments were performed with either wild-type (WT) integrons (plasmids 2 to 5 in Table 1) or *PintI*-mutated integrons (no *intI1* expression, plasmids 6 to 9 in Table 1). The 6.2 kbp control plasmid (no *intI1* expression or cassette expression, plasmid 10 in Table 1) was used to evaluate the effect of plasmid size between plasmid pZA2 (2.1 kbp) and the integron-carrying plasmids (6.2 kbp).

Table 2. MICs of MG1656 strains containing the four gene cassettes with different Pc variants.

	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	SPT	CHL	TOB	TMP
MG1656 + pZA2	2	4	0.25	-
MG1656 + pW-4GC	128	16	4	-
MG1656 + pH1-4GC	256	32	8	-
MG1656 + pW _{TGN-10} -4GC	512	64	16	-
MG1656 + pS-4GC	512	128	16	-

Trimethoprim MICs were not determined due to solubility issues in DM25 medium. SPT = streptomycin, CHL = chloramphenicol, TOB = tobramycin, TMP = trimethoprim.

Results

Effect of Pc polymorphism on the cost of class 1 integrons in E. coli

We first assessed the impact of Pc polymorphism on the cost of class 1 integrons in *E. coli* by performing pairwise competition experiments between strains carrying and lacking the integron (Figure 3S.A). Integrons differing only by their Pc sequence were used (plasmids 2 to 5, Table 1).

Whatever the Pc variant, integrons appeared to be costly for *E. coli* (Figure 1, light grey). The selection coefficients of the integron-carrying strains were all negative, ranging from -0.013 ± 0.002 to -0.04 ± 0.003 (all p values $< 1 \times 10^{-10}$), meaning that the integrons slowed bacterial growth by 1.3% to 4%. Interestingly, the cost of class 1 integrons appeared to correlate with the Pc strength: the stronger the Pc, the costlier the integron (Figure 1). This correlation was associated with higher resistance level as we observed that stronger Pc variants (PcS and PcW_{TGN-10}) exhibit higher resistance levels (Table 2).

We further examined whether or not the observed cost was due solely to gene cassette expression. We therefore performed competition experiments using the same above-mentioned plasmids but with mutations in the *PintI* promoter which prevented *intI1* expression (plasmids 6 to 9, Table 1) (Guérin *et al.*, 2011). The overall cost of the integron was similar whether *PintI* was mutated or not, suggesting that, in wildtype conditions in which *intI1* is repressed, the fitness cost of an integron is due to gene cassettes expression (Figure 1).

The strain with plasmid 10 was used as a control to assess the contribution of the 6.2 kpb plasmid to host fitness. In this plasmid, the *PintI* and Pc promoters were both mutated in order to relate its cost to its size alone (no expression of the *intI1* gene

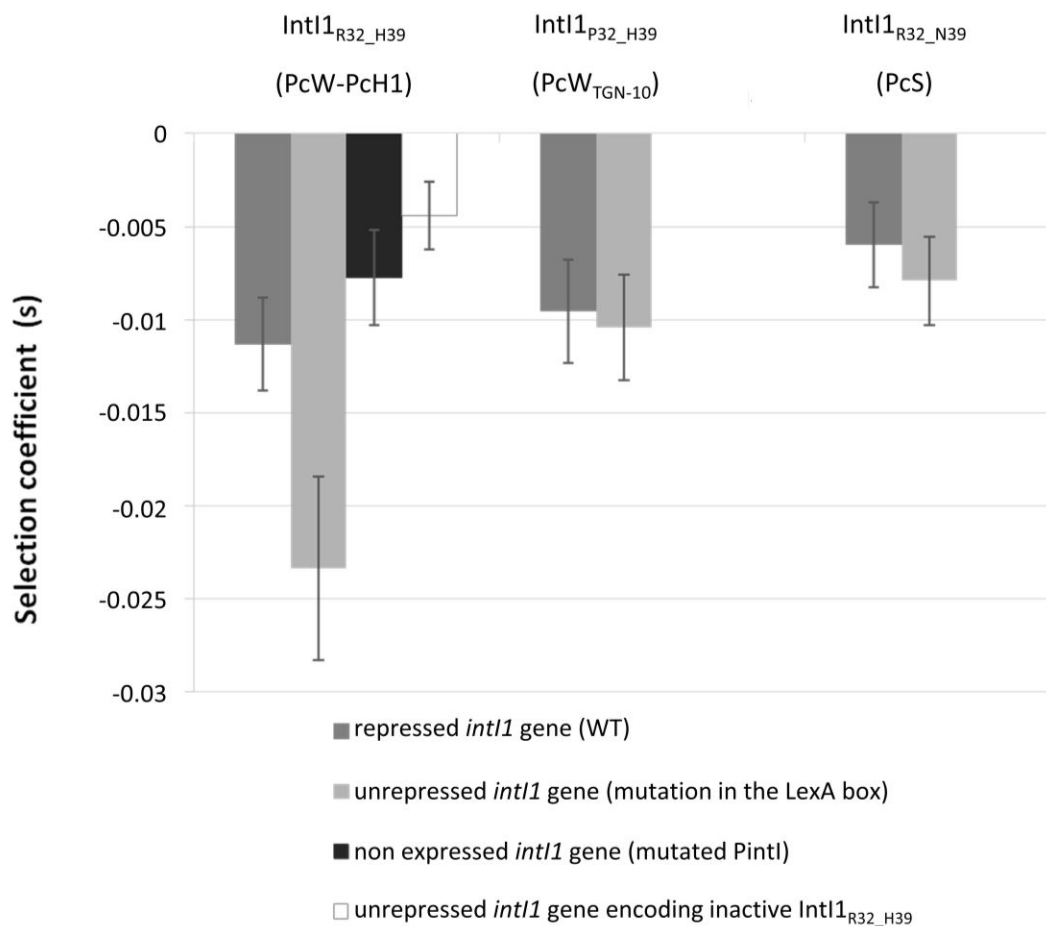


Figure 2: The cost of integrase expression.

The MG1656 *λatt::gfp* + pZA2 strain was placed in competition with MG1656 strains carrying plasmidic integrons with a mutated Pc promoter (no gene cassette expression, plasmids 11 to 17, Table 1). Mutations were silent, so as not to affect the IntI1 protein variant encoded by the *intI1* gene. The *intI1* gene was either repressed (plasmid 11 to 13) or unrepressed (plasmids 14 to 17). Derepression of the *intI1* gene was achieved by mutating the LexA box and thus preventing repressor binding. Plasmid 17 encoded an inactive integrase. Plasmid 10, with neither *intI1* nor gene cassette expression (Table 1), was used as a control.

and gene cassettes, Guérin *et al.*, 2011). The selection coefficient for this plasmid ($s = -0.008 \pm 0.003$, $p < 1 \times 10^{-8}$) showed that the 6.2 kbp plasmidic backbone itself slowed bacterial growth by 0.8% (Figure 1).

The IntI1 fitness cost is related to integrase catalytic activity

To assess the fitness cost of integrase expression, we used integron-carrying MG1656 strains in which the Pc promoter was mutated, thus preventing gene cassette expression without affecting the IntI1 protein sequence (plasmids 11 to 16, Table 1) (Guérin *et al.*, 2011). The integrons contained either the normally repressed *intI1* gene (plasmids 11 to 13) or the unrepressed *intI1* gene (mutated LexA binding site) (plasmids 14 to 16). Competition experiments were performed with each IntI1 protein variant: IntI1_{R32_H39} (associated with the PcW or PcH1 promoter), IntI1_{P32_H39} (associated with PcW_{TGN-10}) and IntI1_{R32_N39} (associated with PcS).

Whatever the Pc variant, when the *intI1* gene was repressed, its cost was not different from the control in which the PintI promoter was mutated (Figure 2). This confirmed that when *intI1* is repressed, the observed cost of an integron is only due to gene cassettes expression. When unrepressed (mutated LexA binding site), a 2-fold increase in fitness cost was observed with the integron encoding IntI1_{R32_H39} integrase (the integrase associated with the PcW sequence), rising from -0.011 ± 0.002 when repressed to -0.023 ± 0.004 when unrepressed ($p < 1 \times 10^{-10}$, Figure 2). Interestingly, IntI1_{R32_H39} is also the most active integrase (Jové *et al.*, 2010). To determine whether the cost of this integrase was related to its catalytic activity, we used the MG1656 strain carrying an integron with a mutated *intI1* gene encoding a non-functional IntI1_{R32_H39} variant (IntI1_{Y312F}) (plasmid 17, Table 1). The Y312F mutation was sufficient to abrogate the cost associated with the IntI1_{R32_H39} integrase (Figure 2).

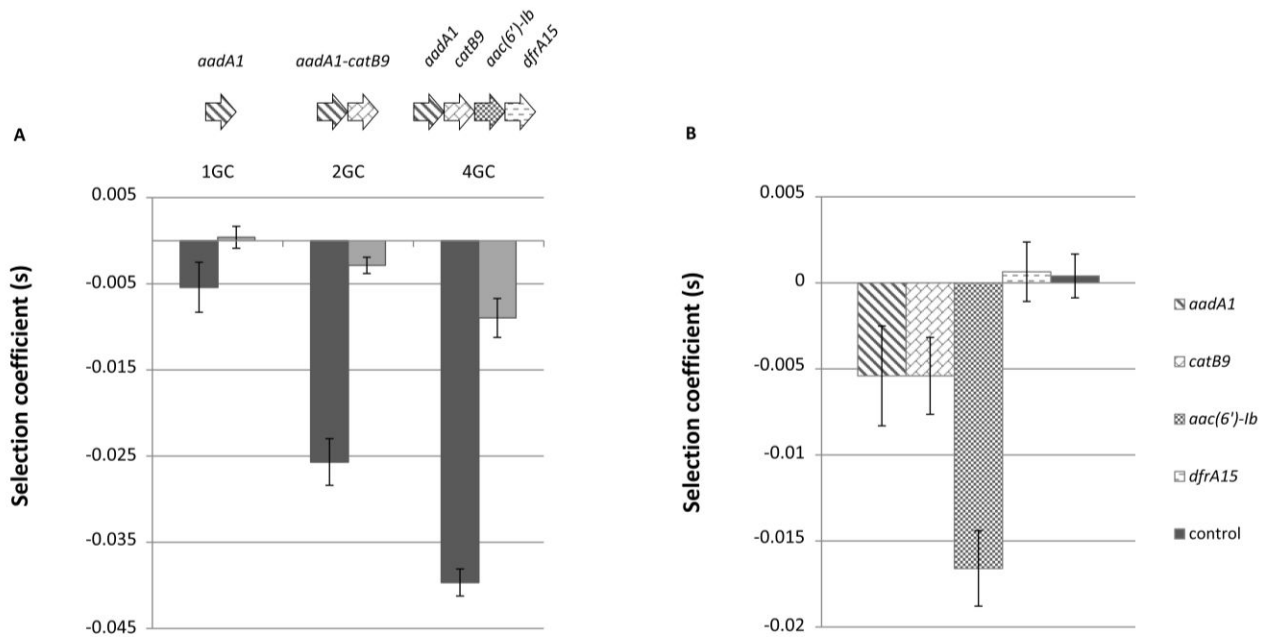


Figure 3: Effect of the gene cassettes array content.

A- Effect of cassettes network size

MG1656 strains containing plasmidic integrons, varying only by the number of gene cassettes (GC) they carried (plasmids 5, 18 and 20, Table 1), were placed in competition with the MG1656 $\lambda att::gfp + pZA2$ strain (Figure 3S.B). For each condition (1, 2 or 4 gene cassettes), control plasmids with neither *intI1* nor cassette expression (plasmids 10, 19 and 24, Table 1S) were used to evaluate the inherent cost of carrying this plasmid size (light grey).

B- Influence of the nature of the gene cassettes

Competition experiments were performed between the MG1656 $\lambda att::gfp + pZA2$ strain and MG1656 strains carrying plasmids with a one-cassette integron (plasmids 20 to 23, Table 1) (Figure 3S.C). The cassette was *aadA1*, *catB9*, *aac(6')-Ib* or *dfrA15*. Plasmid 24 was used as a control to evaluate the carriage cost of this plasmid size.

Influence of the cassette array contents

As cassette arrays can vary by their size and gene content, we wondered whether these two parameters might impact the global cost of integrons.

We first analyzed the fitness cost in MG1656 strains carrying integrons with one, two or four gene cassettes under the control of the strong promoter variant PcS (plasmids 20, 18 and 5). As controls, plasmids 10, 19 and 24, in which the Pc and Pintl promoters were both mutated, were used to evaluate the inherent cost related to plasmid size. We found that the cost of an integron increased with the number of gene cassettes (Figure 3A), rising 8-fold from 1 to 4 gene cassettes. A minor part of this cost was related to plasmid size (Figure 3A, light grey).

To estimate the influence of the nature of the gene cassettes, we performed competition experiments with MG1656 strains carrying an integron in which only one cassette was fully expressed from the strong Pc variant. Four gene cassettes were tested: *aadA1*, *catB9*, *aac(6')-Ib* and *dfrA15* (plasmids 20 to 23, Table 1). As shown in Figure 3B, the cost of an integron was found to be dependent on the gene cassette it contained. The *aac(6')-Ib* gene cassette was the costliest, with a selection coefficient of -0.017 ± 0.002 ($p < 1 \times 10^{-10}$). Cassettes *catB9* and *aadA1* were slightly detrimental, with respective costs of -0.005 ± 0.002 ($p < 1 \times 10^{-8}$) and -0.005 ± 0.003 ($p < 1 \times 10^{-10}$). Given the detection limit of our approach (detection of fitness differences $\geq |2 \cdot 10^{-3}|$), the *dfrA15* gene cassette appeared to bear no cost.

Impact of subinhibitory antibiotic concentrations

To study whether subinhibitory antibiotic concentrations favor bacteria carrying integrons with appropriate resistance gene cassettes, we analyzed the impact of a subinhibitory tobramycin (Tob) concentration on the cost of a four-cassettes integron

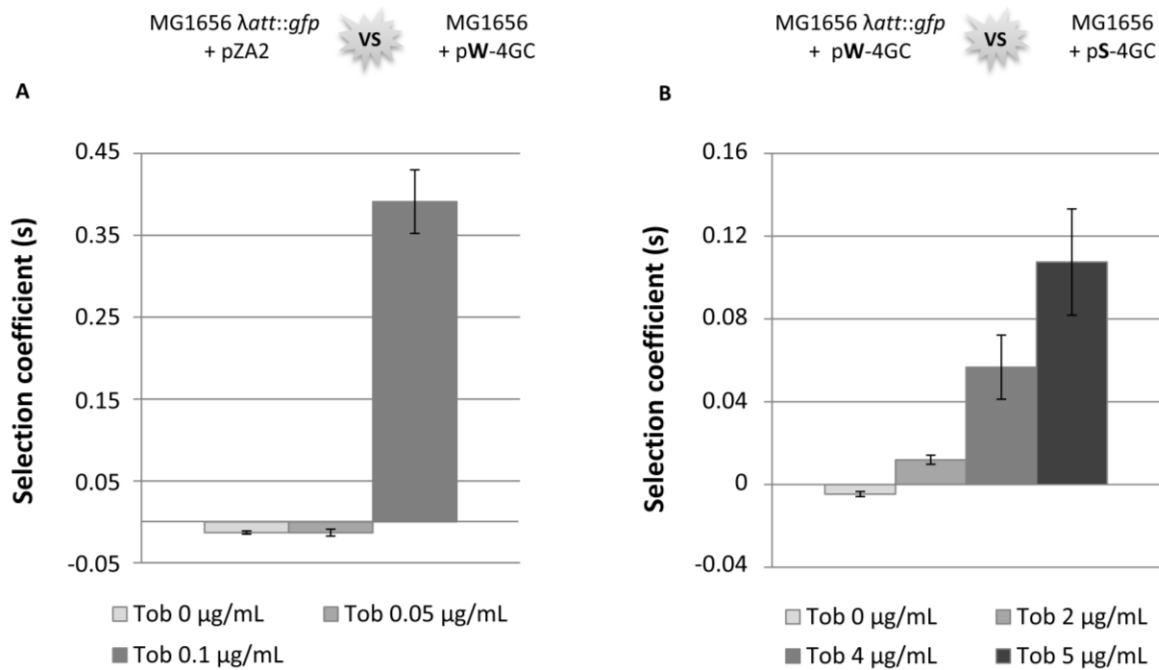


Figure 4: Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on integron carriage.

A- Integron with PcW

Competition experiments were performed between GFP bacteria without an integron (MG1656 $\lambda att::gfp$ + pZA2) and non GFP bacteria carrying an integron (MG1656 + plasmid 2, Table 1). Different subinhibitory tobramycin (Tob) concentrations were added to the growth media during competition. These concentrations were chosen to be below the MIC of the most susceptible competitor (0.25 $\mu\text{g/mL}$).

B- Integrons with different Pc

Competition experiments were performed between two bacteria carrying the same integron except for the Pc variant, one with a weak Pc promoter (GFP bacteria with plasmid 25, Table 1) and the other with a strong Pc promoter (non GFP bacteria with plasmid 22, Table 1) (Figure 3S.D). Subinhibitory Tob concentrations below the MIC of the more susceptible competitor (8 $\mu\text{g/mL}$) were added to the growth media during competition.

containing the *aac(6')-Ib* cassette in third position within the array (MIC 4 µg/mL). Competition experiments between resistant bacteria carrying the integron and susceptible strain lacking the integron were performed in the presence of various subinhibitory Tob concentrations. The chosen concentrations were 2.5 (0.1 µg/mL) and 5 times (0.05 µg/mL) lower than the MIC of the strain without the integron (MIC 0.25 µg/mL).

No effect was observed at 0.05 µg/mL Tob but, at 0.1 µg/mL, bacteria carrying the integron appeared superfit ($s = 0.39 \pm 0.04$, $p < 1 \times 10^{-10}$, Figure 4A). They grew 1.39 times faster than their integron-less counterparts, showing that subinhibitory antibiotic concentrations can favor the selection of bacteria containing an integron with an appropriate resistance gene and thereby promote the maintenance and dissemination of integrons.

To determine whether subinhibitory antibiotic concentrations could favour the maintenance of integrons with given promoter variants, we performed direct competition experiments between bacteria carrying integrons with either a weak Pc (PcW, plasmid 25, Table 1) or a strong Pc (PcS, plasmid 22, Table 1, Figure 3S.D), in the absence and presence of subinhibitory Tob concentrations (Figure 4B). Again, the chosen Tob concentrations were below the MIC of the most susceptible bacteria (8 µg/mL).

In the absence of tobramycin, bacteria carrying the integron with the weak Pc were fitter than those carrying the integron with the strong Pc. However, when tobramycin was added, the selection coefficient became positive, showing that the bacteria carrying the integron with the strong Pc became fitter than those with the weak Pc. Tob concentrations from 2 to 5 µg/mL were tested. Selection coefficients rose from 0.012 ± 0.002 ($p < 1 \times 10^{-10}$) at the lowest Tob concentration to 0.107 ± 0.003 ($p <$

1×10^{-10}) at the highest Tob concentration, meaning that bacteria carrying the integron with the strong Pc grew 1.2% to 10.7% faster, depending on the antibiotic concentration (Figure 4B). These results show how integrons associated with strong Pc variants confer a major fitness advantage in the presence of subinhibitory antibiotic concentrations.

Discussion

This study shows that class 1 integrons are low-cost structures in *E. coli*. A previous meta-analysis involving 760 chromosomal resistance mutations and 49 resistance plasmids suggested that the average cost of chromosomal and plasmid-borne resistance was equivalent to a 21% and 9% decline in host fitness, respectively (Vogwill and MacLean, 2015). Thus with a 1.3% to 4% decrease in the host fitness, integron-mediated resistance would be 2 to 7 times less costly than plasmidic resistance, and 5 to 15 times less costly than chromosomal resistance. Furthermore, in this study we used a p15a replicon yielding approximately 15 plasmid copies per bacterial cell. In clinical and environmental settings, class 1 integrons are found mainly in low copy plasmids. Roughly, their cost might even be 5 times smaller for a natural integron-bearing plasmid with 3 copies such as the R388 plasmid (Avila and de la Cruz, 1988). In return for this very low fitness cost, integrons would allow *E. coli* to adapt more readily to antibiotic pressure.

This very low cost could explain why integrons are highly prevalent in *E. coli* and, probably, in many other *Enterobacteriaceae* (Ahmed *et al.*, 2005; Guerra *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2006). Dissemination alone cannot explain the success of integrons. Indeed, while dissemination has contributed to expanding the host range of integrons, newly acquired genetic elements are not necessarily maintained in bacterial populations. For instance, a previous study showed that various IncA/C plasmids harbouring the *bla*_{CMY-2} resistance gene were lost in the absence of antibiotic selective pressure (Subbiah *et al.*, 2011). Likewise, selective pressure alone cannot explain integron maintenance in bacterial populations. Indeed, integrons have been found in environments preserved from the effects of human activity (Gaze *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2008). The very low cost of integrons might

therefore have favoured their maintenance and spread in bacterial populations, notably in antibiotic-free environments. Moreover, this would help bacteria to retain resistance cassettes in the absence of antibiotic pressure, keeping them readily available in the event of antibiotic stress.

The low cost of class 1 integrons in *E. coli* could be explained by the tight regulation of integrase expression. Indeed, we found that LexA-mediated repression of *intI1* expression significantly lowered the cost of integrons (Figure 2). Regulatory systems that reduce the cost of resistance determinants have already been described. In *Enterococcus* for instance, the cost of the vancomycin resistance operon is lowered by a tight regulatory mechanism (Foucault *et al.*, 2010). Previously, the regulation of a tetracycline resistance operon derived from a Tn10 transposon was found to abrogate the cost of the structure in *E. coli* (Nguyen *et al.*, 1989). LexA regulation of integrase expression could therefore be an adaptive response designed to lower the cost of integrons and thereby to favour their maintenance and dissemination.

LexA-mediated repression of integrase expression might also be an adaptive response designed to prevent the loss of a costly protein. Truncated and inactivated *intI1* genes are commonly found in bacteria (Gillings *et al.*, 2005; Nemergut *et al.*, 2008). This loss of integrase functionality could be due to the burden they represent for the host. Yet, *in silico* evolutionary studies have shown the importance of integrase integrity and functionality for adaptation to environmental challenges (Engelstadter *et al.*, 2016). Interestingly, an *in silico* study correlated the loss of integrase functionality with the absence of LexA-mediated regulation in bacteria, suggesting that the integrase would be lost when *intI1* gene expression was not regulated by the SOS response (Cambray *et al.*, 2011). Further evidence of the protective role of LexA regulation came from evolutionary experiments with integron-

containing *Acinetobacter baylyi*, a species lacking the LexA repressor, in which frameshift mutations rapidly emerge to inactivate Int11 protein and to restore host fitness (Starikova *et al.*, 2012). LexA repression could therefore have been needed to prevent the loss of a costly but adaptively important gene.

Interestingly, we found that the cost of a given integrase was related to its catalytic activity (Figure 2): integrase with high activity (Int11_{R32_H39}) was costlier than those with low activity (Int11_{P32_H39} and Int11_{R32_N39}). Furthermore, a single mutation in the catalytic amino acid codon of this highly active integrase was sufficient to abolish its cost. It has been proposed that the cost of an integrase may be related to the genomic instability it confers (Starikova *et al.*, 2012). Even though the Int11 integrase mostly catalyzes recombination reactions between *attI* and *attC* sites carried by integrons and cassettes, it can also recognize non canonical sites in the host genome and thereby create genomic instability (Recchia *et al.*, 1994). Recent work has notably highlighted the importance of *attI* x *attI* recombination *in vivo*. Despite having a lower recombination rate when compared with *attI* x *attC* reaction, *attI* x *attI* recombination involves sites that do not require a proper folding to become recombinogenic (in contrast with *attC* sites) (Escudero *et al.*, 2016). Thus, *attI* x *attI* reactions could be more prevalent than previously thought. As a GNT is sufficient to become a secondary *attI* site (Recchia *et al.*, 1994), such recombination events are likely to be very important in integrase-mediated genome instability. In this context, a more active integrase would generate more recombination events and create more instability, thus being more deleterious for the host.

Our results also demonstrate that the cost of class 1 integrons correlates with the strength of the Pc promoter (Figure 1): the stronger the Pc (and thus the expression level of antibiotic resistance), the costlier the integron. Epidemiological studies

revealed a high prevalence of integrons associated with weak Pc variants (PcW and PcH1) in *Enterobacteriaceae* (Vinué *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2013). This high prevalence could be explained by the observation that integrons with a weak Pc, encoding high-activity integrases (Jové *et al.*, 2010), are adaptively advantageous. Indeed, more efficient integrases would allow bacteria to adapt more efficiently to challenging environments by acquiring new gene cassettes. Besides, we show that integrons associated with weak Pc variants are also the least costly. Thus, weak Pc promoters would be doubly advantageous, favouring both integron maintenance and environmental adaptation.

Furthermore, the gene cassette contents also affect the cost of class 1 integrons: the higher the number of cassettes in the array, the costlier the integron (Figure 3A). This observation is consistent with previous reports on the cost of plasmidic resistance, showing that the average cost of a plasmid increases with the number of resistance genes it carries, independently of the size of the plasmid (Vogwill and MacLean, 2015). This could explain why class 1 integrons usually carry a limited number of gene cassettes (2 or 3 on average, and up to 10; Integrall database, <http://integrall.bio.ua.pt/>). However, this correlation between the cost of an integron and its size has to be balanced. Indeed, it has been shown that the level of gene cassette expression is directly dependent on its distance from the Pc promoter (Collis and Hall, 1995) and that the expression level is reduced by the action of *attC* secondary structure which impedes translation activity (Jacquier *et al.*, 2009). Thus, beyond a certain number of cassettes, host fitness might increase only slightly as further cassettes are acquired.

The gene cassette content also seems to impact host fitness. In a model of a one-cassette integron, we found that different gene cassettes had different costs, *aadA1*

and *dfrA15* being the least costly and *aac(6')-Ib* the costliest (Figure 3B). Several explanations for these differences can be proposed. This could be linked to the recombinogenic activity of the *attC* sites. The low-cost *dfrA15* and *aadA1* gene cassettes, with their respective T-N₆-C and T-N₆-G extrahelical base motifs, are supposed to be highly recombinogenic (Larouche and Roy, 2011). In contrast, the costly *aac(6')-Ib* gene cassette with the TC-N₆-G *attC* site exhibiting low affinity for IntI1 might have the lowest recombination rate. Furthermore, previous studies have shown that the length of an *attC* site and the structure of its VTS (variable terminal sequence) can prevent proper folding of an *attC* site (Loot *et al.*, 2014). Thus, in our study, the following order of gene cassette recombination rates should be observed: *aadA1* (favorable extrahelical base motifs and short *attC* site) > *dfrA15* (favorable extrahelical base motifs but longer *attC* site) >>> *catB9* (extrahelical base motifs and long *attC* site) ≈ *aac(6')-Ib* (very unfavorable extrahelical base motifs and moderate *attC* size). However, given the cost of each cassette (*aac(6')-Ib* > *catB9* = *aadA1* > *dfrA15*), no clear correlation emerges between the recombinogenic activity of the *attC* site and the cost of the gene cassette. Another possibility is that the observed differences are related to the nature of the encoded resistance mechanisms. Indeed, a meta-analysis of chromosomal resistance mutations showed that the average cost of various resistance mechanisms could differ significantly (Vogwill and MacLean, 2015). It has been reported that the prevalence of *dfr* genes in clinical isolates remained unchanged for two years despite an 85% reduction in trimethoprim prescriptions, suggesting that these genes are highly stable even in the absence of selective pressure (Brolund *et al.*, 2010). We infer that the family of *dfr* genes might have particularly low cost. On the other hand, we found that the *catB9* and *aac(6')-Ib* gene cassettes, which both encode acetyltransferases and have similar *attC*

recombinogenic activities, had different costs (Figure 3B). Some acetyltransferases involved in aminoglycoside acetylation are able to acetylate peptidoglycans *in vitro* (Payie and Clarke, 1997). Thus, other putative targets of AAC(6')-Ib protein might affect bacterial metabolism and thereby entail a higher cost.

We found that the *dfrA15* and *aadA1* gene cassettes entailed a negligible fitness cost. Interestingly, the *aadA* and *dfr* gene cassette families are highly prevalent in class 1 integrons (Kheiri and Akhtari, 2016; Vasilakopoulou *et al.*, 2009; Vinué *et al.*, 2011), reaching 63% in *E. coli* class 1 integrons (data from the Integrall database), suggesting that their low cost could favor their maintenance in cassette networks. By contrast, *aac* gene cassettes, including the costly *aac(6')-Ib* cassette, are only found in 11% of *E. coli* class 1 integrons (Integrall database).

The different costs of gene cassettes also raise the question of the impact of the order of the cassettes in a given array. A costly cassette located in first position, close to the Pc and therefore strongly expressed, would be highly deleterious for the host bacterium. By contrast, transfer of a low-cost cassette to first position might reduce the overall cost of the gene cassette array. An integron could therefore reduce its overall cost by reshuffling the gene cassettes into a more cost-effective order. This hypothesis is supported by the fact that, when present, low-cost *dfr* cassettes are often found in first position (70% of the time according to the Integrall database). However, other factors are also known to influence the position of gene cassettes. For example, some cassettes lack an efficient translation initiation region (TIR) (Hanau-Berçot *et al.*, 2002) and would need to be in first position in order to be properly expressed, relying on the translation of a short ORF11 peptide encoded by the *attI* site (Hanau-Berçot *et al.*, 2002). This would explain why, despite their cost,

aac(6')-*Ib* cassettes lacking an efficient TIR are often found in first position (60% of the time when present, Integrall).

Lastly, our experiments indicate that subinhibitory tobramycin concentrations favour the maintenance and enrichment of bacterial populations carrying an integron with the appropriate resistance gene cassette (Figure 4A). Furthermore, we found that integrons associated with strong Pc variants were fitter than those associated with weak Pc variants (Figure 4B). These findings are in agreement with a previous study showing that antibiotic concentrations up to several hundred times below the MIC can lead to enrichment in resistant bacteria (Gullberg *et al.*, 2011).

Altogether, these results reveal the cost-effectiveness of integrons in *E. coli*. In return for a low fitness cost, they allow their host bacteria to adapt readily to antibiotic pressure. This low cost would be due to the SOS repression system, which prevents the expression of a costly integrase. The low cost of integrons would also explain their success and prevalence in many bacterial species, and would make them easily selected in the presence of subinhibitory antibiotic concentrations.

Acknowledgements

We thank C. OUK from the CIM technical platform (University of Limoges) for technical support with flow cytometry, M. BALTAZAR for the MG1656 *λatt::gfp* strain construct, C. GUET and D. MAZEL for respectively providing us with the pZE1-*gfpmut3* and p8741 plasmids.

Funding

This work was supported by grants from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and Fondation pour la recherche Médicale (FRM grant DEQ20150331742).

Conflict of interest:

The authors declare no conflict of interest.

Supplementary information is available at ISME's website

References

- Ahmed, A.M., Nakano, H., Shimamoto, T., 2005. Molecular characterization of integrons in non-typhoid *Salmonella serovars* isolated in Japan: description of an unusual class 2 integron. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 371–374.
- Avila, P., de la Cruz, F., 1988. Physical and genetic map of the IncW plasmid R388. *Plasmid* 20, 155–157
- Baharoglu, Z., Mazel, D., 2011. *Vibrio cholerae* Triggers SOS and Mutagenesis in Response to a Wide Range of Antibiotics: a Route towards Multiresistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 2438–2441.
- Barraud, O., Ploy, M.-C., 2015. Diversity of Class 1 Integron Gene Cassette Rearrangements Selected under Antibiotic Pressure. *J. Bacteriol.* 197, 2171–2178.
- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D. *et al.*, 2004. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol. Microbiol.* 51, 659–674.
- Brolund, A., Sundqvist, M., Kahlmeter, G., Grape, M., 2010. Molecular Characterisation of Trimethoprim Resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during a Two Year Intervention on Trimethoprim Use. *PLoS ONE* 5, e9233.
- Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Guerin, É., Da Re, S., González-Zorn, B. *et al.*, 2011. Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons. *Mob. DNA* 2, 6–6.
- Cambray, G., Guerout, Mazel, D., 2010. Integrons. *Annu. Rev. Genet.* 44, 141–166.

- Chaverroche, M.-K., Ghigo, J.-M., d'Enfert, C., 2000. A rapid method for efficient gene replacement in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res.* 28, e97–e97.
- Cherepanov, P.P., Wackernagel, W., 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158, 9–14.
- Collis, C.M., Hall, R.M., 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 155–162.
- Engelstadter, J., Harms, K., Johnsen, P.J., 2016. The evolutionary dynamics of integrons in changing environments. *ISME J* 10, 1296–1307.
- Escudero, J.A., Loot, C., Nivina, A., Mazel, D., 2015. The Integron: Adaptation On Demand. *Microbiol. Spectr.* 3.
- Escudero, J.A., Loot, C., Parissi, V., Nivina, A., Bouchier, C., Mazel, D., 2016. Unmasking the ancestral activity of integron integrases reveals a smooth evolutionary transition during functional innovation. *Nat. Commun.* 7, 10937.
- Espéli, O., Moulin, L., Boccard, F., 2001. Transcription attenuation associated with bacterial repetitive extragenic BIME elements¹. *J. Mol. Biol.* 314, 375–386.
- Foucault, M.-L., Depardieu, F., Courvalin, P., Grillot-Courvalin, C., 2010. Inducible expression eliminates the fitness cost of vancomycin resistance in enterococci. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16964–16969.
- Gaze, W.H., Zhang, L., Abdousslam, N.A., Hawkey, P.M., Calvo-Bado, L., Royle, J. *et al.*, 2011. Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *ISME J.* 5, 1253–1261.

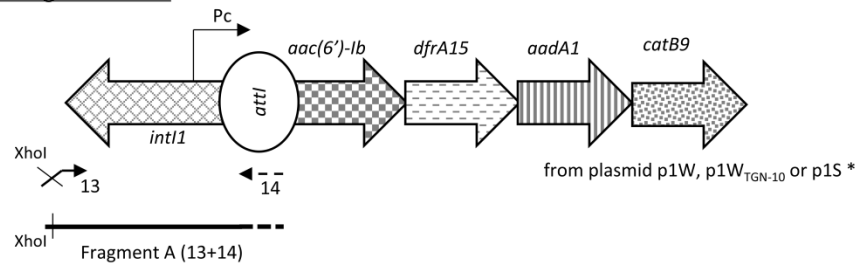
- Gillings, M.R., Holley, M.P., Stokes, H.W., Holmes, A.J., 2005. Integrons in *Xanthomonas*: A source of species genome diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 4419–4424.
- Guerin, É., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Da Re, S. *et al.*, 2009. The SOS Response Controls Integron Recombination. *Science* 324, 1034–1034.
- Guérin, E., Jové, T., Tabesse, A., Mazel, D., Ploy, M.-C., 2011. High-Level Gene Cassette Transcription Prevents Integrase Expression in Class 1 Integrons. *J. Bacteriol.* 193, 5675–5682.
- Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Helmuth, R., Guth, B.E.C., Beutin, L., 2006. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* O111 isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 1210–1214.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D. *et al.*, 2011. Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. *PLoS Pathog.* 7, e1002158.
- Hanau-Berçot, B., Podglajen, I., Casin, I., Collatz, E., 2002. An intrinsic control element for translational initiation in class 1 integrons. *Mol. Microbiol.* 44, 119–130.
- Hare, J.M., Adhikari, S., Lambert, K.V., Hare, A.E., Grice, A.N., 2012. The *Acinetobacter* regulatory UmuDAb protein cleaves in response to DNA damage with chimeric LexA/UmuD characteristics. *FEMS Microbiol. Lett.* 334, 57–65.
- Jacquier, H., Zaoui, C., Sanson-le Pors, M.-J., Mazel, D., Berçot, B., 2009. Translation regulation of integrons gene cassette expression by the *attC* sites. *Mol. Microbiol.* 72, 1475–1486.

- Jové, T., Da Re, S., Denis, F., Mazel, D., Ploy, M.-C., 2010. Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *PLoS Genet.* 6, e1000793.
- Kheiri, R., Akhtari, L., 2016. Antimicrobial resistance and integron gene cassette arrays in commensal *Escherichia coli* from human and animal sources in IRI. *Gut Pathog.* 8, 40.
- Larouche, A., Roy, P.H., 2011. Effect of *attC* structure on cassette excision by integron integrases. *Mob. DNA* 2, 3–3.
- Lenski, R.E., Rose, M.R., Simpson, S.C., Tadler, S.C., 1991. Long-Term Experimental Evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and Divergence During 2,000 Generations. *Am. Nat.* 138, 1315–1341.
- Levy, S.B., Marshall, B., 2004. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med.*
- Loot, C., Parissi, V., Escudero, J.A., Amarir-Bouhram, J., Bikard, D., Mazel, D., 2014. The Integron Integrase Efficiently Prevents the Melting Effect of *Escherichia coli* Single-Stranded DNA-Binding Protein on Folded *attC* Sites. *J. Bacteriol.* 196, 762–771.
- Lutz, R., Bujard, H., 1997. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* 25, 1203–1210.
- Mazel, D., 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Micro* 4, 608–620.
- Nemergut, D.R., Robeson, M.S., Kysela, R.F., Martin, A.P., Schmidt, S.K., Knight, R., 2008. Insights and inferences about integron evolution from genomic data. *BMC Genomics* 9, 1–12.

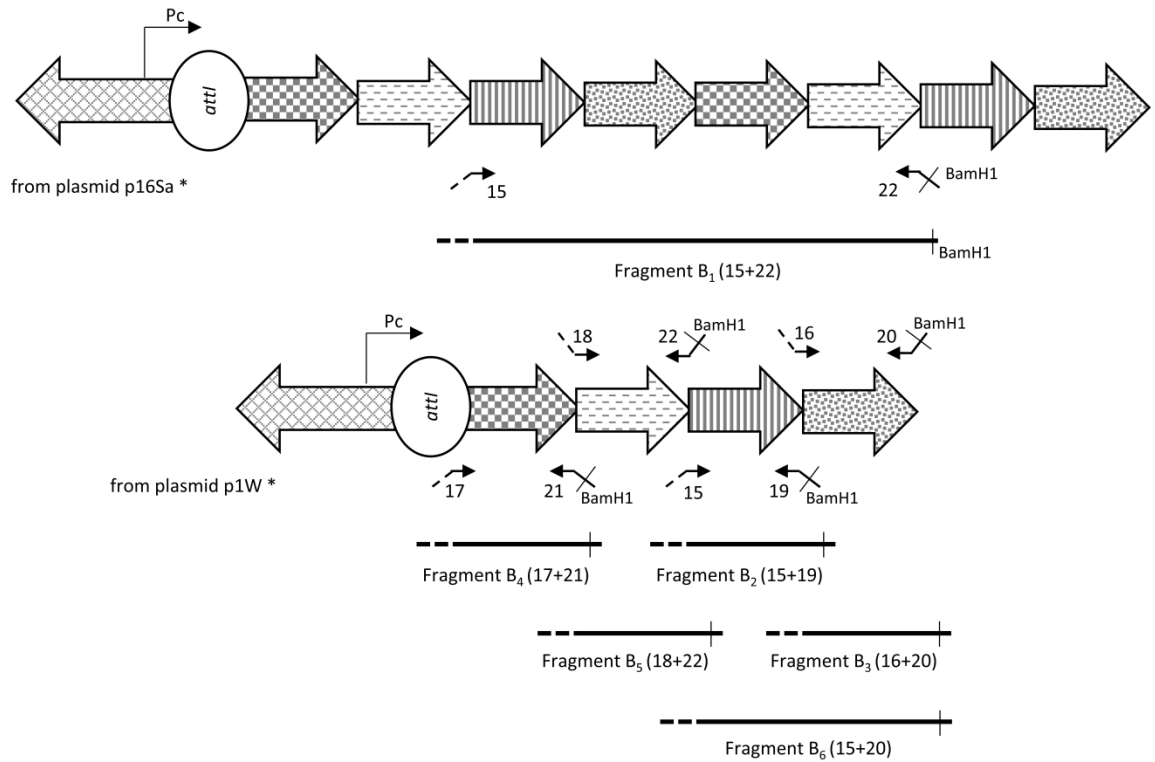
- Nguyen, T.N., Phan, Q.G., Duong, L.P., Bertrand, K.P., Lenski, R.E., 1989. Effects of carriage and expression of the Tn10 tetracycline-resistance operon on the fitness of *Escherichia coli* K12. *Mol. Biol. Evol.* 6, 213–225.
- Payie, K.G., Clarke, A.J., 1997. Characterization of gentamicin 2'-N-acetyltransferase from *Providencia stuartii*: its use of peptidoglycan metabolites for acetylation of both aminoglycosides and peptidoglycan. *J. Bacteriol.* 179, 4106–4114.
- Pérez-Valdespino, A., Lazarini-Martínez, A., Rivera-González, A.X., García-Hernández, N., Curiel-Quesada, E., 2016. Dynamics of a Class 1 Integron Located on Plasmid or Chromosome in Two *Aeromonas spp.* Strains. *Front. Microbiol.* 7, 1556.
- Rao, A.N., Barlow, M., Clark, L.A., Boring, J.R., Tenover, F.C., McGowan, J.E., 2006. Class 1 Integrons in Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.*, US Hospitals. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1011–1014.
- Recchia, G.D., Stokes, H.W., Hall, R.M., 1994. Characterisation of specific and secondary recombination sites recognised by the integron DNA integrase. *Nucleic Acids Res.* 22, 2071–2078.
- Rodríguez-Verdugo, A., Gaut, B.S., Tenailon, O., 2013. Evolution of *Escherichia coli* rifampicin resistance in an antibiotic-free environment during thermal stress. *BMC Evol. Biol.* 13, 1–11.
- Schrag, S.J., Perrot, V., Levin, B.R., 1997. Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 264, 1287–1291.
- Starikova, I., Harms, K., Haugen, P., Lunde, T.T.M., Primicerio, R., Samuelsen, Ø. *et al.*, 2012. A Trade-off between the Fitness Cost of Functional Integrases and Long-term Stability of Integrons. *PLoS Pathog.* 8, e1003043.

- Stokes, H.W., Hall, R.M., 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* 3, 1669–1683.
- Subbiah, M., Top, E.M., Shah, D.H., Call, D.R., 2011. Selection Pressure Required for Long-Term Persistence of *bla*CMY-2-Positive IncA/C Plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4486–4493.
- Vasilakopoulou, A., Psychogiou, M., Tzouvelekis, L., Tassios, P.T., Kosmidis, C., Petrikos, G. *et al.*, 2009. Prevalence and Characterization of Class 1 Integrons in *Escherichia coli* of Poultry and Human Origin. *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 1211–1218.
- Vinué, L., Jové, T., Torres, C., Ploy, M.-C., 2011. Diversity of class 1 integron gene cassette Pc promoter variants in clinical *Escherichia coli* strains and description of a new P2 promoter variant. *Int. J. Antimicrob. Agents* 38, 526–529.
- Vogwill, T., MacLean, R.C., 2015. The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: a meta-analysis approach. *Evol. Appl.* 8, 284–295.
- Wei, Q., Jiang, X., Li, M., Li, G., Hu, Q., Lu, H. *et al.*, 2013. Diversity of Gene Cassette Promoter Variants of Class 1 Integrons in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 67, 543–549.
- Wright, M.S., Baker-Austin, C., Lindell, A.H., Stepanauskas, R., Stokes, H.W., McArthur, J.V., 2008. Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. *ISME J* 2, 417–428.

Amplification of the *int1* gene variant



Amplification of the gene cassette array



* Barraud et al., 2015

Supplementary data

Figure 1S: Construction of the different plasmids used in this study.

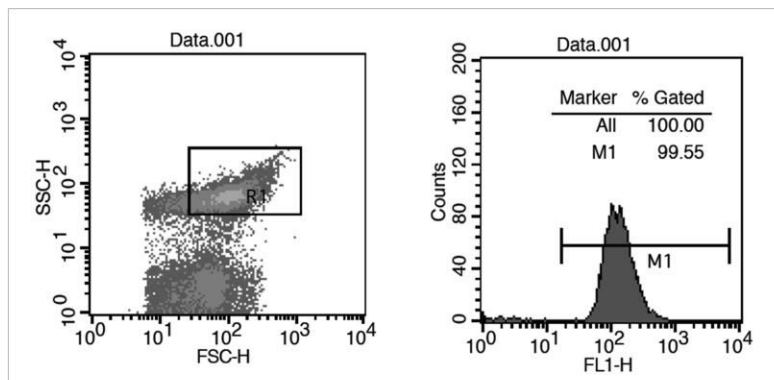
A specific *intl* gene variant (fragment A) was assembled to a specific gene cassette array (fragment B) using overlapping primers and two external primers bringing restriction sites for subsequent molecular cloning. Resulting synthetic integrons (fragment A+B) were then digested by XhoI and BamHI and ligated inside a pZA2 backbone.

The *intl1* gene variants (fragment A) associated with each different Pc (PcW or PcS or PcW_{TGN-10}) were amplified from plasmids p1W, p1S and p1W_{TGN-10} (Barraud and Ploy, 2015) using primers 13 and 14 (Table 1S). Intl variants associated with PcH1 was generated by assembly PCR using overlapping primers containing the desired mutation (primers 23/24, Table 1S) and above mentioned primers.

The *aadA1-catB9-aac(6')-Ib-dfrA15* cassettes array (fragment B₁) was retrieved from p16S^a (Barraud and Ploy, 2015) using primers 15 and 22 (Table 1S). The arrays with one cassette, *aadA1* (fragment B₂), *catB9* (fragment B₃), *aac(6')-Ib* (fragment B₄) and *dfrA15* (fragment B₅), were generated using 15/19, 16/20, 17/21 and 18/22 primers respectively and the p1W plasmid as template. The *aadA1-catB9* cassettes network (fragment B₆) was also retrieved from p1W using primers 15 and 20 (Table 1S).

Mutations in the *lexA* box were generated with primers 25 and 26 (Table 1S) (Guerin et al., 2009). Inactivation of the Pc promoters, PcW and PcS, were performed with primers 27 and 28 whereas the PcW_{TGN-10} inactivation was performed using primers 29 and 30 (Jové et al., 2010). Inactivation of the P_{int} promoter was performed with primers 31 and 32 (Table 1S) (Guérin et al., 2011).

A- 100% GFP bacteria (MG1656 $\lambda att::gfp$ + pZA2).



B- 100% nonGFP bacteria (MG1656 + pS-4GC).

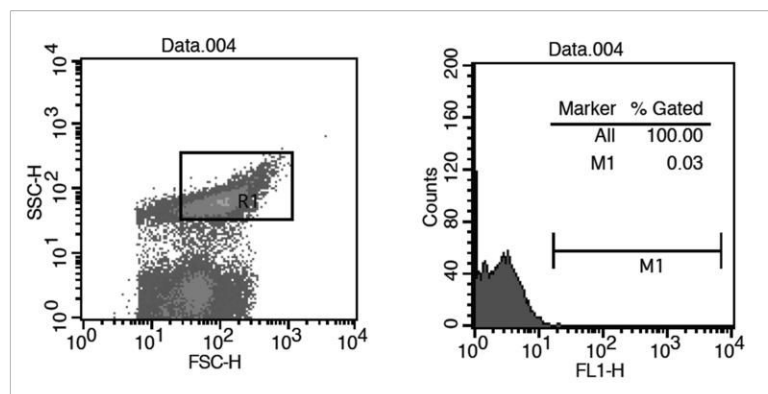


Figure 2S: Negligible levels of false positive and false negative signals in GFP quantification.

To assess the level of false positive and false negative bacteria in GFP quantification, different cultures of individual competitors (either 100% GFP or 100% non GFP) were submitted to a cytometry analysis. Here are reported representative results obtained for two cultures containing either the MG1656 *λatt::gfp* + pZA2 strain (A- 100% GFP bacteria) or the MG1656 + pS-4GC strains (B- 100% non GFP bacteria). In each case, reported values of false negative (0.45% in A) or false positive (0.03% in B) appeared negligible below 0.5% of the total bacterial population.

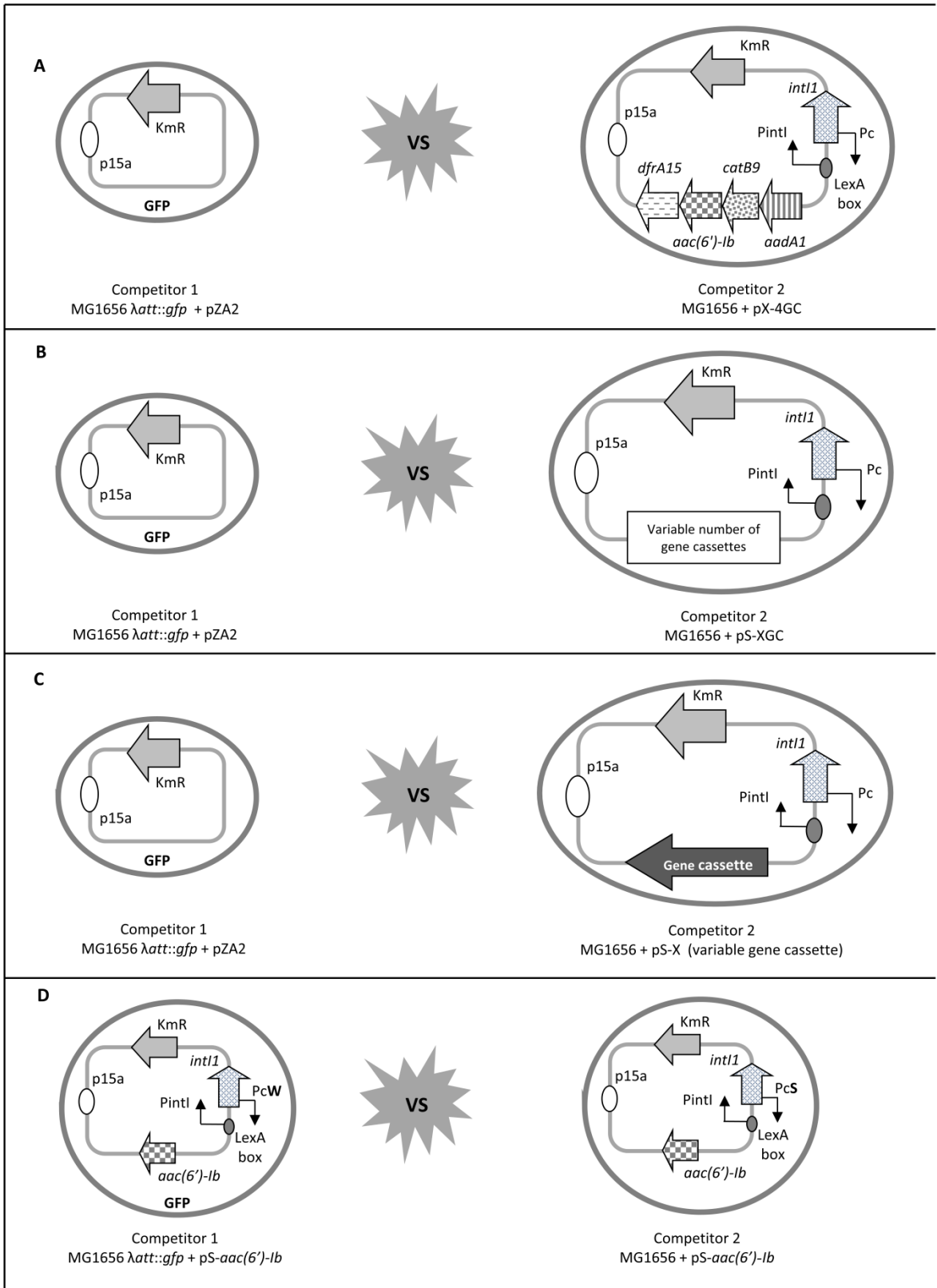


Figure 3S: Competition experiments performed in this study.

A- Experimental setup used in most experiments.

Competitor 2 was either:

- WT integrons (plasmids 2 to 5, Table 1S) (Figure 1, light grey)
- Pintl mutated integrons (plasmids 6 to 9, Table 1S) (Figure 1, dark grey)
- Pc mutated integrons (plasmids 11 to 16, Tables 1S) with a functional (Figure 2, dark grey) or non-functional (Figure 2, light grey) LexA binding site
- Pc/Pintl mutated integron (plasmid 10, Table 1S) (black control in Figures 1 and 2)
- Integron encoding an inactivated integrase (plasmid 17, Table 1S)(Figure 2, white bar)

B- Competitions performed in Figure 3.A to assess the effect of the network size.

C- Competitions performed in Figure 3.B to assess the effect of the gene cassette nature.

D- Competitions performed in Figure 4.B to assess the effect of sub-inhibitory antibiotic concentration.

Table 1S. Primers used in this study.

Primer #	Primer name	Sequence (5'3')	Reference
1	<i>λatt.A1.500-5</i>	CGATGGCGATAATATTTCCACC	This work
2	<i>λatt.A2.Amp-xfp-3</i>	GCGTTTTTTTATTGGTGAGAATTACTAACTTGAGCGAAACG	This work
3	<i>λatt.B1.500-3</i>	CCCTGATACTCACCAGGCATC	This work
4	<i>λatt.B2.Amp-xfp-5</i>	TGAGTAGGACAAAATCCGCCGCTAAAAAAGCAGGCTTCAACG	This work
5	ApXFP-3	GCGGCGGATTTGTCCTACTCA	This work
6	ApXFP-5	ATTCTCACCAATAAAAAACGC	This work
7	Kmfrt-XhoI-5	AGCCTCGAGATGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	This work
8	Kmfrt-SacI-3	CAGGAGCTCCTCATATGAATATCCTCCTTA	This work
9	<i>λatt-ext3</i>	TGCCACCATCAAGGGAAAGCCC	This work
10	<i>λatt-ext5</i>	GGCGATAAATTGCCGCATCG	This work
11	Km-verif-5	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	This work
12	Km-verif-3	GGATTCATCGACTGTGGCCG	This work
13	Xho- <i>intI</i>	CCGGAATTCTCGAGTACCTCTCACTAGTGAG	This work
14	<i>orf11-R</i>	TTAGGGCGACTGCCCTGCTGCGTAACATCGTTGCTGCTCC	This work
15	<i>orf11-attI.aadA1</i>	CAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAAACATCATGAGGGAAGCGG	This work
16	<i>orf11-attI.catB9</i>	CAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTATGTGCTTTTAGGAAAATT	This work
17	<i>orf11-attI.aac(6')-Ib</i>	CAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAGGCATCACAAAGTACAGC	This work
18	<i>orf11-attI.dfrA15</i>	CAGCAGGGCAGTCGCCCTAAAACAAAGTTAACCCTAAGGAAGTATCG	This work
19	<i>attC.aadA1-Bam</i>	CTCTAGAGGATCCATACCTAACGCTTGAGTTAAGCCGCG	This work
20	<i>attC.catB9-Bam</i>	CTCTAGAGGATCCATACCTAACGCCCCGACTAAGGGGCTG	This work
21	<i>attC.aac(6')-Ib-Bam</i>	CTCTAGAGGATCCATACCTAACGTTTGACATGAGGGGC	This work
22	<i>attC.dfrA15-Bam</i>	CTCTAGAGGATCCATACCTAACGCCTGGCACAGCTGCC	This work
23	muta-H1-F	CCCAGTGGACATAAGCCTGTTTCGGTTCGTA <u>AACT</u> GTAATG	This work
24	muta-H1-R	CATTACAGTTTACGAACCGAACAGGCTTATGTCCACTGGG	This work
25	LexAmut2L	TGTACAAAAAAACTTCATAACAAGCCATG	(Guerin et al., 2009)
26	LexAmut2R	GGCTTGTTATGAAGTTTTTTTTGTACAGTCTATG	(Guerin et al., 2009)
27	MutL10	AGCCTGTTTCGGTTCG CAGTG AGTAATGCAAGTAGCGTATGC	(Jové et al., 2010)
28	MutR10	CGCTACTTGCATTACT CACTG CGAACCGAACAGGCTTATGT	(Jové et al., 2010)
29	MutL10-TGN	AGCCTGTTTCGGTTCG CAGTG AGTAATGCAAGTAGCGTATGC	(Jové et al., 2010)
30	MutR10-TGN	CGCTACTTGCATTACT CACTG CCAACCGAACAGGCTTATGT	(Jové et al., 2010)
31	PintI1mutL	GTTTTTTTGTACCGTCCGTGCCTCGGGCATCCAAGC	(Guérin et al., 2011)
32	PintI1mutR	GGATGCCCCGAGGCACGGACGGTACAAAAAACAGTC	(Guérin et al., 2011)

Restriction sites, when present, are in small caps. For primers overlapping the promoter, the promoter -35 and -10 boxes are underlined. Mutations performed with mutagenesis primers are in bold.

Table 2S: The GFP reporter bears no cost in the MG1656 $\lambda att::gfp$ strain.

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>p-value</i>	<i>Lower 99.0%</i>	<i>Upper 99.0%</i>
Intercept	-0.03622	0.015742	-2.30063	0.02317	-0.06739	-0.00504
Variable X 1	-4.5762E-05	0.001152	-0.039732	0.96837	-0.00233	0.00223

To evaluate the cost of the GFP reporter, we performed competitions involving the MG1656 parental strain and the MG1656 $\lambda att::gfp$ strain both transformed with the exact same plasmid (pZA2, Table 1). Two independent experiments were performed, each containing 6 experimental replicates. A single regression was then fitted throughout all experimental points, as described in the Material and Methods part. The p -value of this regression showed that the selection coefficient of the MG1656 strain was no different from zero meaning that the GFP reporter in the MG1656 $\lambda att::gfp$ strain had no cost.

**Axe 2 : Mise au point d'un système de
chemostat au laboratoire.**

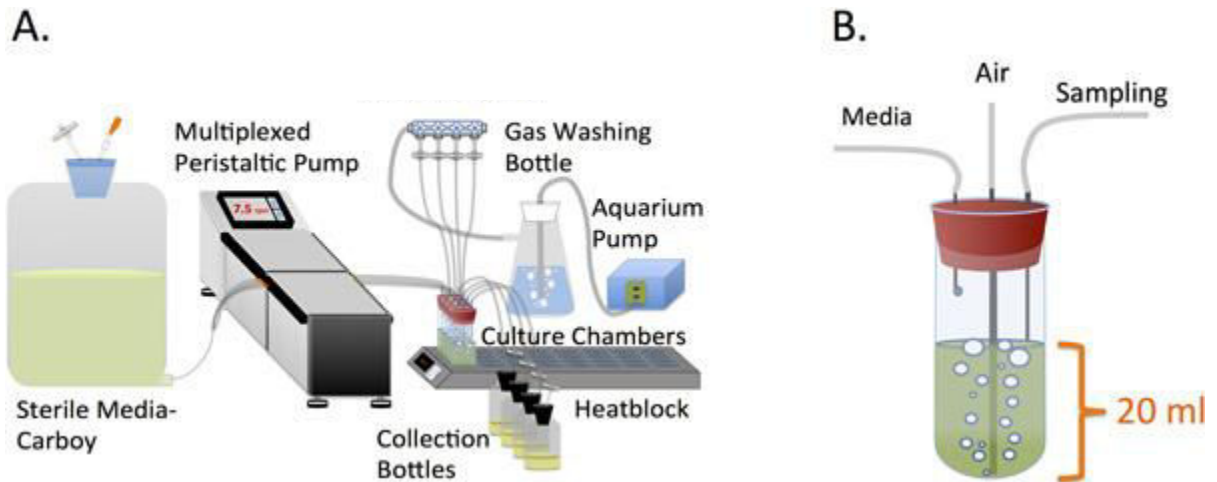


Figure 43 : Des chemostats de laboratoire tels que décrit dans Miller *et al.*, 2013.

A. Dispositif technique.

Une bonbonne (carboy) apporte du milieu neuf au réacteur par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique. Une pompe à aquarium fournit l'oxygénation. Avant d'être apporté au chemostat, l'air est hydraté dans une chambre d'hydratation pour le rendre moins sec et limiter l'évaporation dans le réacteur. Les effluents sont quant à eux récupérés dans des bouteilles stériles.

B. Le bioréacteur.

Le milieu neuf est apporté dans le système par un système de tubulures et d'aiguilles. L'oxygénation du milieu permet aussi son agitation par bullage. Les effluents sont évacués par pression hydrostatique *via* une aiguille.

Pour réaliser des expériences d'évolution au laboratoire, nous nous sommes attachés à développer un système de chemostat. Nous avons choisi ce système plutôt que la culture discontinue pour les raisons évoquées en introduction (absence de goulot d'étranglement, environnement et état physiologique des bactéries mieux contrôlés...).

Pour mettre au point ce dispositif, nous nous sommes appuyés sur une méthode simple et abordable décrite par une équipe américaine (Miller et al., 2013). Le système présenté dans ces travaux met en jeu une pompe péristaltique qui distribue du milieu neuf, *via* un système de tubulures et d'aiguilles, à des tubes en verres (bioréacteurs). Un système de bain marie à sec permet le maintien de la température tandis qu'une pompe à air permet à la fois l'oxygénation et l'agitation du milieu. Un deuxième système d'aiguilles et de tubulures permet l'évacuation du milieu usagé du fait de la pression hydrostatique exercée par la colonne de liquide dans le bioréacteur. Un système de collecte permet enfin de récupérer des échantillons (Figure 43). Système initialement conçu pour la culture de *Saccharomyces cerevisiae*, nous l'avons transposé à la culture bactérienne.

Table 8 : Souche et plasmide utilisés.

Description	
Souche	
MG1656 $\lambda att::gfp$	MG1655 (K-12 F ⁻ λ^- <i>ilvG⁻ rfb-50 rph-1</i>) $\Delta lacMIul$ dans laquelle un gène <i>gfpmut3</i> a été inséré au niveau du site chromosomique λatt .
Plasmide	
pZA2	Plasmide sans intégron contenant une origine de réplication de type p15a, Km ^R

La construction de la souche MG1656 $\lambda att::gfp$ est détaillé dans l'axe précédent. Le plasmide pZA2 a été choisi comme contrôle car la totalité de nos plasmides de travail sont des dérivés de ce plasmide.

Table 9 : Composition du milieu Davis minimum. D'après Davis, 1949

	Concentration (g/L)
Sulfate d'ammonium	1,0
Phosphate dipotassique	7,0
Sulfate de magnésium	0,1
Phosphate monopotassique	2,0
Citrate de sodium	0,5
pH final (25°C)	7,0

I. Matériel et Méthodes.

A. Souche bactérienne et plasmide.

Les souches et plasmides utilisés dans cet axe de travail sont présentés en Table 8. Nous avons choisi de travailler avec une souche GFP pour pouvoir identifier facilement d'éventuels contaminants après isolement.

B. Milieu de culture.

Pour propager nos bactéries, nous avons choisi d'utiliser un milieu pauvre fréquemment utilisé dans la littérature : le milieu minimum Davis Mingioli (DM) (Kurlandzka et al., 1991; Lenski et al., 1991; Rodríguez-Verdugo et al., 2013). Ce milieu ne contient néanmoins pas de source de carbone métabolisable par *E. coli* (Table 9) et a donc dû être supplémenté en glucose pour permettre la croissance. Le choix de la concentration de glucose utilisée sera brièvement justifié dans les résultats. De la kanamycine (Km) à 25µg/mL a également été ajoutée au milieu de culture pour assurer le maintien du plasmide.

C. Dispositif expérimental.

Dans le cadre de ce travail, le dispositif expérimental de chemostat, tel que décrit par Miller *et. al*, a été modifié afin de répondre à des contraintes pratiques et techniques. Ces modifications seront brièvement justifiées dans la partie résultat. Le dispositif utilisé dans nos travaux est présenté en Figure 44 (page suivante).

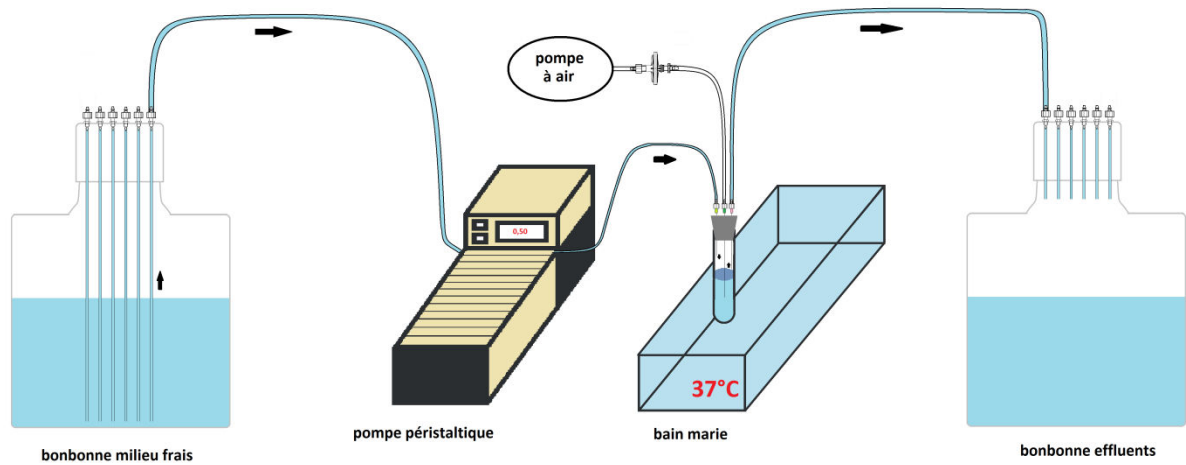


Figure 44 : Schéma du dispositif de chemostat utilisé au laboratoire.

Le bain à sec a été remplacé par un bain marie. Le système de collecte des échantillons a également été simplifié.

D. Suivi de la densité de population.

La densité de population dans les chemostats a été suivie en mesurant la densité optique (DO) à $\lambda=600\text{nm}$ d'effluents recueillis sur la glace. Les mesures de DO ont été réalisées sur un spectrophotomètre Biomate 5 (Thermo Scientific).

E. Suivi de la concentration en glucose.

Nous avons contrôlé la concentration en glucose dans les effluents de chemostats par dosage selon la technique dite de Somogyi et Nelson (Somogyi, 1952). Brièvement cette technique repose sur les propriétés réductrices du glucose. Dans des conditions alcalines et à chaud, le glucose va réduire des ions cuivriques Cu^{2+} en ions cuivreux Cu^+ qui précipitent alors sous forme d'oxyde cuivreux Cu_2O . Dans une deuxième réaction, cet oxyde cuivreux réduit à son tour un composé chimique qui, une fois réduit, vire au bleu. La quantification se fait indirectement en mesurant l'intensité de la coloration produite à 510 nm sur un spectrophotomètre.

F. Suivi de la stérilité.

A chaque prélèvement, 100 μL des effluents étaient étalés sur milieu gélosé LB (Luria-Bertani). Après incubation une nuit à 37°C, la présence de contaminants (bactéries non GFP) était vérifiée. Les éventuels contaminants isolés étaient ensuite identifiés par séquençage de l'ADN codant l'ARN16S.

G. Numérations bactériennes.

Afin d'évaluer la densité bactérienne atteinte dans les chemostats, des numérations ont été réalisées par la méthode des dilutions décimales. Le nombre moyen d'UFC (unité formant colonie) par mL d'effluent a été évalué par comptage des UFC

généérées par 100µL de chacune des dilutions sur des boîtes LB incubées une nuit à 37°C. Trois comptages indépendants ont été réalisés pour chaque dilution. Le nombre d'UFC par mL a été calculé d'après la formule suivante:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

N = nombre d'UFC/mL ; $\sum C$ = somme des colonies comptées sur les boites ; V = volume de l'inoculum étalé ; n_1 = nombre de boites retenues à la première dilution ; n_2 = nombre de boites retenues à la deuxième dilution ; d = le plus faible facteur de dilution considéré.

H. Vérification de la stabilité des antibiotiques.

L'alimentation externe des chemostats par une bonbonne de milieu impose de laisser cette bonbonne et donc les antibiotiques qu'elle contient à température ambiante sur des périodes plus ou moins longues (1 semaine dans notre cas). Afin de s'assurer que la pression de sélection antibiotique imposée aux bactéries était constante au cours du temps, nous avons voulu vérifier la stabilité à température ambiante de trois antibiotiques d'intérêt. Pour ce faire, des solutions mères d'antibiotiques (kanamycine à 25µg/mL, tobramycine à 2µg/mL et ciprofloxacine à 10µg/mL) ont été incubées à température ambiante durant 1 semaine. Des prélèvements réguliers ont ensuite été réalisés à J0, J3, J5 et J7 et congelés à -20°C. A partir de ces prélèvements, les antibiotiques ont ensuite été dosés par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) à l'UMR-S1070 (Pharmacologie des anti-infectieux, Université de Poitiers, Pr. William COUET).

II. Résultats.

A. Optimisation du système.

1. Bain à sec ou bain marie ?

Dans la publication sur laquelle nous avons basé notre travail, l'emploi d'un bain à sec était recommandé pour limiter les risques de contamination liés à la présence d'un liquide autour des réacteurs (Miller et al., 2013).

Néanmoins très rapidement, nous nous sommes rendu compte que ce dispositif ne permettait pas de chauffer de façon homogène et favorisait la formation de biofilm dans le fond des tubes, au niveau de la surface de contact entre le réacteur et le bloc chauffant. La formation de ce biofilm était constante quelque soit la concentration en glucose testée, le débit imposé au chemostat et la force de l'agitation.

L'utilisation d'un bain à sec a donc été abandonnée au profit d'un bain marie permettant une meilleure répartition de la chaleur. Pour limiter les risques de contamination, un produit bactéricide et fongicide (Aqua Resist, VWR) a été rajouté à l'eau du bain. L'évaporation et donc le nombre d'interventions extérieures sur le système a été limitée par l'ajout de billes flottantes en PVC afin de réduire la surface de contact entre l'air et l'eau.

2. Simplification du dispositif technique.

Toujours dans le but de réduire les risques de contamination, le système a été installé et maintenu sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) durant toute la durée de l'expérimentation. Néanmoins ce choix a imposé des contraintes spatiales et nécessité une simplification du système.

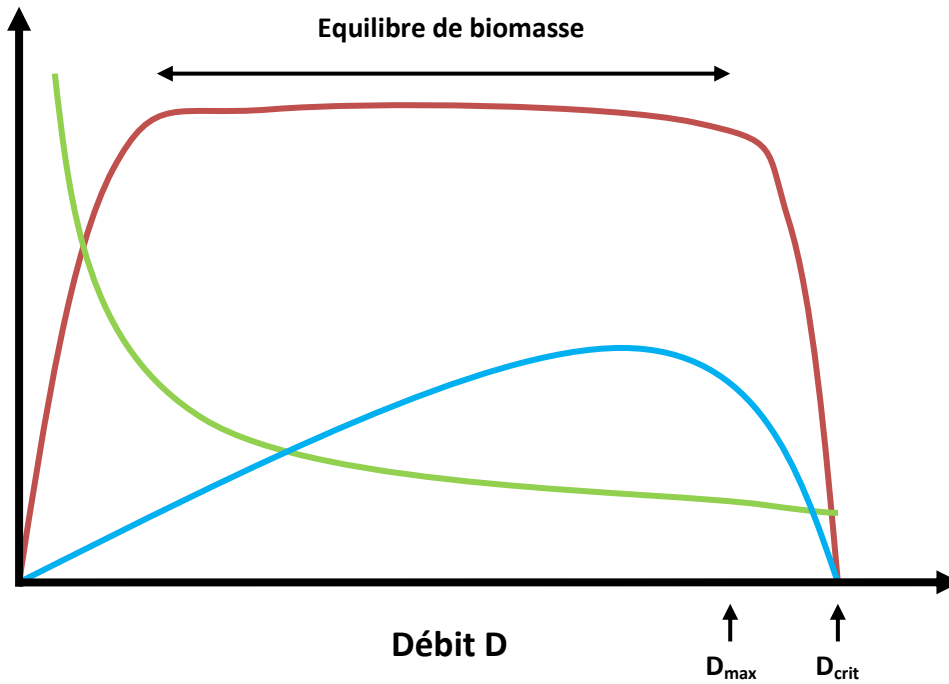


Figure 45 : Effet du débit sur différentes caractéristiques du chemostat.

En rouge est représenté l'effet du débit sur l'établissement de l'état d'équilibre, en bleu l'effet du débit sur la productivité du système (densité bactérienne atteinte dans le réacteur) et en vert l'effet du débit sur le temps de génération. Quand D augmente la productivité du système augmente ainsi que le taux de croissance horaire (μ) inversement proportionnel au temps de génération (G). Néanmoins à D_{max} les bactéries ne se divisent pas assez rapidement pour se maintenir dans le système, l'état d'équilibre est rompu et la productivité s'effondre. A D_{crit} le système est totalement « lavé ».

La première de ces simplifications a été de supprimer la chambre d'humidification de l'air dont la présence n'ajoutait rien à la bonne marche des expériences. De même le système de collecte des échantillons a été très largement simplifié. Dans notre système tous les effluents étaient évacués dans une même bonbonne de déchets. La collecte des échantillons se fait donc très simplement, sous le PSM, en débranchant et stérilisant à l'éthanol les tubulures d'effluents et en les plaçant dans des tubes de type Falcon maintenus dans la glace.

3. Choix du débit (D) imposé au chemostat.

Du choix du débit imposé au chemostat va dépendre de nombreux paramètres (Figure 45).

Tout d'abord, plus D sera fort plus les bactéries se diviseront vite. Il existe néanmoins une limite biologique aux capacités de division des bactéries. Cette limite se traduit par un D_{crit} au-delà duquel les bactéries ne se divisent pas suffisamment vite pour se maintenir dans le chemostat. Le chemostat est progressivement « lavé » de toutes ses bactéries. Choisir un débit trop fort pour accélérer l'évolution est donc risqué car la population bactérienne doit rester stable dans le chemostat.

Du débit va aussi dépendre la concentration effective de glucose dans le chemostat. Plus le milieu sera apporté rapidement, plus il y aura de ressources disponibles dans le chemostat et plus la densité bactérienne atteinte dans le réacteur sera grande. On dit que le débit affecte la productivité du chemostat. Toutefois plus on se rapproche de D_{crit} , plus la productivité diminue du fait du « lavage » des chemostats.

Enfin, autre critère important, du débit va dépendre le taux de mutation dans le chemostat. Il a notamment été observé en chemostat que des faibles taux de dilution

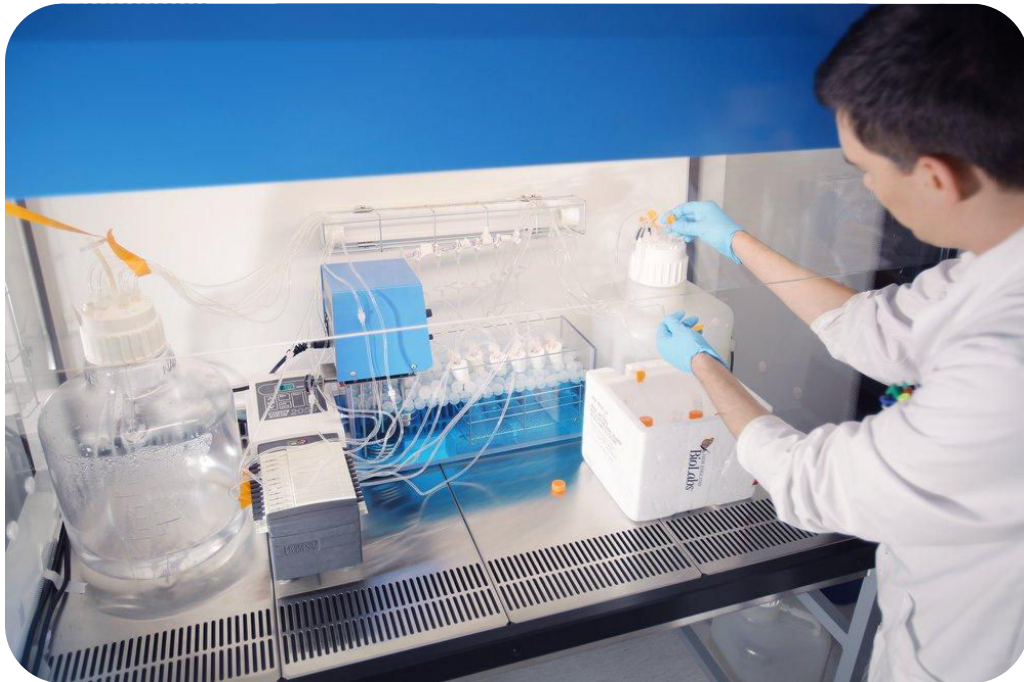


Figure 46 : Photographies du dispositif de travail.

pouvaient augmenter jusqu'à 30 fois le taux de mutation (Notley-McRobb et al., 2003).

Dans le cadre de notre optimisation, nous avons testé toute une panoplie de débits rapides et débits lents allant de $D= 0,6$ à $0,2 \text{ h}^{-1}$. Nous avons ainsi pu estimer D_{crit} à $0,4\text{h}^{-1}$. Afin de maximiser le taux de mutation dans nos chemostats nous avons finalement choisi de travailler avec un débit $D=0,2 \text{ h}^{-1}$.

4. Choix de la concentration en glucose dans le milieu frais.

Du choix de cette concentration va essentiellement dépendre la productivité du chemostat. Plus le milieu neuf sera riche en glucose, plus la densité bactérienne atteinte dans le chemostat sera élevée.

D'après la littérature, les densités de population atteintes en chemostats oscillent entre 10^7 et 10^{12} bactéries par réacteur (Ferenci, 2008). Nous avons donc choisi une concentration de glucose nous permettant d'atteindre cette fourchette.

Avec une concentration de $250\mu\text{g}$ de glucose/mL dans la bonbonne d'alimentation, la population dans le réacteur atteint environ 7.10^9 bactéries, une taille de population raisonnable pour espérer obtenir des événements de mutation rares. Nous avons donc défini cette concentration comme étant notre concentration de travail.

Bilan de l'optimisation :

L'optimisation du système de chemostat nous a conduit à travailler en utilisant le dispositif technique décrit en Figure 44 dans lequel du milieu minimum Davis supplémenté en glucose à $250\mu\text{g/mL}$ (DM250) est apporté au réacteur à un débit de travail de $0,2\text{h}^{-1}$.

Des photographies du dispositif mis au point sont disponibles en Figure 46.

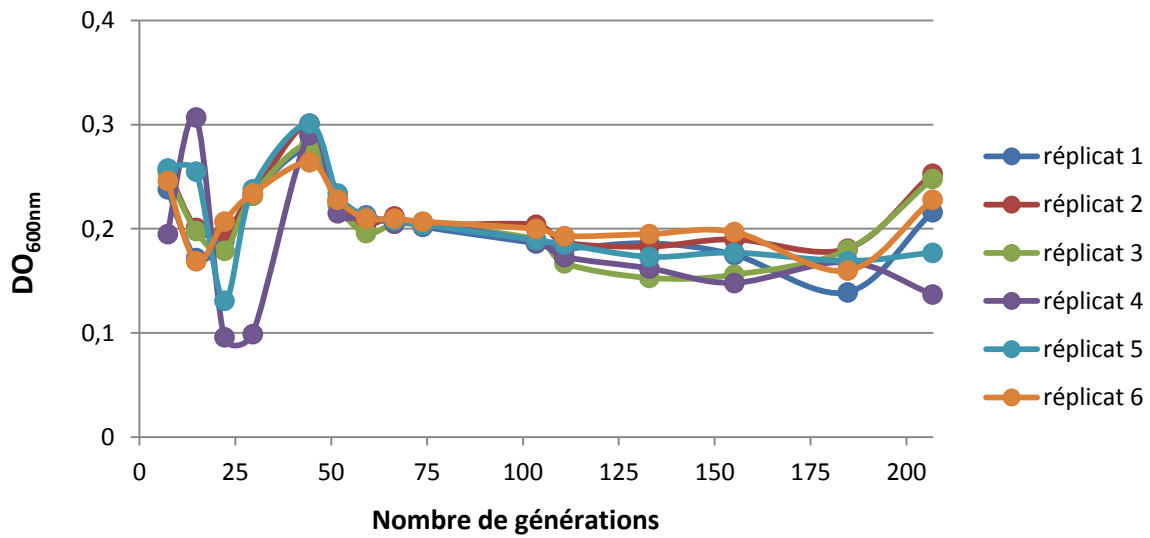


Figure 47 : Suivi de la densité bactérienne au cours du temps dans 6 chemostats indépendants.

Le suivi s'effectue en mesurant la DO_{600nm} dans les effluents. Après une période de stabilisation, un équilibre de biomasse s'installe dans chacun des 6 réplikat indépendants.

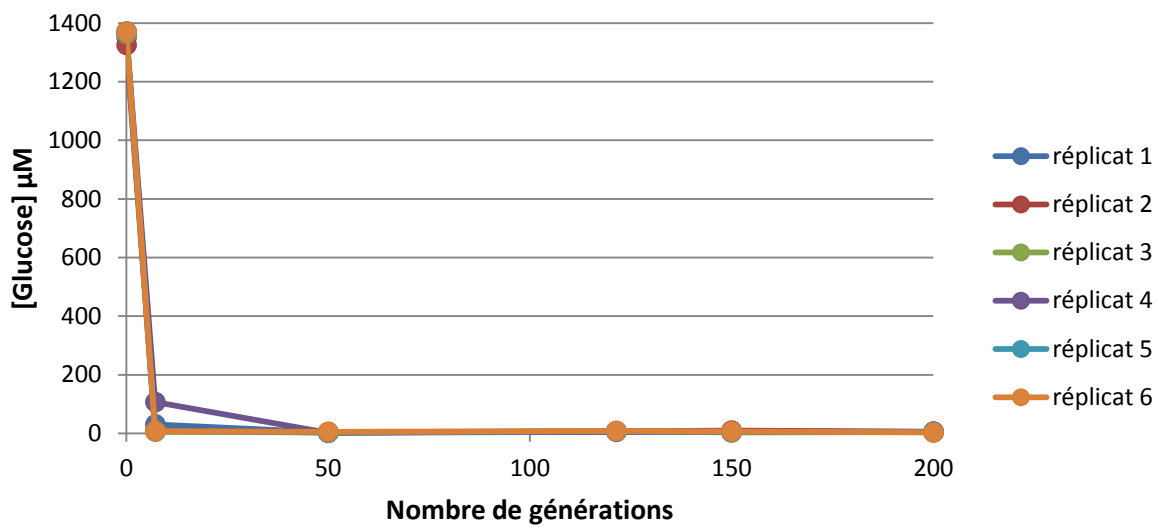


Figure 48 : Suivi de la concentration en glucose au cours du temps dans 6 chemostats indépendants.

Le suivi a été effectué par dosage du glucose dans les effluents. Dès les premières générations la concentration en glucose effective dans les chemostats chute et se stabilise à une valeur moyenne de 5µM.

B. Validation du protocole technique.

Afin de valider notre protocole, plusieurs cultures en chemostat ont été réalisées indépendamment. Différents paramètres clés ont alors été évalués au cours du temps.

1. Une biomasse constante dans les réacteurs ?

Le premier paramètre clé d'une expérience de chemostat réussie est l'installation d'un équilibre de la biomasse dans les réacteurs. Nous avons donc suivi l'évolution de la densité bactérienne au cours du temps.

Les résultats présentés en Figure 47 démontrent bien l'installation d'un équilibre de la biomasse dans les 6 réplicats indépendants. Quelque soit le réplikat, la DO se stabilise après 2-3 jours à une valeur proche de 0,2.

Notre protocole technique permet donc l'installation d'un équilibre de la biomasse dans les chemostats de façon reproductible.

2. Une source de carbone limitante ?

Pour s'assurer que les ressources en carbone étaient bien limitantes dans notre système, un dosage colorimétrique du glucose a été réalisé dans les effluents.

La concentration en glucose dans les effluents, et *a fortiori* dans les réacteurs, apparaît limitante au bout de quelques jours et demeure constante au cours du temps (Figure 48).

L'équilibre de biomasse installé dans le réacteur est donc bien imposé par les ressources limitées en glucose.

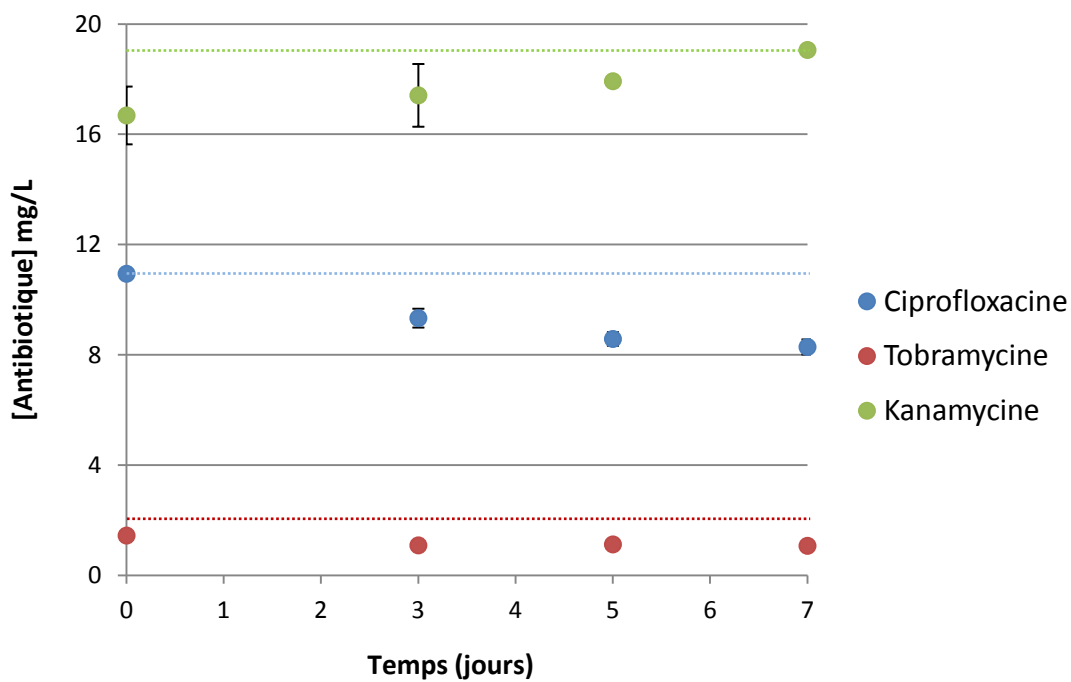


Figure 49 : Stabilité des trois antibiotiques d'intérêt.

Les solutions d'antibiotiques (Km 25 μ g/mL, Cip 10 μ g/mL et Tob 2 μ g/mL) ont été incubées à température ambiante pendant 7 jours. La concentration en molécules antibiotiques a été quantifiée au cours du temps par HPLC. Les concentrations théoriques sous forme de sels sont indiquées par un trait en pointillés.

3. Stérilité garantie ?

Sur la totalité des expériences d'évolution lancées en chemostat (une quinzaine), seules deux expériences ont été confrontés à des problèmes de stérilité.

Dans le premier cas, une turbidité anormale a rapidement été détectée dans la bonbonne d'alimentation contaminée par une souche de *E. coli* vraisemblablement en post-stérilisation (matériel ou gant contaminé).

Dans le deuxième cas, des colonies rouges ont été isolées à partir de deux des six bioréacteurs répliqués fonctionnant en parallèle et alimentés par la même bonbonne. Le séquençage du gène codant l'ARN16S a permis d'identifier une bactérie du genre *Methylobacterium*. Ces bactéries sont des contaminants fréquents des process industriels (Green, 2006). Le fait que cette contamination soit réacteur-dépendant laisse à suggérer un défaut de stérilisation sur la tubulure ou sur certains filtres propres aux deux réacteurs contaminés.

4. Des antibiotiques stables chimiquement ?

Afin d'exercer une pression de sélection antibiotiques constante lors des expériences d'évolution en chemostat mais aussi de valider le délai nécessaire entre deux changements de bonbonne d'alimentation, nous avons vérifié la stabilité chimique des antibiotiques à température ambiante durant 7 jours.

Les résultats de ces dosages sont présentés en Figure 49. Contrairement à la ciprofloxacine, les concentrations effectives de tobramycine et kanamycine à J0 sont légèrement en dessous de leur valeur théorique. Au-delà des imprécisions de pesée, ceci peut s'expliquer par le fait que ces deux poudres d'antibiotiques, utilisés sous forme de sels de sulfate, ne sont pas pures. On observe néanmoins que les trois antibiotiques testés sont relativement stables au cours du temps. Les concentrations

en ciprofloxacine et tobramycine ne diminuent respectivement que de 20% et 10% en 7 jours tandis que la concentration de tobramycine ne varie pas.

Bilan de la validation :

Notre dispositif de chemostat développé au laboratoire permet donc de propager des populations bactériennes en leur garantissant des conditions de cultures contrôlées (équilibre de biomasse, environnement constant en condition de ressource limitante) et de stérilité.

En outre, ce protocole dans lequel les bonbonnes sont changées à fréquence hebdomadaire garantie la stabilité des antibiotiques et donc des pressions de sélection.

Dans la suite de ce travail, nous allons appliquer ce dispositif à l'étude de la dynamique d'évolution du promoteur Pc des intégrons mobiles.

**Axe 3 : Etude de la dynamique
d'évolution du promoteur Pc des
intégrons de classe 1.**

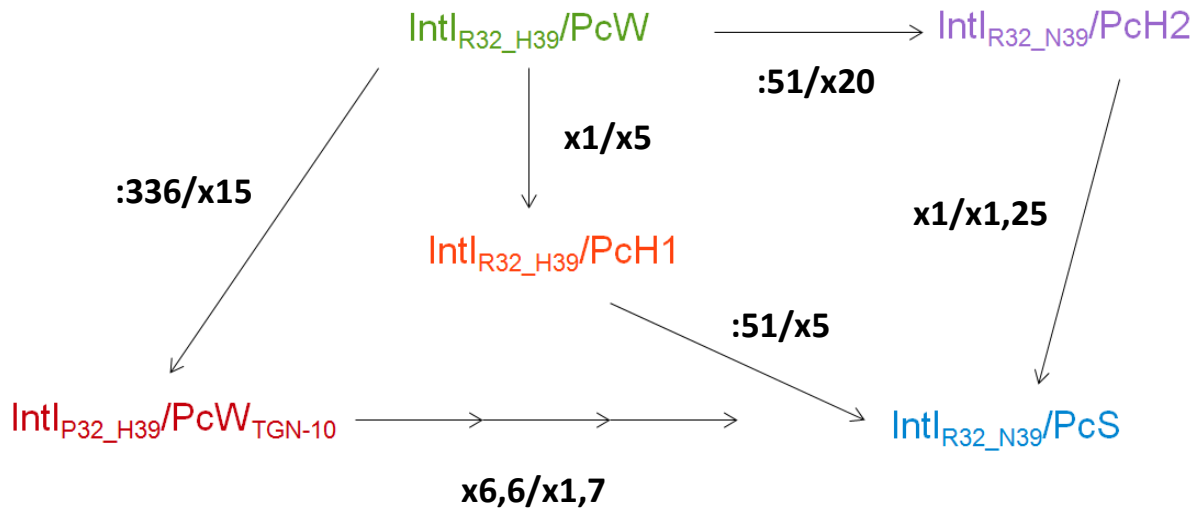


Figure 50 : Modèle de co-évolution des variants de Pc et de l'intégrase Intl1.

Les différents couples Intl/Pc sont représentés de couleurs différentes. Chaque flèche représente le nombre de mutations pour passer d'un couple à l'autre (une flèche = une mutation). L'effet de la transition d'une Intl1 à une autre sur son activité d'excision est indiquée à gauche du « / », celle sur la force du promoteur à droite de ce symbole.

En dépit du potentiel adaptatif que confèrent les intégrons et de leur prévalence en clinique, la dynamique évolutive de ces éléments n'est pas connue.

Récemment, une équipe australienne a proposé un modèle *in silico* d'évolution des intégrons dans un environnement soumis à des pressions antibiotiques (Engelstadter et al., 2016). Dans ce modèle, ils soulignent notamment l'importance de l'intégrase dont l'activité est nécessaire pour permettre l'adaptation des bactéries aux pressions antibiotiques fluctuantes. Néanmoins la démonstration expérimentale de ce modèle doit être réalisée.

In vitro, des travaux récents au laboratoire se sont intéressés aux réarrangements de cassettes en réponse à une pression de sélection antibiotique (Barraud and Ploy, 2015 ; Pérez-Valdespino et al., 2016). Bien que ces expériences ne soient pas de véritables expériences d'évolution (bactéries propagées sur quelques générations seulement), elles permettent déjà de mieux appréhender l'effet d'une pression de sélection sur la dynamique de réarrangement des cassettes. A l'inverse, la dynamique d'évolution du promoteur Pc est restée totalement inexplorée. Ce promoteur est pourtant un élément clé des intégrons dont dépendent à la fois l'activité de l'intégrase et les niveaux d'expression des cassettes.

Les travaux sur l'histoire évolutive des intégrons suggèrent que le PcW, le plus faible des promoteurs, serait le variant ancestral du Pc. Tous les ancêtres chromosomiques des IM1 décrits par Gillings portaient ce promoteur (Gillings et al., 2008). Il est également intéressant de constater que la majorité des autres promoteurs décrits chez les IM1 diffère de ce promoteur par une ou deux mutations dans la région promotrice. On peut alors se demander si ces variants de Pc ne seraient pas tous issus du PcW originel (Figure 50). Les pressions de sélection

antibiotiques auraient d'ailleurs pu jouer un rôle dans l'émergence de ces variants de promoteur forts.

Afin de tester cette hypothèse, nous nous proposons ici d'évaluer la dynamique d'évolution du promoteur Pc en réponse à un stress antibiotique, en présence ou non d'un inducteur de la réponse SOS susceptible de favoriser la mutagenèse. A l'aide du dispositif de chemostat mis au point précédemment, nous allons propager sur 200 générations des populations bactériennes contenant un intégron à PcW. A l'issue de l'expérience, nous séquencerons la région promotrice des populations évoluées par deep-sequencing afin d'évaluer si des pressions antibiotiques ont pu induire l'émergence et la propagation de mutants à Pc forts. Par ailleurs les populations évoluées seront aussi caractérisées.

Table 10 : Souches bactériennes et plasmides utilisés.

<i>Souches bactériennes et plasmides</i>	
Souches bactériennes	
<i>E. coli</i> MG1656	<i>E. coli</i> MG1655 (K-12 F ⁻ λ ⁻ <i>ilvG</i> ⁻ <i>rfb-50 rph-1</i>) Δ <i>lacMI</i> (Espéli et al., 2001)
<i>E. coli</i> MG1656 <i>λatt::gfp</i>	<i>E. coli</i> MG1656 dans laquelle un gène <i>gfpmut3</i> et son promoteur p _{λr} ont été insérés dans le chromosome bactérien.
Plasmides	
pW- <i>acc(6')</i> <i>lb</i>	Plasmide pZA portant l'intégron <i>int1-acc(6')</i> <i>lb</i> avec le promoteur PcW
pS- <i>acc(6')</i> <i>lb</i>	Plasmide pZA portant l'intégron <i>int1-acc(6')</i> <i>lb</i> avec le promoteur PcS

La cassette *acc(6')**lb* confère la résistance à la tobramycine.

Table 11 : CMI de la souche MG1656 *λatt::gfp* (pW-*acc(6')lb*) vis-à-vis de la tobramycine et de la ciprofloxacine dans deux milieux d'intérêt.**

	CMI (μg/mL)	
	Tobramycine	Ciprofloxacine
Milieu Mueller Hinton	32	0,0125
Milieu DM250	8	0,008

I. Matériel et méthodes.

A. Bactéries, plasmides, milieux de culture et antibiotiques.

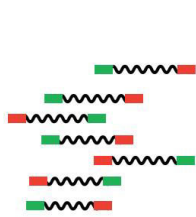
Les souches bactériennes et plasmides utilisés dans cette étude sont listés dans la Table 10. Leur construction est détaillée dans l'axe 1 de ce travail.

Le travail microbiologique de routine (numération, isolement, sortie de cryoconservation,...) a été réalisé en milieu Luria-Bertani (LB) ou en milieu Mueller Hinton (MH) pour les déterminations de CMI. Les expériences d'évolution en chemostats ont quant à elles été réalisées en milieu minimum Davis supplémenté en glucose à 250µg/mL (DM250) conformément au protocole établi dans l'axe précédent.

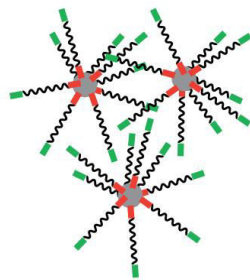
Trois antibiotiques ont également été ajoutés au besoin dans les milieux de culture : de la kanamycine (Km), de la tobramycine (Tob) et de la ciprofloxacine (Cip).

B. Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).

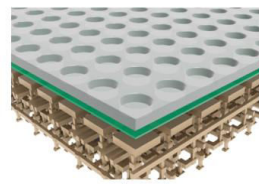
Les concentrations minimales inhibitrices de la souche de *E. coli* MG1656 $\lambda_{att::gfp} + pW-acc(6')/b$ a été déterminée pour la tobramycine et la ciprofloxacine par la méthode des dilutions en série en milieu liquide. Les CMI ont été déterminées en milieu MH et DM250. Pour chaque détermination, au moins trois réplicats indépendants ont été réalisés. Les CMI obtenues sont présentées en Table 11.



Préparation des librairies



PCR émulsion



Chargement et séquençage

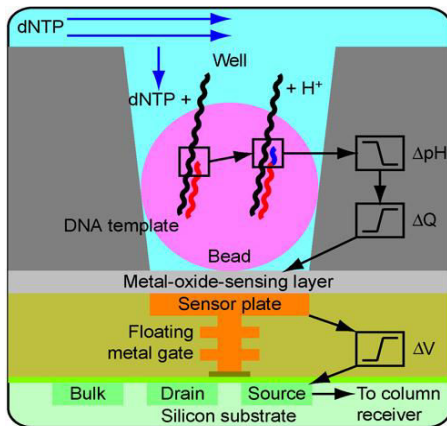


Figure 51 : Principe du séquençage Ion Torrent™.

La technologie Ion Torrent™ met en jeu une puce semi conductrice capable de détecter des variations de pH liées à la libération d'ions H^+ lors de la polymérisation de l'ADN.

Une librairie d'échantillons portant des adaptateurs spécifiques est préparée, « coatée » sur des billes par PCR émulsion puis chargée sur la puce. La puce est alors successivement soumise à des mélanges de PCR contenant un seul des quatre dNTP. Si le mélange PCR apporte le nucléotide susceptible d'être intégré à l'ADN en cours de synthèse, son incorporation se traduit par la

libération d'un ion H^+ détecté par le séquenceur. A l'inverse si le nucléotide présent dans le mélange de PCR ne peut être incorporé, le séquenceur ne détecte aucun signal. L'analyse des signaux reçus par le séquenceur permet alors de reconstituer la séquence des fragments d'ADN en cours de synthèse.

C. Expérience d'évolution en chemostat.

Des bactéries MG1656 *latt::gfp* contenant le plasmide pW-*acc(6')/lb* ont été cultivées en chemostat dans du milieu DM250 sur 200 générations (29 jours). Le volume de travail dans les bioréacteurs était fixé à 27mL et le débit d'approvisionnement en milieu neuf à $0,2\text{h}^{-1}$. Dans ces conditions, les bactéries se divisaient en moyenne 6,9 fois par jour.

Quatre conditions expérimentales ont été testées, chacune mettant en jeu des antibiotiques différents. Dans le 1^{er} run, seule la kanamycine a été utilisée pour maintenir le plasmide (contrôle sans pression de sélection). Dans, le 2nd run la kanamycine a été supplémentée avec de la tobramycine (pression de sélection). Dans le 3^e run, un inducteur de la réponse SOS, la ciprofloxacine, a été ajouté en plus de la kanamycine et de la tobramycine. L'induction de cette réponse pourrait favoriser la mutagénèse. Enfin dans le 4^e run contrôle, seules la ciprofloxacine et la kanamycine ont été utilisées (induction du SOS sans pression de sélection). Dans tous les cas, la kanamycine était utilisée à $25\mu\text{g}/\text{mL}$, la tobramycine à $2\mu\text{g}/\text{mL}$ et la ciprofloxacine à $0,001\mu\text{g}/\text{mL}$. Le choix de ces concentrations sub-inhibitrices s'est fait à l'appui des CMI obtenues en DM250 (Table 11).

Pour chaque condition testée, 6 réplicats issus d'une même souche isogénique ont été réalisés. Des prélèvements ont été réalisés toutes les 50 générations et aussitôt congelés à -80°C après ajout de DMSO à 10% final. Des contrôles fréquents de stérilité ont été réalisés tout au long des expériences.

D. Deep-sequencing de la région promotrice.

Le séquençage des échantillons prélevés a été réalisé en utilisant la technologie Ion Torrent™ (Life Technologie) (Figure 51).

5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGXXXXXXXXXX-séquence spécifique-3'
 5'-CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT-séquence spécifique-3'

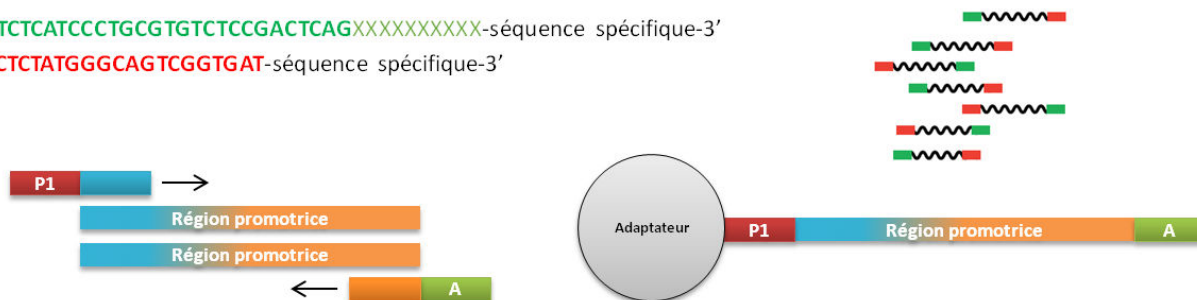


Figure 52 : Principe de préparation des bibliothèques par PCR.

Les bibliothèques ont été préparées par PCR en utilisant des amorces encadrant la région promotrice et portant les séquences P1 et A nécessaires pour la PCR émulsion et l'identification des échantillons *via* un code barre.

Table 12 et 13 : Mélange réactionnel et conditions d'amplification utilisés pour préparer les bibliothèques d'échantillons.

Mélange réactionnel	
	Volume (µL)
10X HF Phusion buffer	10
dNTP (10mM)	1
amorce sens (20µM)	1
amorce anti-sens (20µM)	1
Phusion 2U/µL	0.5
bouillon bactérien	1
eau ppi	35.5

	Température	Temps
35 cycles	98°C	5min
	98°C	20s
	68°C	20s
	72°C	20s
	72°C	5min

La polymérase haute fidélité Phusion (Fisher Bioblock) a été utilisée pour limiter au maximum les erreurs introduites lors des PCR de préparation des bibliothèques. Toutes les PCR ont été réalisées sur un appareil peqSTAR (Ozyme).

La préparation des bibliothèques d'échantillons a été réalisée par PCR en utilisant des amorces encadrant la région promotrice et contenant un code barre (amorce sens) et un adaptateur P1 (amorce anti-sens) nécessaires à la technologie (Figure 52). La liste des amorces utilisées est disponible en Annexe 1. Les PCR de préparation des bibliothèques ont été réalisées directement sur les prélèvements de chemostat. Une polymérase à haute-fidélité a été utilisée pour limiter la mutagenèse induite par la PCR. Le mélange réactionnel et le programme d'amplification utilisés sont fournis en Table 12 et 13.

Après amplification, les bibliothèques ont été dosées au Qubit™ (kit Qubit dsDNA HS assay), diluées à 100pM d'ADN final et réunies en un seul mélange réactionnel pour la PCR émulsion. La PCR émulsion a été réalisée sur un appareil Ion Chef™ en utilisant le kit Ion PI™ Hi-Q™ Chef. Le séquençage a quant à lui été réalisé sur un Ion Proton™ Sequencer avec une puce Ion PI™ Chip v3 et le kit Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200.

A l'issue du séquençage, l'extraction des données et l'alignement des « reads » générés ont été réalisés par le bio-informaticien de la plateforme Génolim. A partir de ces données brutes, a été calculé un pourcentage de « mutations lues » à chacune des positions nucléotidiques du promoteur Pc. Ce pourcentage tient à la fois compte de potentielles mutations dans la région promotrice mais aussi d'erreurs inhérentes liées à la technique ou induite par la PCR. Il est donc indispensable d'évaluer la limite de détection de cette méthode de séquençage.

E. Analyse des populations bactériennes évoluées.

1. Détermination de la sensibilité des souches évoluées à la tobramycine.

A partir des prélèvements de chemostat, des précultures ont été réalisées en bouillon MH (inoculées au 100^e) et incubées à 37°C jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 0,6. 3µL de ces précultures ont ensuite été déposés en triplicat sur du milieu MH gélosé en présence de concentrations croissantes de tobramycine (16 à 256µg/mL). La sensibilité de la souche ancestrale a également été évaluée de la même façon pour comparaison.

2. Détermination du fitness des populations évoluées.

Le fitness des populations évoluées a été comparé à celui de la souche ancestrale dans le cadre d'expériences de compétitions bactériennes. Les compétitions ont été réalisées en milieu minimum Davis supplémenté avec du glucose à 25µg/mL (DM25). Des cultures inoculées avec un mélange contenant 50% de bactéries évoluées (bactéries GFP) et 50% de bactéries ancestrales (souche isogénique non GFP + pW-*aac(6')-b*) ont été propagées sur deux jours en réalisant une dilution quotidienne au 100^e. Chaque jour, le pourcentage de bactéries GFP était évalué par analyse en cytométrie de flux.

Les analyses de cytométrie ont été réalisées sur un appareil BD FACSCalibur™ directement à partir des bouillons de cultures bactériennes à J0, J1 et J2. 10 000 événements bactériens, choisis sur la base de leur profil taille/structure (SSC/FSC), ont été analysés. L'analyse de fluorescence a été réalisée sur le canal FL1 de l'appareil à une longueur d'onde d'excitation de 530nm. Toutes les mesures

ont été effectuées en triplicat. A partir de ces données, un coefficient de sélection s a été obtenu en calculant le coefficient directeur de la droite $f(t)=\ln(\text{freq}_{\text{GFP}}/\text{freq}_{\text{non-GFP}})$.

3. Elimination du fond chromosomique des bactéries évoluées.

Afin de dissocier les adaptations liées à l'évolution plasmidique de celles liées à l'évolution chromosomique, les plasmides des bactéries évoluées (BE) ont été transférés par électroporation dans la souche ancestrale MG1656 $\lambda\text{att}::\text{gfp}$ non évoluée et dépourvue de plasmide. Les plasmides totaux évolués ont été extraits directement à partir des effluents de chemostat en utilisant le kit d'extraction plasmidique PureYield Plasmid Miniprep (Promega).

La sensibilité vis-à-vis de la tobramycine et le fitness des bactéries non évoluées contenant les plasmides évolués (BNE + PE) ont par la suite été caractérisés au même titre que pour les souches évoluées issues des chemostats.

4. Séquençage partiel des plasmides évolués.

Le gène $\text{aac}(6')\text{-Ib}$ et l'origine de répllication (p15A) des plasmides évolués ont été séquencés par la méthode de Sanger en utilisant respectivement les amorces $\text{aac}(6')\text{-Ib_F}$ (5'-TACGCAGCAGGGCAGTCGCCCTAA-3') et ori_p15A_R (5'-CGATAGTTACCGGATAAGGCGC-3'). Dans tous les cas, 6 μL d'extraits plasmidiques étaient mélangés à 2 μL d'amorces concentrées à 2 μM , 2 μL d'eau ppi, 2,5 μL de tampon 5X et à 2,5 μL de mélange BigDye® (Applied Biosystem). Les séquences générées ont été analysées sur un automate ABI Prism 3310 (Applied Biosystem) puis analysées avec le logiciel Geneious® version 9.0.4.

Table 14 : Amorces utilisées pour la quantification des plasmides par q-PCR.

Nom	Séquence 5'-3' des amorces
<i>intl</i> -LC1	GCCTTGATGTTACCCGAGAG
<i>intl</i> -LC5	GATCGGTCTGAATGCGTGT
<i>intl1</i> -probe	^[6FAM] ATTCTGGCCGTGGTTCTGGGTTTT _[BHQ1]
<i>dxs</i> -LC3	ATGACGTGGCGATTCAAAA
<i>dxs</i> -LC4	AGCCGGTATAGAGCATCTGG
<i>dxs</i> -probe	^[6FAM] ATTATGACCCCGAGCGATGAAAACGAA _[TAM]

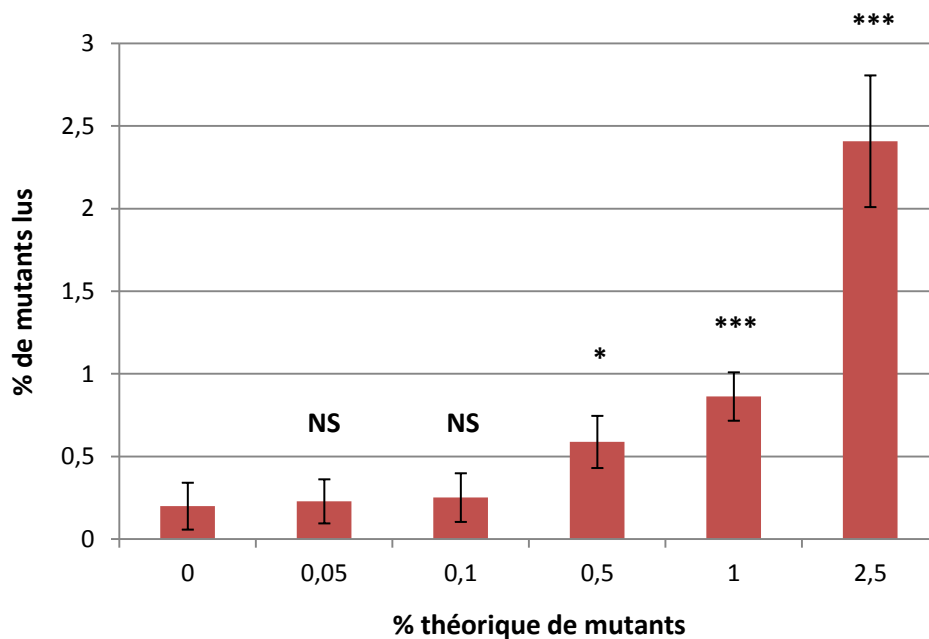


Figure 53 : Sensibilité de la méthode de séquençage Ion Torrent™.

Le séquençage d'une population pure ne contenant aucun mutant (0% théorique de mutants) se traduit par un bruit de fond de l'ordre de 0,20% ± 0,14 de mutations lues. A 0,05% et 0,1% théoriques de mutants, le taux de mutants lus n'est pas significativement différent du bruit de fond. Un test de Student sur les données de séquençage obtenues pour une population contenant 0,5% de mutants permet d'affirmer que ces valeurs sont statistiquement différentes de celles liées au bruit de fond (p -value = 0.0012).

5. Vérification de duplication de la cassette *aac(6')-Ib*.

La présence de duplication de la cassette *aac(6')-Ib* a été vérifiée par PCR à l'aide de deux amorces s'hybridant respectivement dans le gène *intI1* (5'-ATCCGCATGCCCGTTCCAT-3', amorce sens) et dans la cassette *aac(6')-Ib* (5'-CATAGAGCATCGCAAGGTCA-3', amorce anti-sens) et à partir d'extraits plasmidiques. Les PCR ont été réalisées avec le OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer (New England Biolabs) en suivant les recommandations du fournisseur (hybridation à 58°C).

6. Détermination du nombre de copies de plasmides.

Le nombre de copies de plasmides a été évalué par q-PCR en quantifiant le nombre de copies du gène *intI1* à partir d'extraits d'ADN totaux de bactéries évoluées et non évoluées.

Les extractions d'ADN ont été effectuées par un automate d'extraction Samag-12™ (Sacace Biotechnologies) à l'aide du kit SaMag™ Bacterial DNA Extraction.

Les amplifications ont été réalisées selon un protocole décrit précédemment (Barraud et al., 2010) en utilisant les amorces *intI-LC1*, *intI-LC5* et la sonde *intI1-probe* (Table 14). Le gène *dxs*, gène de ménage chromosomique présent en une seule copie, a également été amplifié en utilisant les amorces *dxs-LC3* et *dxs-LC4* et la sonde *dxs-probe* (Table 14) afin de normaliser les valeurs de quantification obtenues pour le gène *intI1*. Toutes les amplifications ont été réalisées en triplicat et sur un appareil Stratagène MX3005P.

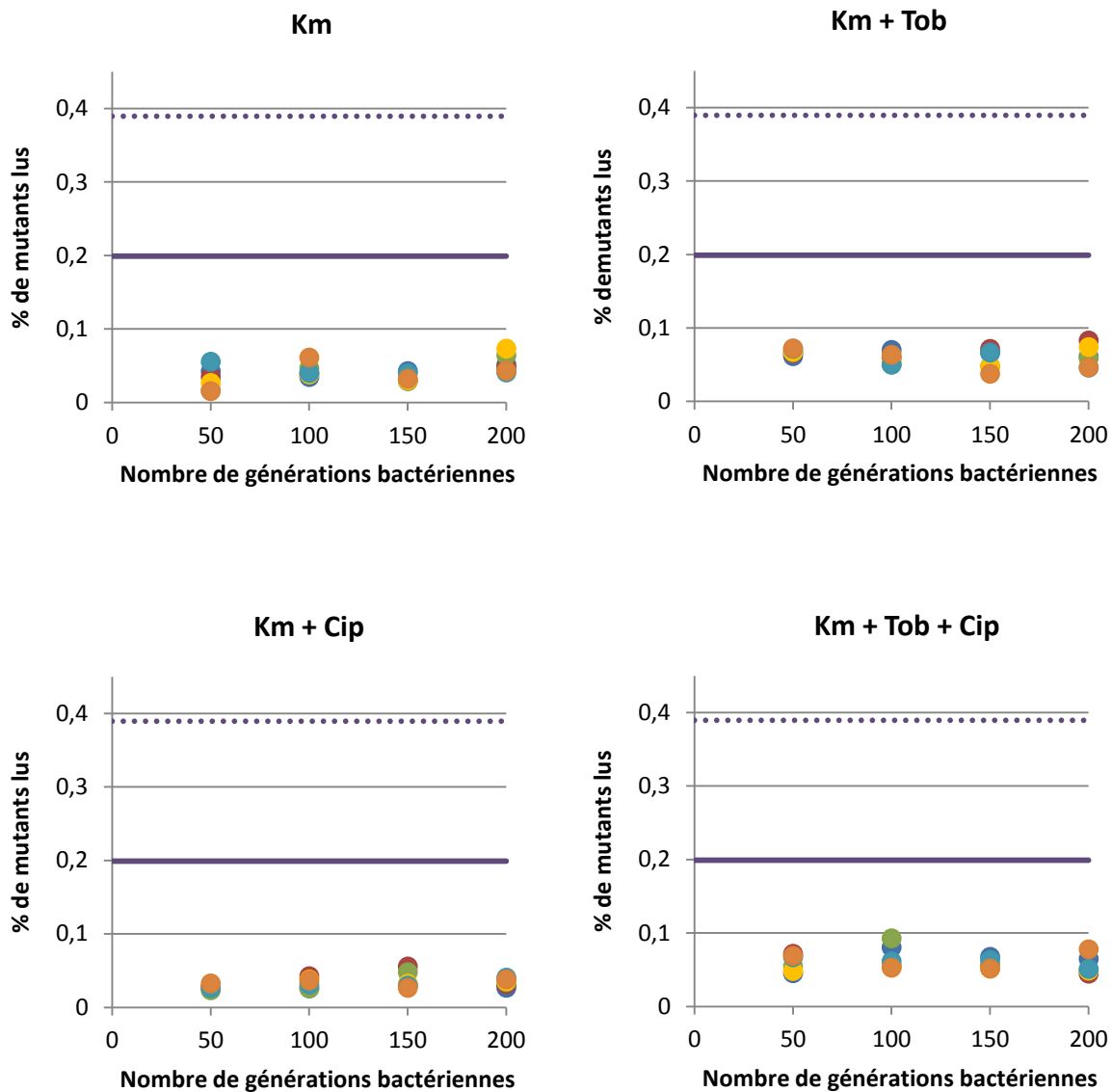


Figure 54 : Pourcentage de mutants détectés par deep sequencing en position 2 du promoteur Pc dans les populations bactériennes évoluant en chemostat.

Les résultats sont présentés par pression de sélection antibiotique (Km ; Km + Tob ; Km + Cip ; Km + Tob + Cip) et pour chacun des 6 réplicats effectués par traitement (points colorés). La ligne violette représente le niveau de bruit de fond moyen tandis que la ligne violette en pointillés représente la limite haute du bruit de fond au-delà de laquelle on peut affirmer à 99% qu'un signal est différent du bruit de fond.

II. Résultats.

A. Limite de détection de la méthode de séquençage Ion Torrent™.

Afin d'évaluer la sensibilité de détection des bactéries évoluées, nous avons déterminé la limite de détection du séquençage Ion Proton à l'aide d'une gamme contenant des mélanges de 2 souches, la souche MG1656 $\lambda att::gfp$ contenant le plasmide pW-*acc(6')*lb et la souche MG1656 contenant le plasmide pS-*acc(6')*lb, en proportions variables allant de 0 à 10%. Ces 2 plasmides diffèrent par deux mutations ponctuelles dans le promoteur Pc (Table 5, page 85). Cette gamme a été validée par un comptage en cytométrie de flux permettant de déterminer le pourcentage de bactéries GFP (PcW) et non GFP (PcS) dans le mélange. Une fois validée, trois échantillons de chaque mélange de la gamme ont été séquencés et analysés selon les modalités décrites le paragraphe D.

Les résultats indiquent une bonne sensibilité de détection de mutants de Pc. Ceux-ci sont détectés dès lors qu'ils représentent 0,5% de la population totale (Figure 53, page précédente).

B. Deep-sequencing de la région promotrice.

Les résultats du séquençage de la région promotrice sur deux positions d'intérêt sont présentés en Figure 54 et 55. Les positions choisies correspondent à des nucléotides dont la mutation pourrait engendrer des promoteurs plus forts : le PcH2 (position 2, force multipliée par 20), le PcH1 (position 27, force multipliée par 5) et le PcS (mutations sur les 2 positions, force multipliée par 25) (Table 5, page 85).

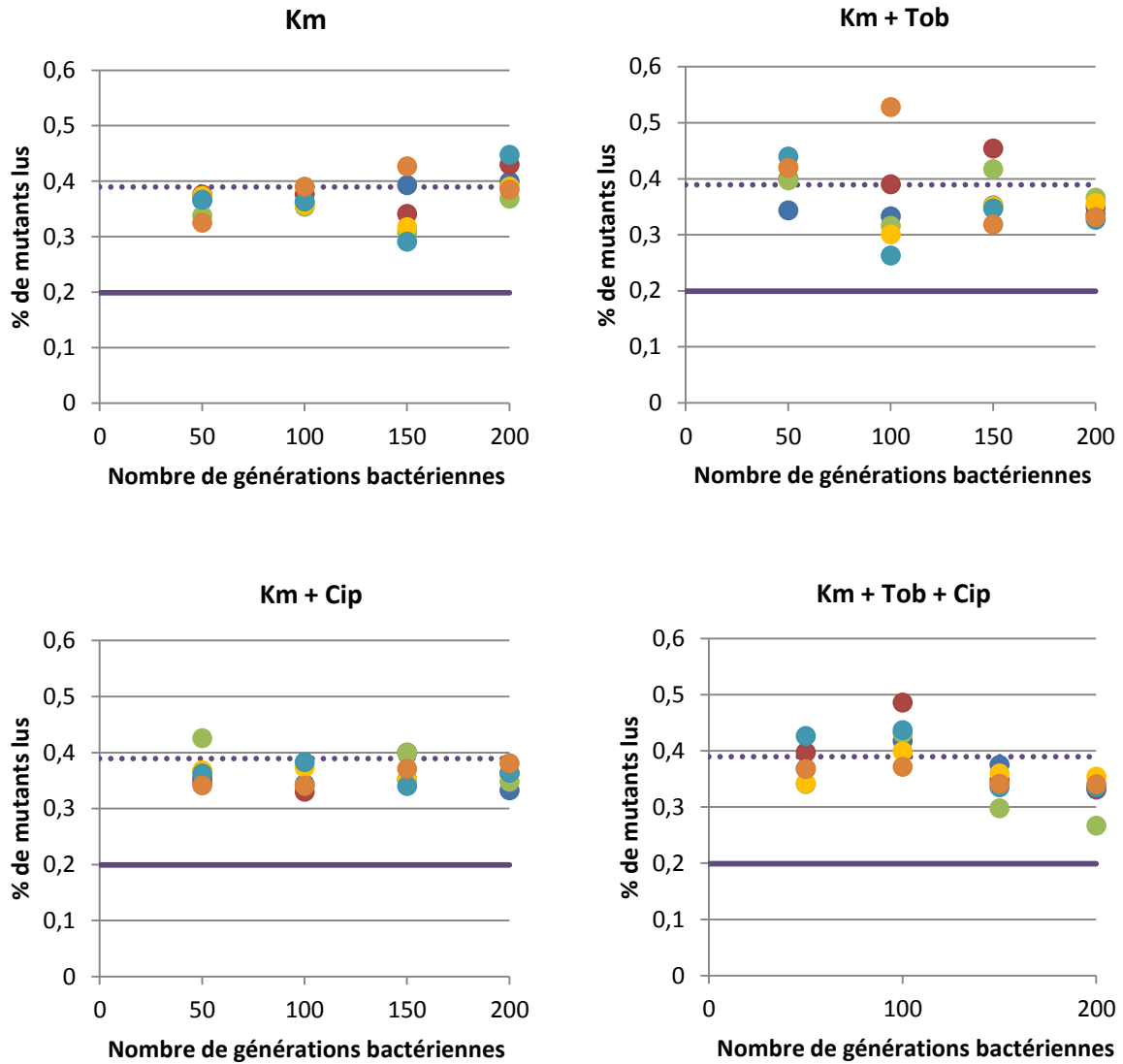


Figure 55 : Pourcentage de mutants détectés par deep sequencing en position 27 du promoteur Pc dans les populations bactériennes évoluant en chemostat.

Les résultats sont présentés par pression de sélection antibiotique (Km ; Km + Tob ; Km + Cip ; Km + Tob + Cip) et pour chacun des 6 réplicats effectués par traitement (points colorés). La ligne violette représente le niveau de bruit de fond moyen tandis que la ligne violette en pointillés représente la limite haute du bruit de fond au-delà de laquelle on peut affirmer à 99% qu'un signal est différent du bruit de fond.

En position 2, tous les signaux obtenus sont inférieurs à la valeur du bruit de fond moyen, suggérant l'absence de mutations sur cette position (Figure 54). En position 27, les signaux obtenus oscillent sur la limite haute du bruit de fond. Cependant à 200 générations, la majorité des signaux lus reste en deçà de cette limite indiquant soit l'absence de mutation à la position 27 soit sa présence minoritaire dans une proportion inférieure à 0,5% de la population totale (Figure 55). L'analyse du reste de la séquence promotrice s'est également avérée infructueuse avec des signaux systématiquement au niveau du bruit de fond et ce quels que soient le traitement antibiotique effectué et le nombre de générations.

Dans les conditions de notre expérience, la mutation du promoteur PcW en un variant plus fort ne semble donc pas être une réponse adaptative.

C. Caractérisation des souches évoluées.

En dépit de l'absence apparente d'évolution au niveau de la région promotrice, nous avons cherché à caractériser les souches évoluées en présence de tobramycine. Cette caractérisation devrait nous permettre de mieux appréhender les différentes adaptations opérées et de repenser notre protocole d'évolution en fonction.

Afin d'évaluer si l'adaptation à la pression de sélection antibiotique avait eu lieu à l'échelle plasmidique ou chromosomique, nous avons évalué la sensibilité à la tobramycine des bactéries évoluées en chemostat (BE) et des bactéries non évoluées transformées avec les plasmides évolués (BNE + PE) (Table 15, page suivante).

Pour les BE, les valeurs de sensibilité obtenues semblent indiquer que les bactéries se sont bien adaptées à la pression de sélection antibiotique. Les bactéries voient leur susceptibilité passer de 32µg/mL pour la souche ancestrale à 64 ou

Table 15 : Sensibilité à la tobramycine des bactéries évoluées (BE) et de bactéries non évoluées contenant les plasmides évolués (BNE +PE).

Sensibilité à la tobramycine ($\mu\text{g/mL}$)						
<i>Km + Tob</i>						
	<i>réplicat 1</i>	<i>réplicat 2</i>	<i>réplicat 3</i>	<i>réplicat 4</i>	<i>réplicat 5</i>	<i>réplicat 6</i>
BE	64	64	64	128	128	64
BNE + PE	32	32	32	32	32	32
<i>Km + Tob + Cip</i>						
	<i>réplicat 1</i>	<i>réplicat 2</i>	<i>réplicat 3</i>	<i>réplicat 4</i>	<i>réplicat 5</i>	<i>réplicat 6</i>
BE	64	128	64	64	64	64
BNE + PE	32	32	32	32	32	32
<i>Souche ancestrale</i>	32					

Les sensibilités ont été déterminées pour les populations bactériennes évoluées en présence des pressions antibiotiques suivantes : Km + Tob et Km + Tob + Cip. La souche ancestrale est sensible à la tobramycine dès $32\mu\text{g/mL}$.

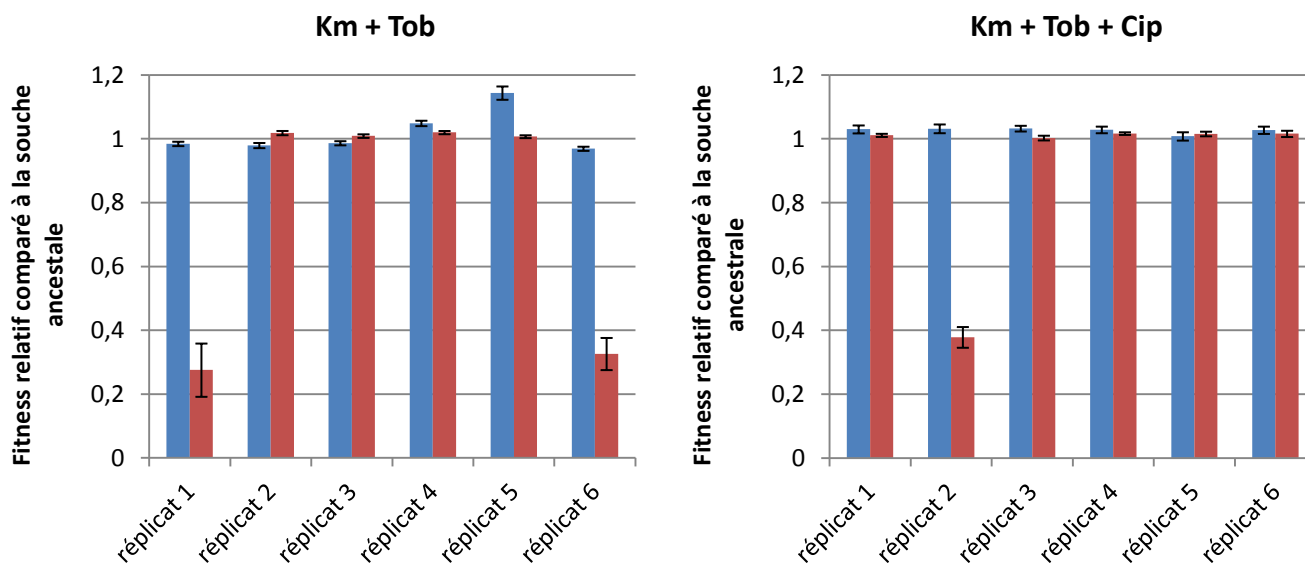


Figure 56: Fitness des BE et BNE + PE évalué par rapport à la souche ancestrale.

Les BE sont signalés en bleu, les BNE + PE en rouge. Un fitness relatif inférieur à 1 témoigne d'une souche moins avantageuse que la souche ancestrale. Inversement un fitness relatif supérieur à 1 montre que la souche considérée est plus avantageuse que la souche ancestrale. Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance à 95%.

128µg/mL pour les populations évoluées. Pour les BNE + PE, les sensibilités obtenues sont similaires à celle de la souche ancestrale (Table 15). Les plasmides évolués ne conféreraient donc pas plus de résistance à la tobramycine que le plasmide ancestral. Au vu de ces résultats, il semblerait que l'adaptation ait eu lieu à l'échelle chromosomique et non plasmidique.

Pour affiner ces résultats, le fitness des BE et des BNE + PE a été comparé à celui de la souche ancestrale (Figure 56).

Les résultats obtenus soulignent la diversité des réponses adaptatives dans les populations évoluées. Des réplicats isogéniques pourtant propagés dans les mêmes conditions peuvent aussi bien aboutir à des populations au fitness augmenté (réplicat 5, Km + Tob) que diminué (réplicats 1 et 6, Km +Tob). Il est par ailleurs intéressant de noter que les souches évoluées les plus résistantes sont aussi les souches au fitness le plus avantageux (réplicats 4 et 5, Km+Tob). Si l'on considère maintenant les résultats obtenus avec les BNE + PE, les plasmides évolués ne semblent ni plus ni moins coûteux que le plasmide ancestral dans la majorité des réplicats (fitness relatif proche de 1). Un résultat qui atteste soit d'une absence de réelle évolution plasmidique soit de l'acquisition de mutations plasmidiques peu ou pas coûteuses.

Néanmoins, trois populations plasmidiques sortent du lot : les plasmides issus des réplicats 1 et 6 en milieu Km + Tob et du réplicat 2 propagé en Km + Tob + Cip. Transformés dans des souches non évoluées, ces trois plasmides réduisent drastiquement le fitness de l'hôte (croissance ralentie de 70% par rapport à une souche non évoluée portant le plasmide ancestral). De façon intéressante, cet effet délétère est absent dans les BE. Ces résultats témoignent donc de l'existence d'adaptations plasmidiques ayant conduit à l'émergence de plasmides très coûteux

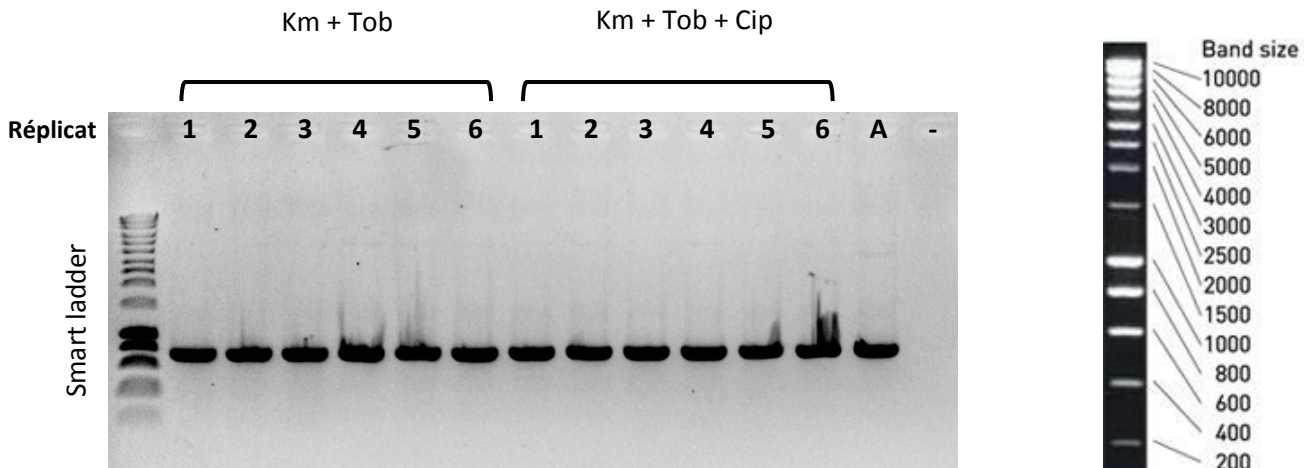


Figure 57 : Vérification par PCR de duplication du gène *aac(6')-Ib*.

Absence de duplication : une seule cassette où fixer l'amorce anti-sens (taille attendue 680 bp) ; duplication de cassette : deux sites de fixation pour l'amorce anti-sens (deux bandes attendues 680 bp et 1320 bp). Aucune des populations évoluées ne semble présenter de duplication de cassette. A = plasmide ancestral.

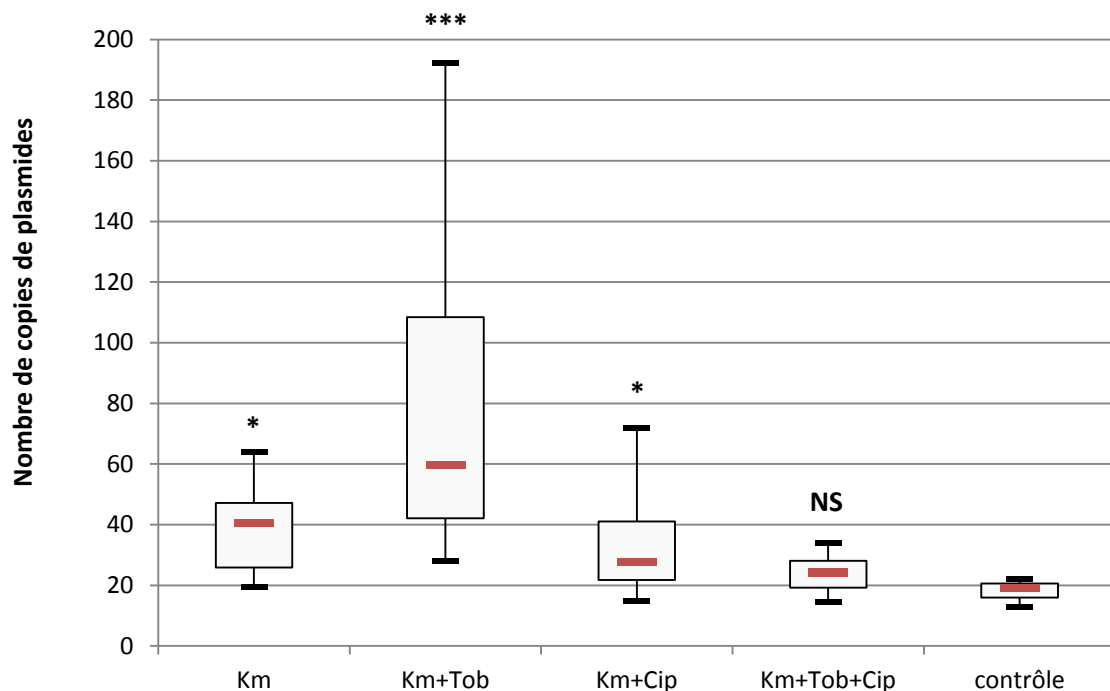


Figure 58 : Quantification du nombre de copies de plasmides dans les bactéries évoluées.

La quantification a été réalisée en dénombrant le nombre de copies du gène *int1*, marqueur plasmidique. Les valeurs obtenues ont été normalisées par quantification d'un gène de ménage chromosomique présent en une copie dans la cellule. Les résultats démontrent une augmentation très significative du nombre de copies de plasmide dans les populations évoluées en présence de Km + Tob (p -value = $3,5 \cdot 10^{-4}$, test de Student). Le contrôle correspond ici à la souche ancestrale.

dont le coût a néanmoins été compensé par des adaptations chromosomiques dans les souches évoluées. Ces innovations plasmidiques ne participeraient néanmoins que très peu au phénotype de résistance à la tobramycine (voir paragraphe sur la sensibilité à la tobramycine).

Le séquençage du gène *aac(6')-Ib* dans les BE, y compris celles présentant des traces évidentes d'adaptation plasmidique (population 1 et 6 Km+Tob et population 2 Km+Tob+Cip), n'a néanmoins montré aucune mutation plasmidique pouvant expliquer leur sensibilité diminuée à la tobramycine. Une autre adaptation à la pression de sélection pourrait avoir été la duplication de la cassette de résistance par excision (semi-conservative) puis réintégration. La duplication de la cassette *aac(6')-Ib* a donc été vérifiée par PCR en utilisant une amorce sens dans le gène *intl* et une amorce anti-sens dans la cassette *aac(6')-Ib*. Aucune population bactérienne évoluée n'a néanmoins montré de tels événements de duplication (Figure 57). Un séquençage complet des plasmides serait nécessaire pour identifier finement les mutations impliquées.

De façon intéressante, la quantification du nombre de copies de plasmide dans les BE a montré une augmentation significative des copies de plasmides dans les souches cultivées en présence de kanamycine et tobramycine : 62 copies contre 20 copies dans la souche ancestrale (Figure 58). De façon intéressante, cette quantité de plasmides semble corrélée avec la sensibilité à la tobramycine. Les deux réplicats présentant la sensibilité la plus faible étaient aussi ceux contenant le plus de copies du plasmide (Table 16, page suivante). On peut donc émettre l'hypothèse que l'augmentation de la résistance dans ces souches serait médiée par une augmentation du nombre de copies de plasmide. Cette augmentation ne serait néanmoins pas tributaire de mutations plasmidiques (mutation dans l'origine de

Table 16 : Sensibilité à la tobramycine et quantification des copies de plasmides dans les souches évoluées.

Km + Tob						
	<i>réplicat 1</i>	<i>réplicat 2</i>	<i>réplicat 3</i>	<i>réplicat 4</i>	<i>réplicat 5</i>	<i>réplicat 6</i>
Sensibilité à la tobramycine ($\mu\text{g/mL}$)	64	64	64	128	128	64
Nombre de copies du plasmide	66 ± 18	32 ± 1	46 ± 7	97 ± 53	156 ± 32	58 ± 28

Table 17 : Bilan de l'analyse des populations évoluées.

Km + Tob						
	<i>réplicat 1</i>	<i>réplicat 2</i>	<i>réplicat 3</i>	<i>réplicat 4</i>	<i>réplicat 5</i>	<i>réplicat 6</i>
Sensibilité à la tobramycine ($\mu\text{g/mL}$)	64	64	64	128	128	64
Contribution chromosomique à la résistance	Majoritaire	Majoritaire	Majoritaire	Majoritaire	Majoritaire	Majoritaire
Evolution plasmidique	Oui	Possible	Possible	Possible	Possible	Oui
Mutation dans <i>aac(6')Ib</i>	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Duplication de cassette	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Augmentation du nombre de copies de plasmides	x 3,7	x 1,8	x 2,6	x 5,4	x 8,6	x 3,2

Km + Tob + Cip						
	<i>réplicat 1</i>	<i>réplicat 2</i>	<i>réplicat 3</i>	<i>réplicat 4</i>	<i>réplicat 5</i>	<i>réplicat 6</i>
Sensibilité à la tobramycine ($\mu\text{g/mL}$)	64	128	64	64	64	64
Contribution chromosomique à la résistance	Majoritaire	Majoritaire	Majoritaire	Majoritaire	Majoritaire	Majoritaire
Evolution plasmidique	Possible	Oui	Possible	Possible	Possible	Possible
Mutation dans <i>aac(6')Ib</i>	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Duplication de cassette	Non	Non	Non	Non	Non	Non
Augmentation du nombre de copies de plasmides	x 1,2	x 1,2	x 1,7	x 1,2	x 1,4	x 1,1

réplication) puisque les BNE + PE ne sont pas moins sensibles que la souche ancestrale. Cette augmentation serait donc tributaire d'une modification chromosomique. Le séquençage de l'origine de réplication des plasmides évolués semble abonder dans ce sens puisqu'aucune des *ori* séquencées ne présentait de mutation. La quantification des copies de plasmides dans les BNE + PE permettrait de confirmer cette hypothèse.

Le bilan des analyses réalisées sur les BE est présenté dans la Table 17. De cette analyse, il ressort que la principale limitation de notre protocole d'évolution demeure la part trop importante d'évolution chromosomique. Aucune mutation plasmidique directement corrélée à la résistance n'a pu être mise en évidence dans cette étude. De même l'augmentation du nombre de copies plasmidiques dans les populations évoluées en présence de kanamycine et tobramycine, bien que directement corrélée aux niveaux de résistance, serait une conséquence indirecte d'un événement chromosomique. Une des clés de nos expériences d'évolution du promoteur *Pc* des intégrons serait donc de rendre l'évolution chromosomique moins favorable.

Discussion

Les intégrons sont des structures génétiques à haute valeur adaptative pour les bactéries. Ils leur permettent de capturer et d'exprimer une vaste panoplie de gènes sous forme de cassettes. Plus d'une centaine de cassettes existe permettant aux intégrons de conférer des phénotypes de résistance à de nombreux antibiotiques. Ces structures génétiques peuvent également être véhiculés par des plasmides et/ou transposons et sont donc capables de disséminer d'une espèce bactérienne à une autre. Conséquence de cette dissémination, les intégrons sont retrouvés dans un grand nombre de bactéries majoritairement à Gram négatif mais aussi à Gram positif et sont aujourd'hui une réalité à la fois clinique, vétérinaire et environnementale.

Si la mécanistique et la régulation des intégrons ont déjà été étudiés, leur dynamique d'évolution est mal caractérisée. Les rares études à ce sujet évoquent l'effet des pressions antibiotiques sur la dynamique de réarrangement des cassettes (Barraud and Ploy, 2015 ; Pérez-Valdespino et al., 2016). De même, les études sur le coût biologique des intégrons restent anecdotiques (Starikova et al., 2012). Ce paramètre pourrait expliquer le succès des intégrons dans une si vaste diversité de bactéries et d'environnements.

Les travaux présentés dans ce manuscrit visaient à préciser ces deux aspects peu ou pas explorés. Deux versants de la dynamique d'évolution des intégrons ont été évalués :

- d'une part leur maintien dans les populations bactériennes, dépendant directement du coût biologique de la structure.
- d'autre part l'évolution du promoteur Pc des intégrons en réponse à un stress antibiotique.

I. Le coût biologique des intégrons.

Des travaux récents ont déjà soulevé la question du coût biologique associé aux intégrons (Starikova et al., 2012). Néanmoins, cette étude a choisi comme modèle d'étude *Acinetobacter baylyi*, une espèce bactérienne chez qui la protéine LexA, régulateur central de la réponse SOS, est absente (Hare et al., 2012). Or, dans la majorité des intégrons, il a été montré que l'intégrase était régulée par la réponse SOS (Cambray et al., 2011). Du fait de cette absence de régulation SOS, l'intégrase des intégrons est donc constitutivement exprimée chez *Acinetobacter*. L'étude du coût biologique des intégrons chez *Acinetobacter* n'est donc pas représentative de la majorité des autres espèces bactériennes chez qui des intégrons ont été décrits.

Dans ce travail, nous avons donc évalué le coût biologique des intégrons chez *E. coli*, une espèce bactérienne dans laquelle les intégrons sont régulés par la réponse SOS et qui appartient à la famille des Entérobactéries chez qui les intégrons sont très fréquemment détectés (Ahmed et al., 2005 ; Dolejska et al., 2007 ; Rao et al., 2006). Par le biais d'expériences de compétitions bactériennes mettant en jeu des populations avec ou sans intégron, nous avons cherché à préciser l'impact de différents facteurs sur le coût de ces structures génétiques.

Nos résultats démontrent tout d'abord que les intégrons sont des structures relativement peu coûteuses. La présence d'un intégron à quatre cassettes ne réduirait le fitness de l'hôte que de 1,3 à 4%. Pour comparaison, un plasmide portant quatre gènes de résistance aux antibiotiques diminuerait en moyenne le fitness de l'hôte à hauteur de 13% d'après une méta-analyse réalisée sur 7 plasmides (Vogwill and MacLean, 2015). Le coût des intégrons serait également bien en deçà du coût moyen de la résistance chromosomique. Une méta-analyse sur 760 mutations

chromosomiques de résistance (78 antibiotiques concernés) estime le coût moyen de ces mutations à une diminution de 21% du fitness de l'hôte (Vogwill and MacLean, 2015).

Ce faible coût expliquerait en partie la présence et le maintien des intégrons dans une vaste diversité d'hôtes et d'environnements. La dissémination passive des intégrons par transfert de plasmides ou de transposons ne peut à elle seule justifier de cette diversité. En effet, bien que la dissémination ait contribué à élargir le spectre d'hôte des intégrons, l'acquisition d'un élément génétique mobile ne garantit en rien son maintien dans la population. Il existe par exemple des plasmides de résistance IncA/C porteurs de gène *bla*_{CMY-2} qui bien que capables de disséminer efficacement sont rapidement perdus en l'absence de pression de sélection (Subbiah et al., 2011). Les pressions de sélection ne sont elles non plus pas suffisantes pour justifier de la présence d'un intégron dans une bactérie puisque des intégrons ont déjà été retrouvés dans des réservoirs environnementaux éloignés de toute activité anthropique (Gaze et al., 2011 ; Wright et al., 2008). Dans ces conditions, le faible coût des intégrons aurait pu favoriser leur maintien notamment dans des environnements peu exposés aux pressions de sélection antibiotiques.

Le faible coût des intégrons s'expliquerait en partie par la répression *via* la réponse SOS de l'expression du gène *intl*. Nos résultats démontrent en effet que l'expression de l'intégrase n'est pas toujours sans conséquence pour la bactérie et peut se traduire par un coût marqué. Une fois déréprimée, l'expression de l'intégrase Intl_{R32_H39} multiplie le coût global de la structure intégron par 2. De façon intéressante ce coût est fonction de l'activité de l'intégrase. Dans nos travaux, les intégrases Intl_{P32_H39} et Intl_{R32_N39} à faible activité de recombinaison ne présentaient pas de coût apparent lorsqu'elles sont exprimées. De même, une mutation dans le codon

catalytique de l'intégrase IntI_{R32_H39} était suffisante pour abolir son coût. Deux résultats qui suggèrent que l'intégrase de part son activité pourrait avoir un effet délétère sur la bactérie. Dans ces conditions, la régulation du gène *intl* par la voie SOS pourrait donc avoir été une réponse évolutive des intégrons pour réduire leur coût comme c'est le cas pour la résistance à la vancomycine chez les Entérocoques dans lesquels un fin système de régulation élimine toute trace de coût lié à la résistance (Foucault et al., 2010).

La répression du gène *intl* pourrait ainsi permettre de préserver un gène coûteux mais avantageux. Cette hypothèse est d'ailleurs renforcée par plusieurs observations antérieures. Des analyses *in silico* ont notamment corrélé l'absence de régulation SOS chez certaines espèces bactériennes à une perte d'activité de l'intégrase (Cambray et al., 2011). Dans ces espèces, les intégrases, trop coûteuses et non régulées, seraient inactivées. *In vitro*, cette observation a d'ailleurs pu être faite dans des populations de *A. baylyi* contenant des intégrons et propagées sur plusieurs générations (Starikova et al., 2012). Dans cette espèce bactérienne dépourvue du répresseur LexA, le gène *intl* était rapidement inactivé par des mutations modifiant le cadre de lecture. Dans des modèles *in silico* d'évolution, l'activité de l'intégrase a pourtant été montrée comme essentielle pour s'adapter à des pressions antibiotiques (Engelstadter et al., 2016). Dans ces conditions, la répression du gène *intl* semble être une bonne solution adaptative pour en préserver l'intégrité.

Nous avons également montré que le coût d'un intégron est dépendant du promoteur qu'il contient. Plus le promoteur est fort, plus les cassettes sont exprimées et plus le coût de la structure est élevé (diminution du fitness de l'hôte de 1,3% à 4% selon la force du Pc). Plusieurs études épidémiologiques ont déjà

souligné la forte prévalence d'intégrons à Pc faibles (PcW et PcH1) (Vinué et al., 2011 ; Wei et al., 2013b). Pour rappel, ces mêmes intégrons sont associés à l'intégrase IntI_{R32_H39}, la plus active des intégrases (Jové et al., 2010). On peut penser que ces structures soient davantage conservées en raison de la forte activité de leur intégrase. Une intégrase plus active serait plus favorable et propice à l'adaptation des bactéries qu'une intégrase peu active. En outre, d'après nos résultats, les intégrons à Pc faibles sont moins coûteux que leurs homologues à Pc forts. Il serait donc doublement avantageux pour une bactérie d'avoir un intégron avec un Pc faible, à la fois propice au maintien des intégrons (faible coût) et propice à l'adaptation (intégrase à forte activité). Néanmoins, dans ce cas, le niveau d'expression des cassettes restera faible. Tous ces éléments nous laissent à penser que dans des contextes où les pressions de sélection sont faibles mais multiples, les intégrons à Pc faibles vont être privilégiés. Ils permettraient de s'adapter à des pressions fluctuantes, grâce à leur intégrase active, au prix d'un faible coût. Ces conditions pourraient être rencontrées dans l'environnement où des concentrations d'antibiotiques faibles mais multiples ont déjà été détectées (Amábile-Cuevas, 2016 ; Kolpin et al., 2002). L'importance du dynamisme des intégrons dans l'environnement avait d'ailleurs déjà été soulevée dans de précédents travaux du laboratoire (Stalder et al., 2012).

Outre le polymorphisme du Pc, un autre facteur pourra influencer le coût du réseau de cassettes : le nombre de cassettes qu'il renferme. Nos résultats démontrent en effet une augmentation significative du coût de la structure intégron à mesure que le nombre de cassettes dans le réseau passe de 1 à 2 puis 4. Ceci suggère que plus il y aurait de gènes de résistance à exprimer, plus la structure serait coûteuse ; une observation cohérente avec de précédents travaux montrant

que le coût d'un plasmide augmente avec le nombre de gènes de résistance qu'il porte (Vogwill and MacLean, 2015). Cette corrélation directe entre le coût d'un intégron et le nombre de cassettes qu'il renferme est néanmoins à nuancer. Il a en effet été démontré que les niveaux d'expression des cassettes diminuaient à mesure que l'on s'éloigne du promoteur (Collis and Hall, 1995 ; Jacquier et al., 2009). Ainsi, passé un certain nombre de cassettes, en ajouter des supplémentaires n'aurait peut-être que peu d'impact sur le fitness de l'hôte, si ce n'est celui lié à la taille du plasmide qui porte l'intégron. En effet, nous avons montré que la taille du plasmide, même si elle intervient peu a tout de même un effet. Le coût plus important des longs réseaux pourrait par ailleurs expliquer pourquoi les intégrons mobiles contiennent au maximum dix cassettes, et le plus souvent seulement deux à trois cassettes. Garder un petit réseau au coût limité serait plus propice au maintien et à la dissémination des intégrons. Néanmoins ces résultats demandent à être confirmés car comme nous allons le discuter juste après, le coût des cassettes varie aussi selon leur nature. Ainsi, un réseau contenant des cassettes différentes pourrait donner des résultats différents de ceux que nous avons observés.

Nous avons en effet montré que certaines cassettes étaient plus coûteuses que d'autres. Ainsi par exemple, la cassette *dfrA15* n'occasionne aucun coût pour son hôte. A l'inverse, la cassette *aac(6)-lb* apparait comme significativement plus coûteuse que les autres cassettes testées. Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées pour expliquer ces différences. Elles pourraient tout d'abord être liées à des capacités de recombinaison différentes. Dans nos expériences les sites *attC* associés aux cassettes *dfrA15* et *aadA1*, avec leurs bases extra-hélicoïdales T-N₆-C et T-N₆-G, sont a priori les plus recombino-gènes. Une étude antérieure ayant réalisé des tests d'excision sur des intégrons contenant des cassettes aux sites *attC*

différents a en effet montré que l'intégrase IntI1 était particulièrement efficace sur des sites *attC* présentant des bases extra-hélicoïdales de type T-N₆-C et T-N₆-G (Larouche and Roy, 2011). A l'inverse la cassette *aac(6')-Ib* et son site *attC* au motif extra-hélicoïdal TC-N₆-G est une cassette très peu propice à la recombinaison. L'intégrase IntI1 serait même incapable d'exciser ce genre de cassette (Larouche and Roy, 2011). Les motifs extra-hélicoïdaux seuls ne peuvent cependant pas présumer de la capacité d'un site *attC* à recombiner. Des travaux ont également montré l'importance de la taille des sites *attC* et de leur région VTS sur la bonne structuration du motif cruciforme simple brin, matrice de la recombinaison (Loot et al., 2010). En prenant en compte ces considérations, la capacité des cassettes à recombiner peut être classée de la façon suivante : *attC_{aadA1}* (court et recombinogène) > *attC_{dfrA15}* (long mais recombinogène) >>> *attC_{catB9}* (long et peu recombinogène) ≈ *attC_{aac(6')-Ib}* (moyennement long et très peu recombinogène). Compte tenu de l'ordre de coût obtenu lors de nos expériences (*aac(6')-Ib* > *catB9* = *aadA1* > *dfrA15*), il n'y a à priori aucun lien logique entre le coût d'une cassette et sa capacité à recombiner. Les différences de coût pourraient donc être liées aux gènes en eux-mêmes et aux résistances qu'ils confèrent. De précédents travaux sur la résistance chromosomique ont par exemple montré des différences significatives de coût selon le mécanisme de résistance considéré (Vogwill and MacLean, 2015). Dans ces travaux étudiant plus de 760 mutations chromosomiques, Vogwill et MacLean ont montré que les résistances faisant intervenir des pompes d'efflux seraient en moyenne moins coûteuses que les résistances faisant intervenir des β-lactamases. Si les données manquent sur la résistance non chromosomique, les gènes *dfr* pourraient néanmoins être des gènes naturellement peu coûteux comme le suggère leur stabilité en l'absence de pression de sélection antibiotique. Une

étude suédoise montre par exemple une absence totale de diminution de la prévalence des gènes *dfr* chez *K. pneumoniae* et *E. coli* sur une période de 2 ans en dépit d'une diminution de 85% des prescriptions de triméthoprim (Brolund et al., 2010). Dans l'hypothèse où le coût de la résistance serait bien tributaire du mécanisme impliqué, il demeure surprenant que les cassettes *aac(6')-Ib* et *catB9* codant deux enzymes aux activités similaires (acétyltransférases) et possédant des capacités de recombinaison proches aient pourtant des coûts biologiques si différents. Il a néanmoins été montré qu'un gène *aac(2')* isolé chez *Providencia stuartii* codait une acétyltransférase capable non seulement d'acétyler certains aminosides pour les inactiver mais aussi capable d'acétyler *in vitro* le peptidoglycane (Payie and Clarke, 1997) ; une acétylation qui permet de protéger le peptidoglycane de l'action des muramidases (lysozyme). On peut imaginer donc que l'acétyltransférase codée par le gène *aac(6')-Ib* pourrait elle aussi un rôle au niveau du métabolisme de la bactérie, impactant le fitness de l'hôte.

Il est également intéressant de constater que les cassettes *aad* et *dfr*, peu coûteuses, sont des cassettes très fréquemment retrouvées chez *E. coli*. Chacune est présente dans plus de 60% des réseaux d'intégrons isolés chez cette espèce d'après les données de la banque d'intégrons Integrall (<http://integrall.bio.ua.pt/>). On peut imaginer que le faible coût de ces cassettes favoriserait leur maintien dans les intégrons. A l'inverse, la cassette *aac(6')-Ib*, plus coûteuse, n'est présente que dans 11% des intégrons isolés chez *E. coli*. En raison de son coût, elle serait moins facilement maintenue.

L'ordre des cassettes dans le réseau pourrait avoir son importance. Des cassettes très coûteuses placées en première position dans le réseau et donc fortement exprimées seront à priori peu avantageuses. A l'inverse, positionner une

cassette peu ou pas coûteuse en première position et éloigner les cassettes coûteuses pour diminuer leur niveau d'expression pourrait réduire le coût de la structure. Une hypothèse d'autant plus crédible que lorsqu'elles sont présentes, les cassettes *dfr* sont situées en première position dans plus de 70% des réseaux de cassettes décrits (Integrall). Ici encore, l'intégron pourrait mettre à profit sa dynamique pour réarranger le réseau et réduire son coût. Attention toutefois, le coût des cassettes ne doit pas être le seul déterminant gouvernant l'ordre des cassettes dans le réseau. Il a par exemple été montré que de nombreuses cassettes ne présentaient pas de région initiatrice de la traduction (TIR) efficace et nécessitaient d'être en première position dans le réseau pour être correctement traduite par couplage traductionnel avec l'orf11 (Hanau-Berçot et al., 2002). Cette nécessité pourrait expliquer pourquoi la cassette *aac(6')-Ib* qui possède une TIR inefficace (Hanau-Berçot et al., 2002) est souvent retrouvée en première position lorsque présente, malgré son coût (60% des cas chez *E. coli* d'après Integrall).

Nos travaux ont enfin démontré l'impact des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques sur la dissémination des intégrons. La présence d'antibiotiques même à faible concentration est capable de promouvoir la sélection et la dissémination des bactéries porteuses d'intégrons en particulier ceux portant des Pc forts et donc associés à de plus haut niveaux de résistance. Des observations similaires ont déjà été réalisées sur des souches de *E. coli* et *S. enterica* portant des résistances individuelles à différents antibiotiques (ciprofloxacine, tétracycline ou aminosides). Des compétitions entre ces souches et des souches sensibles isogéniques ont permis de montrer que dans certains cas, des concentrations sub-inhibitrices jusqu'à 100 fois inférieures à la CMI des souches sensibles étaient capables de favoriser la propagation de certaines souches résistantes (sélection de bactéries portant la

mutation *gyr1A* par la ciprofloxacine et de bactéries portant le Tn10dT par la tétracycline) (Gullberg et al., 2011). En moyenne, la plupart des mutations de résistance testées étaient favorisées dès lors que la concentration en antibiotique appliquée dépassait une concentration égale à la CMI de la souche sensible divisée par 10. De quoi alerter une nouvelle fois sur les dangers d'une mauvaise utilisation des antibiotiques et sur le risque qu'ils représentent même à faibles concentrations.

II. Dynamique d'évolution du promoteur Pc.

Les études sur la dynamique d'évolution des intégrons sont rares. En dépit de quelques travaux sur la dynamique de réarrangement des cassettes (Barraud and Ploy, 2015; Pérez-Valdespino et al., 2016), l'impact des pressions de sélection sur le devenir de la plateforme 5'CS des intégrons reste inconnu.

Dans ses travaux, Gillings propose que les intégrons de classe 1 sont issus d'intégrons chromosomiques capturés par des transposons de type Tn402 (Gillings et al., 2008). Il base ce postulat sur l'analyse de séquences d'intégrons chromosomiques isolées de β -protéobactéries environnementales. Toutes les séquences alors considérées contenaient un gène *intl* codant l'intégrase Int_{R32_H39} et portant le variant faible du promoteur PcW suggérant que l'origine de ce dernier serait très ancienne. De façon intéressante, la majorité des autres promoteurs décrits chez les intégrons de classe 1 diffère du PcW par une ou deux mutations dans la région promotrice. On peut alors se demander si ces variants de Pc ne seraient pas tous issus du PcW (Figure 50, page 162). Dans de précédents travaux réalisés au laboratoire, il a été proposé que cette transition du PcW vers des Pc plus forts ait été une réponse adaptative à des stress antibiotiques (Jové et al., 2010). Dans des conditions de stress antibiotique modéré, le PcW aurait naturellement évolué vers le

PcH1 codant une intégrase tout aussi active mais permettant de mieux résister à la pression antibiotique (Figure 50, page 162). Des pressions antibiotiques plus fortes auraient conduit à l'émergence des variants PcW_{TGN-10}, PcH2 et PcS, une évolution qui se serait néanmoins faite au détriment de l'activité des intégrases (Figure 50, page 162). Ces hypothèses n'ont néanmoins jamais été testées expérimentalement.

Afin de vérifier expérimentalement si le polymorphisme du Pc pouvait être une réponse adaptative à des pressions de sélection antibiotiques, nous avons entrepris de réaliser des expériences d'évolution en chemostat pour nous affranchir de certaines limitations de la culture en batch (goulot d'étranglement, physiologie des bactéries non contrôlée,...). Une population de *E. coli* MG1656, porteuse d'intégrons codant une unique cassette *aac(6')-Ib*, a été propagée sur 200 générations en présence ou non de concentrations sub-inhibitrices de tobramycine (pression de sélection). Un antibiotique inducteur de la réponse SOS (ciprofloxacine) a également été utilisé en complément de la tobramycine pour évaluer si la mutagenèse SOS-induite pouvait favoriser l'émergence de Pc forts. A l'issue des expériences d'évolution, la région promotrice des populations évoluées a été séquencée par une approche de deep-sequencing et comparée à la séquence promotrice ancestrale afin d'évaluer l'éventuelle apparition de mutations.

En dépit d'une méthode de séquençage sensible permettant de détecter des variants de Pc à hauteur de 0,5% de la population totale, nos analyses génotypiques n'ont pas permis d'identifier de mutations dans la région promotrice Pc, quelles que soient les conditions utilisées (avec ou sans tobramycine et avec ou sans ciprofloxacine). Dans les conditions de notre expérience, l'émergence de promoteurs forts ne semble pas être une réponse prédominante.

Afin de mieux comprendre ce qui avait pu avoir lieu à l'échelle génotypique et de repenser notre protocole d'évolution en fonction, nous nous sommes alors tournés vers l'analyse phénotypique des populations évoluées. Ces analyses ont notamment relevé une part importante d'adaptation chromosomique. La majorité de la résistance acquise à l'issue de l'expérience semblait tributaire de mutations chromosomiques. D'autres travaux s'intéressant à l'évolution plasmidique en réponse à un stress antibiotique ont déjà été confrontés à ce problème de l'évolution chromosomique. Dans une de leurs expériences, Bouma et Lenski ont propagé un plasmide de résistance (tétracycline et chloramphénicol résistant) dans un milieu pauvre en présence de chloramphénicol sur 500 générations (Bouma and Lenski, 1988). A l'issue de l'expérience, l'analyse du fitness des souches évoluées et de souches non évoluées transformées avec le plasmide évolué a révélé une apparente absence d'adaptation plasmidique. En dépit de la part majeure d'adaptation chromosomique dans notre expérience, pour 3 des 12 populations évoluées, la transformation des plasmides extraits de ces populations dans la souche ancestrale a montré que les plasmides étaient plus délétères que les plasmides ancestraux. Ceci suggère que des modifications des plasmides sont apparues au cours du temps. A l'heure actuelle, nos analyses n'ont néanmoins pas permis d'identifier les événements génétiques impliqués. Le séquençage complet de ces plasmides serait nécessaire.

L'analyse du nombre de copies de plasmides dans les populations évoluées a par ailleurs révélé chez certaines populations une augmentation très significative de ce nombre en lien avec les plus hauts niveaux de résistance observés. Cependant, ces hauts niveaux de résistance étaient perdus lorsque les plasmides étaient transformés dans la souche ancestrale non évoluée. Le séquençage des origines de

réplication des plasmides évolués n'a par ailleurs révélé aucune mutation, suggérant l'implication probable de mutations chromosomiques dans l'augmentation du nombre de copies de plasmides. Une hypothèse qui pourrait être confirmée en évaluant le nombre de copies de plasmides dans les souches non évoluées transformées avec les plasmides évolués. Des mutations chromosomiques conduisant à une augmentation du nombre de copies de plasmides ont déjà été observées chez *E. coli*. Une équipe a montré que des mutations dans le gène *himD*, codant une sous-unité de la protéine IHF impliquée dans la structuration de l'ADN pouvaient se traduire par une augmentation significative du nombre de copies de différents plasmides portant une origine de réplication de type p15a, identique à celle des plasmides utilisés dans notre travail (Hiszczyńska-Sawicka and Kur, 1997). Dans les souches mutées, le nombre de copies de ces plasmides passait de 15 à plus de 60 ; des valeurs qui corrélaient avec celles reportées dans notre travail. Le séquençage du gène *himD* dans les souches évoluées serait néanmoins nécessaire pour conclure.

L'exemple précédent illustre à nouveau le problème posé par l'adaptation chromosomique. Pour favoriser l'adaptation à l'échelle du plasmide, il faudrait trouver un moyen de s'affranchir de cette réponse chromosomique. Une solution souvent utilisée dans la littérature consiste à extraire et retransformer les plasmides dans la souche initiale à mesure que l'expérience progresse (De Gelder et al., 2008 ; Sota et al., 2010). Bien que cette approche soit une solution efficace, elle ne mime pas réellement les phénomènes naturels où de tels « reboot » du fond génétique de l'hôte sont impossibles. Plutôt que d'éliminer toute trace d'évolution chromosomique, une autre solution est de la rendre moins favorable que l'évolution plasmidique. Dans ce contexte, une implémentation de notre protocole expérimental serait de ne pas utiliser un intégron portant une seule cassette de résistance et donc soumis à une

seule pression de sélection. L'ajout de cassettes et donc l'usage de plusieurs pressions simultanées pourrait en effet favoriser l'apparition de mutations dans le promoteur Pc. Dans ces conditions de pressions simultanées, une mutation dans le promoteur Pc n'impliquerait qu'un seul événement génétique qui pourtant permettrait d'augmenter la résistance à toutes les pressions de sélection utilisées. A l'inverse, il faudrait plusieurs mutations chromosomiques pour conférer la résistance à plusieurs pressions de sélection simultanées. La première solution est donc la réponse la plus simple et la plus probable pour s'adapter efficacement à des pressions simultanées. Utiliser un intégron à deux voire trois cassettes et avec deux à trois pressions correspondantes et simultanées pourrait donc favoriser l'évolution de la région promotrice. Attention toutefois, travailler avec un intégron à plusieurs cassettes ouvre la possibilité de réarrangements de cassettes. Il conviendrait donc de travailler avec des cassettes peu recombino-gènes pour limiter ce genre d'événements et « forcer » l'évolution dans la région promotrice.

Par ailleurs, il est possible que le nombre de générations ait été trop faible dans notre expérience pour permettre l'émergence et la propagation d'intégrons à Pc forts. De précédents travaux sur la dynamique de l'adaptation dans un milieu homogène ont montré que le l'évolution du fitness au cours du temps pouvait être modélisée par une loi de puissance (Wiser et al., 2013). Cette loi de puissance implique que les mutations les plus bénéfiques pour l'hôte apparaissent rapidement lors des premières générations de l'évolution. Une étude réalisée sur un plasmide IncP-1 β extrait d'une souche de *Bordetella pertussis* et transformé chez *Shewanella oneidensis* montre par exemple l'apparition de mutations dans le gène *trfA1*, codant une protéine d'initiation de la réplication, dès 200 générations bactériennes dans tous les réplicats de l'expérience (Hughes et al., 2012). Cette mutation permettait

d'augmenter significativement la stabilité du plasmide dans son nouvel hôte. 200 générations de cultures bactériennes pourraient donc être suffisantes pour observer des mutations plasmidiques. Néanmoins, l'expérience de Bouma et Lenski dans laquelle aucune adaptation plasmidique n'a été mise en évidence après 500 génération de culture (*Bouma and Lenski, 1988*) montre que cette adaptation rapide n'est pas une réponse systématique. Si l'on considère la loi de puissance mentionnée précédemment, l'apparition de mutations dans un plasmide lors des premières générations de croissance pourrait être conditionnée à l'impact de ces mutations sur le fitness de l'hôte. Des mutations plasmidiques ayant un effet très bénéfique pour l'hôte seraient susceptibles d'apparaître plus tôt. Là encore l'utilisation d'un intégron à plusieurs cassettes et soumis à des pressions antibiotiques simultanées permettrait de favoriser l'apparition de mutants Pc dans des temps de générations courts. Une mutation augmentant la force du promoteur serait en effet particulièrement bénéfique pour le fitness de l'hôte et serait donc susceptible d'apparaître tôt.

Une autre raison pour expliquer l'absence d'évolution du promoteur pourrait avoir été une pression de sélection insuffisante. Même si les expériences de fitness ont montré qu'une pression de sélection quatre fois inférieure à la CMI était suffisante pour permettre la sélection d'intégrons à Pc fort dans une population mixte d'intégron en batch, il en est peut être autrement en chemostat. Des travaux ont notamment montré que des bactéries propagées en chemostat à de faibles taux de dilution avaient une sensibilité diminuée aux antibiotiques (Brown et al., 1990). Au taux de dilution utilisé dans nos expériences, peut être que la pression choisie était très inférieure à la sensibilité réelle des bactéries et donc insuffisante. Un contrôle intéressant à réaliser serait de mettre en compétition des bactéries porteuses

d'intégrons à Pc faible et Pc fort en chemostat dans les conditions de l'expérience d'évolution afin de déterminer la pression de sélection suffisante permettant d'enrichir le milieu en bactéries porteuses d'intégrons à Pc fort.

En l'état actuel, il est donc difficile de conclure sur notre hypothèse de départ. L'absence d'évolution du promoteur Pc en réponse à un stress antibiotique pourrait aussi bien être une réalité biologique que tributaire de mauvais choix dans notre protocole expérimental. Les perspectives futures de ce projet seront évoquées dans la conclusion de ce travail.

Conclusions – Perspectives

Nos travaux avaient pour objectifs d'explorer la dynamique évolutive des intégrons de classe 1 d'une part en évaluant le coût biologique de cette structure génétique, et d'autre part en évaluant l'évolution des intégrons *via* l'évolution génétique du promoteur Pc.

I. Coût biologique des intégrons.

Cette étude a permis de montrer que les intégrons sont des structures génétiques très peu coûteuses pour *E. coli*, en plus d'être d'incroyables outils adaptatifs. Ce faible coût serait notamment lié à la répression du gène de l'intégrase par la réponse SOS. La répression de l'expression de l'intégrase la plus active (IntI_{R32_H39}) permet de réduire le coût biologique de l'intégron d'un facteur 2 chez *E. coli*. Cette répression éviterait l'expression constitutive d'une protéine à l'activité catalytique potentiellement dommageable pour l'hôte,

Nos travaux ont également démontré que dans des conditions de répression par le système SOS, le coût d'un intégron est principalement lié à l'expression du réseau de cassettes. Ainsi le coût d'un intégron dépendra de la force du Pc qu'il contient : plus le Pc sera fort, plus les cassettes seront exprimées et plus l'intégron sera coûteux. Ce coût biologique semble dépendre du contenu du réseau de cassettes et plus particulièrement du nombre de cassettes et de leur nature. Le coût biologique est augmenté d'un facteur 8 lorsque que le réseau passe de une à quatre cassettes. L'impact de la nature des cassettes est quant à lui est variable, certaines cassettes sont plus coûteuses que d'autres, la cassette *aac(6')Ib* étant ici trois fois plus coûteuse que la cassette *catB9* ou *aadA1*. Ainsi selon son contenu en cassettes, le coût d'un intégron est différent.

Nos travaux sur le coût des intégrons soulignent enfin l'impact favorable de pressions de sélection sub-inhibitrice sur la sélection de bactéries porteuses

d'intégrons en particulier ceux contenant un variant fort de Pc. Ces résultats illustrent le danger produit par la mauvaise utilisation des antibiotiques et par leur présence à faible concentration dans l'environnement.

De façon intéressante, nos données établissent le lien avec des études épidémiologiques montrant la forte prévalence des intégrons à Pc faibles dans des bactéries d'origine clinique ou environnementale, mais aussi la forte prévalence de certaines cassettes dans les réseaux des intégrons comme la cassette *dfr* par exemple.

Pour ce qui est des perspectives, il serait désormais intéressant d'évaluer le coût d'intégrons cliniques en les clonant dans notre plasmide de travail (pZA2). Nous pourrions alors transformer ces plasmides dans la souche *E. coli* MG1656 et les mettre en compétition contre la souche MG1656 λ att::gfp contenant le plasmide pZA2 vide.

Nos résultats ont aussi soulevé la question de l'impact de l'ordre des cassettes sur le coût de l'intégron. Afin d'évaluer cet impact, il serait intéressant de mesurer le coût de réseaux dans lesquels les cassettes étudiées ici sont agencées différemment. Avec notre modèle d'intégron à 4 cassettes, il serait par exemple intéressant de comparer le coût d'un réseau débutant par la cassette la plus coûteuse (*aac(6')-Ib*) et terminant par la cassette non coûteuse (*dfrA15*) à celui d'un réseau avec les mêmes cassettes mais en ordre inverse.

Nous avons enfin envisagé l'hypothèse qu'un intégron puisse mettre à profit sa dynamique pour réduire son coût en réarrangeant le réseau dans une conformation « rentable ». Pour évaluer cette hypothèse, il serait intéressant d'évaluer la dynamique de réarrangement des cassettes en lien avec le fitness de l'hôte, par exemple en faisant évoluer expérimentalement une souche *E. coli*

MG1656 contenant un intégron exprimant constitutivement l'intégrase et un réseau défavorable de cassettes (cassettes coûteuses proches du Pc et cassettes peu coûteuses éloignées du Pc) dans un milieu sans pression de sélection antibiotique. Il serait alors intéressant de voir si des réarrangements de cassettes se produisent puis d'identifier les réarrangements associés à une amélioration du fitness de l'hôte.

II. Dynamique d'évolution du promoteur Pc.

Nos travaux sur la dynamique d'évolution du promoteur Pc n'ont malheureusement pas permis de mettre en évidence l'émergence de variants de Pc forts en réponse à un stress antibiotique en dépit d'une méthode d'analyse sensible permettant la détection de variants de Pc à hauteur de 0,5% de la population finale. L'analyse des populations évoluées révèle en outre une part majoritaire d'évolution chromosomique qui a sans doute limité l'adaptation à l'échelle du plasmide et donc de l'intégron. Dans ces conditions, il reste difficile de conclure sur les résultats obtenus. Peut être que cette absence d'évolution atteste d'une réalité biologique ou simplement d'un protocole expérimental d'évolution à optimiser.

Il serait tout d'abord intéressant de poursuivre l'expérience d'évolution au-delà de 200 générations à partir des échantillons conservés à -80°C. Nous pourrions ainsi vérifier si quelques générations supplémentaires d'évolution ne seraient pas suffisantes pour voir émerger des mutations dans le promoteur Pc.

Par ailleurs, pour estimer l'efficacité de la pression de sélection appliquée, il serait intéressant de conduire des compétitions entre bactéries porteuses d'intégrons à Pc faibles et Pc forts en chemostat et dans les conditions de nos expériences d'évolution. Une pression antibiotique efficace devrait en effet être capable d'induire la sélection des bactéries porteuses de variants de Pc forts. Nous pourrions alors au

besoin redéfinir la pression de sélection à appliquer dans nos expériences d'évolution.

Enfin, pour limiter la part d'adaptation chromosomique aux antibiotiques, nous pourrions également rendre la mutation promotrice plus favorable en utilisant un intégron à plusieurs (3 ou 4) cassettes et en appliquant plusieurs pressions de sélection simultanées. La multirésistante pourrait alors être acquise selon deux schémas :

-soit suite à plusieurs mutations chromosomiques. Néanmoins, la probabilité cumulée de ces événements indépendants rend cette option statistiquement peu probable.

-soit par un seul événement mutationnel dans le promoteur P_c statistiquement plus probable.

Une possibilité de mutation chromosomique aux effets pléiotropiques permettant de résister à plusieurs antibiotiques reste aussi envisageable. Il conviendrait alors de bien choisir les antibiotiques de travail pour éviter des mécanismes de résistance communs.

Bibliographie

- Abraham, E.P., Chain, E., 1940. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature* 146, 837.
- Agersø, Y., Aarestrup, F.M., Pedersen, K., Seyfarth, A.M., Struve, T., Hasman, H., 2012. Prevalence of extended-spectrum cephalosporinase (ESC)-producing *Escherichia coli* in Danish slaughter pigs and retail meat identified by selective enrichment and association with cephalosporin usage. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 582–588.
- Agersø, Y., Sandvang, D., 2005. Class 1 Integrons and Tetracycline Resistance Genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas spp.* Isolated from Pigsties and Manured Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7941–7947.
- Ahmed, A.M., Motoi, Y., Sato, M., Maruyama, A., Watanabe, H., Fukumoto, Y., Shimamoto, T., 2007. Zoo Animals as Reservoirs of Gram-Negative Bacteria Harboring Integrons and Antimicrobial Resistance Genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6686–6690.
- Ahmed, A.M., Nakano, H., Shimamoto, T., 2005. Molecular characterization of integrons in non-typhoid *Salmonella serovars* isolated in Japan: description of an unusual class 2 integron. *J. Antimicrob. Chemother.* 55, 371–374.
- Ahmed, H.A., El-Hofy, F.I., Shafik, S.M., Abdelrahman, M.A., Elsaid, G.A., 2016. Characterization of Virulence-Associated Genes, Antimicrobial Resistance Genes, and Class 1 Integrons in *Salmonella enterica serovar Typhimurium* Isolates from Chicken Meat and Humans in Egypt. *Foodborne Pathog. Dis.* 13, 281–288.
- Akiba, T., Koyama, K., Ishiki, Y., Kimura, S., Fukushima, T., 1960. ON THE MECHANISM OF THE DEVELOPMENT OF MULTIPLE-DRUG-RESISTANT CLONES OF *SHIGELLA*. *Jpn. J. Microbiol.* 4, 219–227.
- Albrich, W.C., Monnet, D.L., Harbarth, S., 2004. Antibiotic Selection Pressure and Resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 514–517.
- Al-Hassan, L., Opazo, A., Lopes, B.S., Mahallawy, H.E., Amyes, S.G.B., 2015. Variations in IS6 promoters alter the expression of carbapenem resistance in related strains of *Acinetobacter baumannii*. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 3, 5–8.
- Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., Handelsman, J., 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nat Rev Micro* 8, 251–259.
- Amábile-Cuevas, C.F., 2016. Antibiotics and Antibiotic Resistance in the Environment. CRC Press, Leiden, The Netherlands.
- Andersson, D.I., Hughes, D., 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat Rev Micro* 12, 465–478.

- Andersson, D.I., Hughes, D., 2011. Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 901.
- Andersson, D.I., Hughes, D., 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 260–271.
- Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N., Ohta, M., 1995. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla*IMP. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1612–1615.
- Arthur, M., Molinas, C., Depardieu, F., Courvalin, P., 1993. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* BM4147. *J. Bacteriol.* 175, 117–127.
- Bagattini, M., Crispino, M., Gentile, F., Barretta, E., Schiavone, D., Boccia, M., Triassi, M., Zarrilli, R., 2004. A nosocomial outbreak of *Serratia marcescens* producing inducible Amp C-type beta-lactamase enzyme and carrying antimicrobial resistance genes within a class 1 integron. *J. Hosp. Infect.* 56, 29–36.
- Baharoglu, Z., Bikard, D., Mazel, D., 2010. Conjugative DNA Transfer Induces the Bacterial SOS Response and Promotes Antibiotic Resistance Development through Integron Activation. *PLoS Genet* 6, e1001165.
- Baharoglu, Z., Krin, E., Mazel, D., 2012. Connecting Environment and Genome Plasticity in the Characterization of Transformation-Induced SOS Regulation and Carbon Catabolite Control of the *Vibrio cholerae* Integron Integrase. *J. Bacteriol.* 194, 1659–1667.
- Baharoglu, Z., Mazel, D., 2014. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 1126–1145.
- Baharoglu, Z., Mazel, D., 2011. *Vibrio cholerae* Triggers SOS and Mutagenesis in Response to a Wide Range of Antibiotics: a Route towards Multiresistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 2438–2441.
- Barber, M., 1948. Infection by penicillin resistant *Staphylococci*. *Lancet* 2, 641–644.
- Barber, M., 1947a. Coagulase-positive *staphylococci* resistant to penicillin. *J. Pathol. Bacteriol.* 59, 373–384.
- Barber, M., 1947b. Staphylococcal Infection due to Penicillin-resistant Strains. *Br. Med. J.* 2, 863–865.
- Barbolla, R., Catalano, M., Orman, B.E., Famiglietti, A., Vay, C., Smayevsky, J., Centrón, D., Piñeiro, S.A., 2004. Class 1 Integrons Increase Trimethoprim-Sulfamethoxazole MICs against Epidemiologically Unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 666–669.

- Barlow, R.S., Gobius, K.S., 2006. Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 1133–1138.
- Barraud, O., Baclet, M.C., Denis, F., Ploy, M.C., 2010. Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1642–1645.
- Barraud, O., Badell, E., Denis, F., Guiso, N., Ploy, M.-C., 2011. Antimicrobial drug resistance in *Corynebacterium diphtheriae mitis*. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 2078–2080.
- Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., Ploy, M.-C., 2013. An antibiotic-resistant class 3 integron in an *Enterobacter cloacae* isolate from hospital effluent. *Clin. Microbiol. Infect.* 19, E306–E308.
- Barraud, O., François, B., Chainier, D., Vignaud, J., Ploy, M.-C., 2014. Value of integron detection for predicting antibiotic resistance in patients with Gram-negative septicaemia. *Int. J. Antimicrob. Agents* 44, 351–353.
- Barraud, O., Isnard, C., Lienhard, R., Guérin, F., Couvé-Deacon, E., Martin, C., Cattoir, V., Ploy, M.C., 2016. Sulphonamide resistance associated with integron derivative Tn6326 in *Actinotignum schaalii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2670–2671.
- Barraud, O., Ploy, M.-C., 2015. Diversity of Class 1 Integron Gene Cassette Rearrangements Selected under Antibiotic Pressure. *J. Bacteriol.* 197, 2171–2178.
- Baym, M., Lieberman, T.D., Kelsic, E.D., Chait, R., Gross, R., Yelin, I., Kishony, R., 2016. Spatiotemporal microbial evolution on antibiotic landscapes. *Science* 353, 1147.
- Beaber, J.W., Hochhut, B., Waldor, M.K., 2004. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 427, 72–74.
- Bennett, P.M., 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacol.* 153, S347–S357.
- Bergman, M., Huikko, S., Pihlajamäki, M., Laippala, P., Palva, E., Huovinen, P., Seppälä, H., Finnish Study Group for Antimicrobial Resistance (FiRe Network), 2004. Effect of Macrolide Consumption on Erythromycin Resistance in *Streptococcus pyogenes* in Finland in 1997–2001. *Clin. Infect. Dis.* 38, 1251–1256.
- Bergstrom, C.T., Lipsitch, M., Levin, B.R., 2000. Natural selection, infectious transfer and the existence conditions for bacterial plasmids. *Genetics* 155, 1505–1519.
- Billard-Pomares, T., Fouteau, S., Jacquet, M.E., Roche, D., Barbe, V., Castellanos, M., Bouet, J.Y., Cruveiller, S., Médigue, C., Blanco, J., Clermont, O., Denamur, E., Branger, C., 2014. Characterization of a P1-Like Bacteriophage

- Carrying an SHV-2 Extended-Spectrum β -Lactamase from an *Escherichia coli* Strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 6550–6557.
- Biskri, L., Mazel, D., 2003. Erythromycin esterase gene *ere(A)* is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3326–3331.
- Bissonnette, L., Roy, P.H., 1992. Characterization of *In0* of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 174, 1248–1257.
- Blount, Z.D., Barrick, J.E., Davidson, C.J., Lenski, R.E., 2012. Genomic analysis of a key innovation in an experimental *Escherichia coli* population. *Nature* 489, 513–518.
- Bouma, J.E., Lenski, R.E., 1988. Evolution of a bacteria/plasmid association. *Nature* 335.
- Bouvier, M., Ducos-Galand, M., Loot, C., Bikard, D., Mazel, D., 2009. Structural Features of Single-Stranded Integron Cassette *attC* Sites and Their Role in Strand Selection. *PLoS Genet* 5, e1000632.
- Brolund, A., Sundqvist, M., Kahlmeter, G., Grape, M., 2010. Molecular Characterisation of Trimethoprim Resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during a Two Year Intervention on Trimethoprim Use. *PLoS ONE* 5, e9233.
- Bronzwaer, S.L., Cars, O., Buchholz, U., Mölsted, S., Goettsch, W., Veldhuijzen, I.K., Kool, J.L., Sprenger, M.J., Degener, J.E., participants in the European Antimicrobial Resistance Surveillance System, 2002. The Relationship between Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 278–282.
- Brown, M.R., Collier, P.J., Gilbert, P., 1990. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: modification of the cell envelope and batch and continuous culture studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 1623–1628.
- Bryant, J., Chewapreecha, C., Bentley, S.D., 2012. Developing insights into the mechanisms of evolution of bacterial pathogens from whole-genome sequences. *Future Microbiol.* 7, 1283–1296.
- Burr, T., Mitchell, J., Kolb, A., Minchin, S., Busby, S., 2000. DNA sequence elements located immediately upstream of the -10 hexamer in *Escherichia coli* promoters: a systematic study. *Nucleic Acids Res.* 28, 1864–1870.
- Burrus, V., Waldor, M.K., 2004. Genome plasticity and the evolution of microbial genomes Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res. Microbiol.* 155, 376–386.

- Butala, M., Zgur-Bertok, D., Busby, S.J.W., 2009. The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 66, 82–93.
- Cabezón, E., Ripoll-Rozasad, J., Peña, A., de la Cruz, F., Arechaga, I., 2014. Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiol. Rev.*
- Cagle, C.A., Shearer, J.E.S., Summers, A.O., 2011. Regulation of the integrase and cassette promoters of the class 1 integron by nucleoid-associated proteins. *Microbiology* 157, 2841–2853.
- Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Guerin, É., Da Re, S., González-Zorn, B., Ploy, M.-C., Barbé, J., Mazel, D., Erill, I., 2011. Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons. *Mob. DNA* 2, 6–6.
- Cameron, F.H., Groot Obbink, D.J., Ackerman, V.P., Hall, R.M., 1986. Nucleotide sequence of the AAD(2'') aminoglycoside adenylyltransferase determinant *aadB*. Evolutionary relationship of this region with those surrounding *aadA* in R538-1 and dhfrII in R388. *Nucleic Acids Res.* 14, 8625–8635.
- Campbell, E.A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., Darst, S.A., 2001. Structural Mechanism for Rifampicin Inhibition of Bacterial RNA Polymerase. *Cell* 104, 901–912.
- Cantón, R., Ruiz-Garbajosa, P., 2011. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. *Anti-Infect. New Technol.* 11, 477–485.
- Caroff, N., Espaze, E., Bérard, I., Richet, H., Reynaud, A., 1999. Mutations in the *ampC* promoter of *Escherichia coli* isolates resistant to oxyiminocephalosporins without extended spectrum β -lactamase production. *FEMS Microbiol. Lett.* 173, 459–465.
- Cavaco, L.M., Abatih, E., Aarestrup, F.M., Guardabassi, L., 2008. Selection and Persistence of CTX-M-Producing *Escherichia coli* in the Intestinal Flora of Pigs Treated with Amoxicillin, Ceftiofur, or Cefquinome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 3612–3616.
- Chantziaras, I., Boyen, F., Callens, B., Dewulf, J., 2013. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *J. Antimicrob. Chemother.*
- Chaslus-Dancla, E., Gerbaud, G., Lagorce, M., Lafont, J.P., Courvalin, P., 1987. Persistence of an antibiotic resistance plasmid in intestinal *Escherichia coli* of chickens in the absence of selective pressure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 784–788.
- Chen, P., Shakhnovich, E.I., 2009. Lethal Mutagenesis in Viruses and Bacteria. *Genetics* 183, 639–650.

- Chen, S., Zhao, S., White, D.G., Schroeder, C.M., Lu, R., Yang, H., McDermott, P.F., Ayers, S., Meng, J., 2004. Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Salmonella Serovars* Isolated from Retail Meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1–7.
- Chen, S.T., Clowes, R.C., 1987. Variations between the nucleotide sequences of Tn1, Tn2, and Tn3 and expression of beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169, 913–916.
- Cocchi, S., Grasselli, E., Gutacker, M., Benagli, C., Convert, M., Piffaretti, J.-C., 2007. Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50, 126–132.
- Colebrook, L., Kenny, M., 1936. TREATMENT OF HUMAN PUERPERAL INFECTIONS, AND OF EXPERIMENTAL INFECTIONS IN MICE, WITH PRONTOSIL. *The Lancet* 227, 1279–1281.
- Colegrave, N., Kaltz, O., Bell, G., 2002. The ecology and genetics of fitness in *Chlamydomonas*. VIII. The dynamics of adaptation to novel environments after a single episode of sex. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 56, 14–21.
- Collis, C.M., Hall, R.M., 2004. Comparison of the structure–activity relationships of the integron-associated recombination sites *attI3* and *attI1* reveals common features. *Microbiology* 150, 1591–1601.
- Collis, C.M., Hall, R.M., 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 155–162.
- Collis, C.M., Hall, R.M., 1992. Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol. Microbiol.* 6, 2875–2885.
- Collis, C.M., Hall, R.M., 1992. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J. Bacteriol.* 174, 1574–1585.
- Collis, C.M., Kim, M.-J., Stokes, H.W., Hall, R.M., 2002. Integron-encoded IntI integrases preferentially recognize the adjacent cognate attI site in recombination with a 59-be site. *Mol. Microbiol.* 46, 1415–1427.
- Collis, C.M., Kim, M.-J., Stokes, H.W., Hall, R.M., 1998. Binding of the purified integron DNA integrase IntI1 to integron- and cassette-associated recombination sites. *Mol. Microbiol.* 29, 477–490.
- Collis, C.M., Recchia, G.D., Kim, M.-J., Stokes, H.W., Hall, R.M., 2001. Efficiency of Recombination Reactions Catalyzed by Class 1 Integron Integrase IntI1. *J. Bacteriol.* 183, 2535–2542.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., Muniesa, M., 2014. Quinolone resistance genes (*qnrA* and *qnrS*) in bacteriophage particles from wastewater samples and the effect

- of inducing agents on packaged antibiotic resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1265–1274.
- Colomer-Lluch, M., Jofre, J., Muniesa, M., 2011. Antibiotic Resistance Genes in the Bacteriophage DNA Fraction of Environmental Samples. *PLoS ONE* 6, e17549.
- Comas, I., Borrell, S., Roetzer, A., Rose, G., Malla, B., Kato-Maeda, M., Galagan, J., Niemann, S., Gagneux, S., 2012. Whole-genome sequencing of rifampicin-resistant *M. tuberculosis* strains identifies compensatory mutations in RNA polymerase. *Nat. Genet.* 44, 106–110.
- Correia, M., Boavida, F., Grosso, F., Salgado, M.J., Lito, L.M., Cristino, J.M., Mendo, S., Duarte, A., 2003. Molecular Characterization of a New Class 3 Integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2838–2843.
- Courvalin, P., 2006. Vancomycin Resistance in Gram-Positive Cocci. *Clin. Infect. Dis.* 42, S25–S34.
- Crespo, O., Catalano, M., Piñeiro, S., Matteo, M., Leanza, A., Centrón, D., 2005. Tn7 distribution in *Helicobacter pylori*: a selective paradox. *Int. J. Antimicrob. Agents* 25, 341–344.
- da Fonseca, É.L., dos Santos Freitas, F., Vicente, A.C.P., 2011. Pc promoter from class 2 integrons and the cassette transcription pattern it evokes. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 797–801.
- Da Re, S., Ploy, M.-C., 2012. [Resistance acquisition via the bacterial SOS response: the inductive role of antibiotics]. *Med. Sci.* MS 28, 179–184.
- Dahlberg, C., Chao, L., 2003. Amelioration of the cost of conjugative plasmid carriage in *Escherichia coli* K12. *Genetics* 165, 1641–1649.
- Daikos, G.L., Kosmidis, C., Tassios, P.T., Petrikkos, G., Vasilakopoulou, A., Psychogiou, M., Stefanou, I., Avlami, A., Katsilambros, N., 2007. *Enterobacteriaceae* Bloodstream Infections: Presence of Integrons, Risk Factors, and Outcome. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 2366–2372.
- Darmon, E., Leach, D.R.F., 2014. Bacterial Genome Instability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 78, 1–39.
- Davies, J., 2007. Microbes have the last word. A drastic re-evaluation of antimicrobial treatment is needed to overcome the threat of antibiotic-resistant bacteria. *EMBO Rep.* 8, 616–621.
- D’Costa, V.M., McGrann, K.M., Hughes, D.W., Wright, G.D., 2006. Sampling the Antibiotic Resistome. *Science* 311, 374–377.

- De Gelder, L., Williams, J.J., Ponciano, J.M., Sota, M., Top, E.M., 2008. Adaptive Plasmid Evolution Results in Host-Range Expansion of a Broad-Host-Range Plasmid. *Genetics* 178, 2179.
- Delcour, A.H., 2009. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 808–816.
- Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Bian, H., Li, Y., Yu, G., 2015b. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 14, 45.
- Díaz, M.A., Cooper, R.K., Cloeckert, A., Siebeling, R.J., 2006. Plasmid-Mediated High-Level Gentamicin Resistance among Enteric Bacteria Isolated from Pet Turtles in Louisiana. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 306–312.
- Dohm, M.R., Richardson, C.S., Garland, T., 1994. Exercise physiology of wild and random-bred laboratory house mice and their reciprocal hybrids. *Am. J. Physiol.* 267, R1098-1108.
- Dolejska, M., Cizek, A., Literak, I., 2007. High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from Black-headed Gulls in the Czech Republic. *J. Appl. Microbiol.* 103, 11–19.
- Domagk, G., 1935. A Contribution to the Chemotherapy of Bacterial Infections. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 61, 250–253.
- Drake, J.W., 1991. A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 7160–7164.
- Dubois, V., Parizano, M.-P., Arpin, C., Coulangue, L., Beziau, M.-C., Quentin, C., 2007. High genetic stability of integrons in clinical isolates of *Shigella spp.* of worldwide origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 1333–1340.
- Dumke, C.L., Rhodes, J.S., Garland, T., Maslowski, E., Swallow, J.G., Wetter, A.C., Cartee, G.D., 2001. Genetic selection of mice for high voluntary wheel running: effect on skeletal muscle glucose uptake. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* 1985 91, 1289–1297.
- Eichenbaum, Z., Livneh, Z., 1998. UV light induces IS10 transposition in *Escherichia coli*. *Genetics* 149.
- Ender, M., McCallum, N., Adhikari, R., Berger-Bächi, B., 2004. Fitness cost of SCCmec and methicillin resistance levels in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2295–2297.
- Engelstadter, J., Harms, K., Johnsen, P.J., 2016. The evolutionary dynamics of integrons in changing environments. *ISME J* 10, 1296–1307.
- Enne, V.I., Delsol, A.A., Davis, G.R., Hayward, S.L., Roe, J.M., Bennett, P.M., 2005. Assessment of the fitness impacts on *Escherichia coli* of acquisition of

- antibiotic resistance genes encoded by different types of genetic element. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 544–551.
- Enne, V.I., Delsol, A.A., Roe, J.M., Bennett, P.M., 2004. Rifampicin resistance and its fitness cost in *Enterococcus faecium*. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 203–207.
- Erill, I., Campoy, S., Barbé, J., 2007. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 637–656.
- Escudero, J.A., Loot, C., Nivina, A., Mazel, D., 2015. The Integron: Adaptation On Demand. *Microbiol. Spectr.* 3.
- Ferenci, T., 2008. Bacterial physiology, regulation and mutational adaptation in a chemostat environment. *Adv. Microb. Physiol.* 53, 169–229.
- Ferrándiz, M.J., Fenoll, A., Liñares, J., De La Campa, A.G., 2000. Horizontal Transfer of *parC* and *gyrA* in Fluoroquinolone-Resistant Clinical Isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 840–847.
- Ferreira, S., Paradela, A., Velez, J., Ramalheira, E., Walsh, T.R., Mendo, S., 2010. Carriage of *qnrA1* and *qnrB2*, *bla*CTX-M15, and complex class 1 integron in a clinical multiresistant *Citrobacter freundii* isolate. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 67, 188–190.
- Fleming, A., 1929. On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* 10, 226–236.
- Foucault, M.-L., Depardieu, F., Courvalin, P., Grillot-Courvalin, C., 2010. Inducible expression eliminates the fitness cost of vancomycin resistance in *enterococci*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16964–16969.
- Francia, M.V., Zabala, J.C., de la Cruz, F., García Lobo, J.M., 1999. The IntI1 Integron Integrase Preferentially Binds Single-Stranded DNA of the *attC* Site. *J. Bacteriol.* 181, 6844–6849.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W., Wood, R.D., Schultz, R.A., Ellenberger, T., 2006. DNA Repair and Mutagenesis, Second Edition. American Society of Microbiology.
- Futagawa-Saito, K., Okatani, A.T., Sakurai-Komada, N., Ba-Thein, W., Fukuyasu, T., 2010. Epidemiological Characteristics of *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* from Healthy Pigs in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 61–66.
- Gallet, R., Cooper, T.F., Elena, S.F., Lenormand, T., 2012. Measuring Selection Coefficients Below 10⁽⁻³⁾: Method, Questions, and Prospects. *Genetics* 190, 175–186.

- Gassama, A., Aïdara-Kane, A., Chainier, D., Denis, F., Ploy, M.-C., 2004. Integron-Associated Antibiotic Resistance in Enteroaggregative and Enteroinvasive *Escherichia coli*. *Microb. Drug Resist.* 10, 27–30.
- Gassama-Sow, A., Diallo, M.H., Boye, C.S., Garin, B., Sire, J.M., Sow, A.I., Aïdara-Kane, A., 2006. Class 2 integron-associated antibiotic resistance in *Shigella sonnei* isolates in Dakar, Senegal. *Int. J. Antimicrob. Agents* 27, 267–270.
- Gaze, W.H., Zhang, L., Abdousslam, N.A., Hawkey, P.M., Calvo-Bado, L., Royle, J., Brown, H., Davis, S., Kay, P., Boxall, A.B.A., Wellington, E.M.H., 2011. Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *ISME J.* 5, 1253–1261.
- Gillespie, S.H., 2002. Evolution of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Clinical and Molecular Perspective. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 267–274.
- Gillings, M., Boucher, Y., Labbate, M., Holmes, A., Krishnan, S., Holley, M., Stokes, H.W., 2008. The Evolution of Class 1 Integrons and the Rise of Antibiotic Resistance. *J. Bacteriol.* 190, 5095–5100.
- Gillings, M.R., 2014. Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 257–277.
- Giraud, E., Cloeckert, A., Baucheron, S., Mouline, C., Chaslus-Dancla, E., 2003. Fitness cost of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica serovar Typhimurium*. *J. Med. Microbiol.* 52, 697–703.
- Goldstein, C., Lee, M.D., Sanchez, S., Hudson, C., Phillips, B., Register, B., Grady, M., Liebert, C., Summers, A.O., White, D.G., Maurer, J.J., 2001. Incidence of Class 1 and 2 Integrases in Clinical and Commensal Bacteria from Livestock, Companion Animals, and Exotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 723–726.
- Goodman, M.F., 2002. Error-Prone Repair DNA Polymerases in Prokaryotes and Eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 71, 17–50.
- Goodman, M.F., Tiffin, B., 2000. The expanding polymerase universe. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 101–109.
- Goossens, H., Ferech, M., Vander Stichele, R., Elseviers, M., ESAC Project Group, 2005. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet Lond. Engl.* 365, 579–587.
- Gould, I.M., Bal, A.M., 2013. New antibiotic agents in the pipeline and how they can help overcome microbial resistance. *Virulence* 4, 185–191.
- Gravel, A., Fournier, B., Roy, P.H., 1998. DNA complexes obtained with the integron integrase IntI1 at the attI1 site. *Nucleic Acids Res.* 26, 4347–4355.

- Green, P.N., 2006. *Methylobacterium*, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 5: Proteobacteria: Alpha and Beta Subclasses*. Springer New York, New York, NY, pp. 257–265.
- Gresham, D., Dunham, M.J., 2014. The Enduring Utility of Continuous Culturing in Experimental Evolution. *Genomics* 104, 399–405.
- Grindley, N.D.F., Whiteson, K.L., Rice, P.A., 2006. Mechanisms of Site-Specific Recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 567–605.
- Guerin, É., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Da Re, S., Gonzalez-Zorn, B., Barbé, J., Ploy, M.-C., Mazel, D., 2009. The SOS Response Controls Integron Recombination. *Science* 324, 1034–1034.
- Guérin, E., Jové, T., Tabesse, A., Mazel, D., Ploy, M.-C., 2011. High-Level Gene Cassette Transcription Prevents Integrase Expression in Class 1 Integrons. *J. Bacteriol.* 193, 5675–5682.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., Andersson, D.I., 2011. Selection of Resistant Bacteria at Very Low Antibiotic Concentrations. *PLoS Pathog.* 7, e1002158.
- Haensch, S., Bianucci, R., Signoli, M., Rajerison, M., Schultz, M., Kacki, S., Vermunt, M., Weston, D.A., Hurst, D., Achtman, M., Carniel, E., Bramanti, B., 2010. Distinct Clones of *Yersinia pestis* Caused the Black Death. *PLoS Pathog* 6, e1001134.
- Hall, B.G., Barlow, M., 2004. Evolution of the serine β -lactamases: past, present and future. *Drug Resist. Updat.* 7, 111–123.
- Hall, R.M., 1999. Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann NY Acad Sci* 870, 68–80.
- Hall, R.M., 1997. Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. *Ciba Found. Symp.* 207, 192–202.
- Hall, R.M., Brookes, D.E., Stokes, H.W., 1991. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol. Microbiol.* 5, 1941–1959.
- Hall, R.M., Vockler, C., 1987. The region of the IncN plasmid R46 coding for resistance to beta-lactam antibiotics, streptomycin/spectinomycin and sulphonomides is closely related to antibiotic resistance segments found in IncW plasmids and in Tn21-like transposons. *Nucleic Acids Res.* 15, 7491–7501.
- Hanau-Berçot, B., Podglajen, I., Casin, I., Collatz, E., 2002. An intrinsic control element for translational initiation in class 1 integrons. *Mol. Microbiol.* 44, 119–130.

- Händel, N., Schuurmans, J.M., Brul, S., ter Kuile, B.H., 2013. Compensation of the Metabolic Costs of Antibiotic Resistance by Physiological Adaptation in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 3752–3762.
- Hansson, K., Sköld, O., Sundström, L., 1997. Non-palindromic *attI* sites of integrons are capable of site-specific recombination with one another and with secondary targets. *Mol. Microbiol.* 26, 441–453.
- Hansson, K., Sundström, L., Pelletier, A., Roy, P.H., 2002. IntI2 integron integrase in Tn7. *J. Bacteriol.* 184, 1712–1721.
- Harbeck, M., Seifert, L., Hänsch, S., Wagner, D.M., Birdsell, D., Parise, K.L., Wiechmann, I., Grupe, G., Thomas, A., Keim, P., Zöller, L., Bramanti, B., Riehm, J.M., Scholz, H.C., 2013. *Yersinia pestis* DNA from Skeletal Remains from the 6th Century AD Reveals Insights into Justinianic Plague. *PLoS Pathog* 9, e1003349.
- Hardwick, S.A., Stokes, H.W., Findlay, S., Taylor, M., Gillings, M.R., 2008. Quantification of class 1 integron abundance in natural environments using real-time quantitative PCR. *FEMS Microbiol. Lett.* 278, 207–212.
- Hare, J.M., Adhikari, S., Lambert, K.V., Hare, A.E., Grice, A.N., 2012. The *Acinetobacter* regulatory UmuDAb protein cleaves in response to DNA damage with chimeric LexA/UmuD characteristics. *FEMS Microbiol. Lett.* 334, 57–65.
- Harms, K., Starikova, I., Johnsen, P.J., 2013. Costly Class-1 integrons and the domestication of the the functional integrase. *Mob. Genet. Elem.* 3, e24774.
- Harrison, E., Brockhurst, M.A., 2012. Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process. *Trends Microbiol.* 20, 262–267.
- Harrison, E., Guymer, D., Spiers, A.J., Paterson, S., Brockhurst, M.A., 2015. Parallel Compensatory Evolution Stabilizes Plasmids across the Parasitism-Mutualism Continuum. *Curr. Biol.* 25, 2034–2039.
- Hawkey, P.M., 2003. Mechanisms of quinolone action and microbial response. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 29–35.
- Heir, E., Lindstedt, B.-A., Leegaard, T.M., Gjernes, E., Kapperud, G., 2004. Prevalence and characterization of integrons in blood culture *Enterobacteriaceae* and gastrointestinal *Escherichia coli* in Norway and reporting of a novel class 1 integron-located lincosamide resistance gene. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 3, 12–12.
- Henriques, I.S., Fonseca, F., Alves, A., Saavedra, M.J., Correia, A., 2006. Occurrence and diversity of integrons and β -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Res. Microbiol.* 157, 938–947.

- Heritage, J., M'Zali, F.H., Gascoyne-Binzi, D., Hawkey, P.M., 1999. Evolution and spread of SHV extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 44, 309–318.
- Hiszczyńska-Sawicka, E., Kur, J., 1997. Effect of *Escherichia coli* IHF mutations on plasmid p15A copy number. *Plasmid* 38, 174–179.
- Hughes, D., Andersson, D.I., 2012. Selection of resistance at lethal and non-lethal antibiotic concentrations. *Antimicrob. Genomics* 15, 555–560.
- Hughes, J.M., Lohman, B.K., Deckert, G.E., Nichols, E.P., Settles, M., Abdo, Z., Top, E.M., 2012. The Role of Clonal Interference in the Evolutionary Dynamics of Plasmid-Host Adaptation. *mBio* 3, e00077-12.
- Humphrey, B., Thomson, N.R., Thomas, C.M., Brooks, K., Sanders, M., Delsol, A.A., Roe, J.M., Bennett, P.M., Enne, V.I., 2012. Fitness of *Escherichia coli* strains carrying expressed and partially silent IncN and IncP1 plasmids. *BMC Microbiol.* 12, 1–9.
- Hurdle, J.G., O'Neill, A.J., Ingham, E., Fishwick, C., Chopra, I., 2004. Analysis of Mupirocin Resistance and Fitness in *Staphylococcus aureus* by Molecular Genetic and Structural Modeling Techniques. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4366–4376.
- Hyder, S.L., Streitfeld, M.M., 1978. Transfer of Erythromycin Resistance from Clinically Isolated Lysogenic Strains of *Streptococcus pyogenes* via Their Endogenous Phage. *J. Infect. Dis.* 138, 281–286.
- Jacobs, L., Chenia, H.Y., 2007. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas spp.* isolated from South African aquaculture systems. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 295–306.
- Jacoby, G.A., 2009. AmpC β -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 161–182.
- Jacquier, H., Zaoui, C., Sanson-le Pors, M.-J., Mazel, D., Berçot, B., 2009. Translation regulation of integrons gene cassette expression by the *attC* sites. *Mol. Microbiol.* 72, 1475–1486.
- Janoir, C., Podglajen, I., Kitzis, M.-D., Poyart, C., Gutmann, L., 1999. In Vitro Exchange of Fluoroquinolone Resistance Determinants between *Streptococcus pneumoniae* and *Viridans Streptococci* and Genomic Organization of the *parE-parC* Region in *S. mitis*. *J. Infect. Dis.* 180, 555–558.
- Jee, J., Rasouly, A., Shamovsky, I., Akivis, Y., R. Steinman, S., Mishra, B., Nudler, E., 2016. Rates and mechanisms of bacterial mutagenesis from maximum-depth sequencing. *Nature* 534, 693–696.
- Jensen, V.F., Jakobsen, L., Emborg, H.-D., Seyfarth, A.M., Hammerum, A.M., 2006. Correlation between apramycin and gentamicin use in pigs and an increasing

- reservoir of gentamicin-resistant *Escherichia coli*. J. Antimicrob. Chemother. 58, 101–107.
- Jeong, S.H., Lee, K., Chong, Y., Yum, J.H., Lee, S.H., Choi, H.J., Kim, J.M., Park, K.H., Han, B.H., Lee, S.W., Jeong, T.S., 2003. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- β -lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. J. Antimicrob. Chemother. 51, 397–400.
- Jin, Y., Oh, Y., Jung, J., Kim, S., Kim, J., Han, K., Kim, M., Park, S., Lee, Y., 2010. Antimicrobial resistance patterns and characterization of integrons of *Shigella sonnei* isolates in Seoul, 1999–2008. J. Microbiol. 48, 236–242.
- Johansson, C., Kamali-Moghaddam, M., Sundström, L., 2004. Integron integrase binds to bulged hairpin DNA. Nucleic Acids Res. 32, 4033–4043.
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., Claverys, J.-P., 2014. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. Nat Rev Micro 12, 181–196.
- Jové, T., Da Re, S., Denis, F., Mazel, D., Ploy, M.-C., 2010. Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. PLoS Genet. 6, e1000793.
- Kadlec, K., Wiegand, I., Kehrenberg, C., Schwarz, S., 2007. Studies on the mechanisms of β -lactam resistance in *Bordetella bronchiseptica*. J. Antimicrob. Chemother. 59, 396–402.
- Kang, H.Y., Jeong, Y.S., Oh, J.Y., Tae, S.H., Choi, C.H., Moon, D.C., Lee, W.K., Lee, Y.C., Seol, S.Y., Cho, D.T., Lee, J.C., 2005. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. J. Antimicrob. Chemother. 55, 639–644.
- Kawecki, T.J., Lenski, R.E., Ebert, D., Hollis, B., Olivieri, I., Whitlock, M.C., 2012. Experimental evolution. Trends Ecol. Evol. 27, 547–560.
- Kelly, J., Dideberg, O., Charlier, P., Wery, J., Libert, M., Moews, P., Knox, Duez, C., Fraipont, C., Joris, B., et al., 1986. On the origin of bacterial resistance to penicillin: comparison of a beta-lactamase and a penicillin target. Science 231, 1429–1431.
- Knight, G.M., Budd, E.L., Lindsay, J.A., 2013. Large mobile genetic elements carrying resistance genes that do not confer a fitness burden in healthcare-associated meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Read. Engl. 159, 1661–1672.
- Koczura, R., Przyszlakowska, B., Mokracka, J., Kaznowski, A., 2014. Class 1 Integrons and Antibiotic Resistance of Clinical *Acinetobacter calcoaceticus–baumannii* Complex in Poznań, Poland. Curr. Microbiol. 69, 258–262.

- Kohanski, M.A., DePristo, M.A., Collins, J.J., 2010. Sub-lethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol. Cell* 37, 311–320.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211.
- Köser, C.U., Ellington, M.J., Peacock, S.J., 2014. Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. *Trends Genet.* 30, 401–407.
- Kovačič, L., Paulič, N., Leonardi, A., Hodnik, V., Anderluh, G., Podlesek, Z., Žgur-Bertok, D., Križaj, I., Butala, M., 2013. Structural insight into LexA–RecA* interaction. *Nucleic Acids Res.* 41, 9901–9910.
- Krauland, M.G., Marsh, J.W., Paterson, D.L., Harrison, L.H., 2009. Integron-mediated Multidrug Resistance in a Global Collection of Nontyphoidal *Salmonella enterica* Isolates. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 388–396.
- Kurlandzka, A., Rosenzweig, R.F., Adams, J., 1991. Identification of adaptive changes in an evolving population of *Escherichia coli*: the role of changes with regulatory and highly pleiotropic effects. *Mol. Biol. Evol.* 8, 261–281.
- L'Abée-Lund, T.M., Sørnum, H., 2001. Class 1 Integrons Mediate Antibiotic Resistance in the Fish Pathogen *Aeromonas salmonicida* Worldwide. *Microb. Drug Resist.* 7, 263–272.
- Lapierre, L., Cornejo, J., Borie, C., Toro, C., San Martín, B., 2008. Genetic Characterization of Antibiotic Resistance Genes Linked to Class 1 and Class 2 Integrons in Commensal Strains of *Escherichia coli* Isolated from Poultry and Swine. *Microb. Drug Resist.* 14, 265–272.
- Laroche, E., Pawlak, B., Berthe, T., Skurnik, D., Petit, F., 2009. Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 118–130.
- Larouche, A., Roy, P.H., 2011. Effect of *attC* structure on cassette excision by integron integrases. *Mob. DNA* 2, 3–3.
- Laursen, B.S., Sørensen, H.P., Mortensen, K.K., Sperling-Petersen, H.U., 2005. Initiation of Protein Synthesis in Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 101–123.
- Lawley, T.D., Burland, V., Taylor, D.E., 2000. Analysis of the Complete Nucleotide Sequence of the Tetracycline-Resistance Transposon Tn10. *Plasmid* 43, 235–239.

- Lee, H.H., Molla, M.N., Cantor, C.R., Collins, J.J., 2010. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature* 467, 82–85.
- Lee, M.D., Sanchez, S., Zimmer, M., Idris, U., Berrang, M.E., McDermott, P.F., 2002. Class 1 Integron-Associated Tobramycin-Gentamicin Resistance in *Campylobacter jejuni* Isolated from the Broiler Chicken House Environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3660–3664.
- Lenski, R.E., 1991. Quantifying fitness and gene stability in microorganisms. *Biotechnol. Read. Mass* 15, 173–192.
- Lenski, R.E., Rose, M.R., Simpson, S.C., Tadler, S.C., 1991. Long-Term Experimental Evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and Divergence During 2,000 Generations. *Am. Nat.* 138, 1315–1341.
- Lenski, R.E., Travisano, M., 1994. Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000-generation experiment with bacterial populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 6808–6814.
- Léon, G., Roy, P.H., 2009. Potential Role of Group IIC-attC Introns in Integron Cassette Formation. *J. Bacteriol.* 191, 6040–6051.
- Leverstein-van Hall, M.A., M. Blok, H.E., T. Donders, A.R., Paauw, A., Fluit, A.C., Verhoef, J., 2003. Multidrug Resistance among *Enterobacteriaceae* Is Strongly Associated with the Presence of Integrons and Is Independent of Species or Isolate Origin. *J. Infect. Dis.* 187, 251–259.
- Leverstein-van Hall, M.A., Paauw, A., Box, A.T.A., Blok, H.E.M., Verhoef, J., Fluit, A.C., 2002. Presence of Integron-Associated Resistance in the Community Is Widespread and Contributes to Multidrug Resistance in the Hospital. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3038–3040.
- Levin, B.R., Perrot, V., Walker, N., 2000. Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics* 154, 985–997.
- Lewin, C.S., Amyes, S.G.B., 1991. The role of the SOS response in bacteria exposed to zidovudine or trimethoprim. *J. Med. Microbiol.* 34, 329–332.
- Li, X., Liu, L., Ji, J., Chen, Q., Hua, X., Jiang, Y., Feng, Y., Yu, Y., 2015. Tigecycline resistance in *Acinetobacter baumannii* mediated by frameshift mutation in *pIsC*, encoding 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 625–631.
- Li, X.Z., Nikaido, H., Poole, K., 1995. Role of *mexA-mexB-oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1948–1953.
- Liang, Z., Zhang, Y., Agrahari, G., Chandahas, V., Ginton, K., Donahue, D.L., Balsara, R.D., Ploplis, V.A., Castellino, F.J., 2013. A Natural Inactivating Mutation in the CovS Component of the CovRS Regulatory Operon in a

- Pattern D *Streptococcal pyogenes* Strain Influences Virulence-associated Genes. *J. Biol. Chem.* 288, 6561–6573.
- Ling, H., Boudsocq, F., Woodgate, R., Yang, W., 2001. Crystal Structure of a Y-Family DNA Polymerase in Action. *Cell* 107, 91–102.
- Lister, P.D., Wolter, D.J., Hanson, N.D., 2009. Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 22, 582–610.
- Liu, M.-C., Wu, C.-M., Liu, Y.-C., Zhao, J.-C., Yang, Y.-L., Shen, J.-Z., 2009. Identification, susceptibility, and detection of integron-gene cassettes of *Arcanobacterium pyogenes* in bovine endometritis. *J. Dairy Sci.* 92, 3659–3666.
- Loot, C., Bikard, D., Rachlin, A., Mazel, D., 2010. Cellular pathways controlling integron cassette site folding. *EMBO J.* 29, 2623–2634.
- Loot, C., Ducos-Galand, M., Escudero, J.A., Bouvier, M., Mazel, D., 2012. Replicative resolution of integron cassette insertion. *Nucleic Acids Res.* 40, 8361–8370.
- Loot, C., Parissi, V., Escudero, J.A., Amarir-Bouhram, J., Bikard, D., Mazel, D., 2014. The Integron Integrase Efficiently Prevents the Melting Effect of *Escherichia coli* Single-Stranded DNA-Binding Protein on Folded *attC* Sites. *J. Bacteriol.* 196, 762–771.
- Luo, Y., Pfuetzner, R.A., Mosimann, S., Paetzel, M., Frey, E.A., Cherney, M., Kim, B., Little, J.W., Strynadka, N.C.J., 2001. Crystal Structure of LexA. *Cell* 106, 585–594.
- Lynch, M., 2010. Evolution of the mutation rate. *Trends Genet.* TIG 26, 345–352.
- MacDonald, D., Demarre, G., Bouvier, M., Mazel, D., Gopaul, D.N., 2006. Structural basis for broad DNA-specificity in integron recombination. *Nature* 440, 1157–1162.
- Machado, E., Cantón, R., Baquero, F., Galán, J.-C., Rollán, A., Peixe, L., Coque, T.M., 2005. Integron Content of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains over 12 Years in a Single Hospital in Madrid, Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1823–1829.
- MacLean, R.C., San Millan, A., 2015. Microbial Evolution: Towards Resolving the Plasmid Paradox. *Curr. Biol.* 25, R764–R767.
- Madigan, M.T., Madigan, M.T., Brock, T.D., 2009. Brock biology of microorganisms. Pearson/Benjamin Cummings, San Francisco, CA.
- Mahillon, J., Chandler, M., 1998. Insertion Sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 725–774.

- Márquez, C., Labbate, M., Ingold, A.J., Roy Chowdhury, P., Ramírez, M.S., Centrón, D., Borthagaray, G., Stokes, H.W., 2008. Recovery of a functional class 2 integron from an *Escherichia coli* strain mediating a urinary tract infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 4153–4154.
- Martin, C., Timm, J., Rauzier, J., Gomez-Lus, R., Davies, J., Gicquel, B., 1990. Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria. *Nature* 345, 739–743.
- Martinez, J.L., 2009. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 276, 2521–2530.
- Martinez-Freijo, P., Fluit, A.C., Schmitz, F.J., Grek, V.S., Verhoef, J., Jones, M.E., 1998. Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J. Antimicrob. Chemother.* 42, 689–696.
- Mazaheri Nezhad Fard, R., Barton, M.D., Heuzenroeder, M.W., 2011. Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci. *Lett. Appl. Microbiol.* 52, 559–564.
- Mazel, D., 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Micro* 4, 608–620.
- Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V.A., Davies, J., 1998. A Distinctive Class of Integron in the *Vibrio cholerae* Genome. *Science* 280, 605–608.
- Melnyk, A.H., Wong, A., Kassen, R., 2015. The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evol. Appl.* 8, 273–283.
- Messier, N., Roy, P.H., 2001. Integron Integrases Possess a Unique Additional Domain Necessary for Activity. *J. Bacteriol.* 183, 6699–6706.
- Miko, A., Pries, K., Schroeter, A., Helmuth, R., 2005. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 1025–1033.
- Miller, A.W., Befort, C., Kerr, E.O., Dunham, M.J., 2013. Design and Use of Multiplexed Chemostat Arrays. *J. Vis. Exp. JoVE* 50262.
- Miller, C., Ingmer, H., Thomsen, L.E., Skarstad, K., Cohen, S.N., 2003. DpiA Binding to the Replication Origin of *Escherichia coli* Plasmids and Chromosomes Destabilizes Plasmid Inheritance and Induces the Bacterial SOS Response. *J. Bacteriol.* 185, 6025–6031.
- Miller, C., Thomsen, L.E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., Cohen, S.N., 2004. SOS Response Induction by β -Lactams and Bacterial Defense Against Antibiotic Lethality. *Science* 305, 1629.

- Modi, R.I., Wilke, C.M., Rosenzweig, R.F., Adams, J., 1991. Plasmid macro-evolution: selection of deletions during adaptation in a nutrient-limited environment. *Genetica* 84, 195–202.
- Mongkolrattanothai, K., Pumfrey, L., Mankin, P., Gray, B.M., 2009. Acquisition of High-Level Mupirocin Resistance and Its Fitness Cost among Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains with Low-Level Mupirocin Resistance. *J. Clin. Microbiol.* 47, 4158–4160.
- Monod, J., 1950. La technique de culture continue, theorie et applications. *Ann. Inst. Pasteur* 79, 390–410.
- Moura, A., Henriques, I., Smalla, K., Correia, A., 2010. Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Res. Microbiol.* 161, 58–66.
- Moura, A., Jové, T., Ploy, M.-C., Henriques, I., Correia, A., 2012. Diversity of Gene Cassette Promoters in Class 1 Integrons from Wastewater Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5413–5416.
- Moura, A., Soares, M., Pereira, C., Leitão, N., Henriques, I., Correia, A., 2009. INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics* 25, 1096–1098.
- Mukherjee, S., Chakraborty, R., 2006. Incidence of class 1 integrons in multiple antibiotic-resistant Gram-negative copiotrophic bacteria from the River Torsa in India. *Res. Microbiol.* 157, 220–226.
- Nanchen, A., Schicker, A., Sauer, U., 2006. Nonlinear Dependency of Intracellular Fluxes on Growth Rate in Miniaturized Continuous Cultures of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1164–1172.
- Nandi, S., Maurer, J.J., Hofacre, C., Summers, A.O., 2004. Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 7118–7122.
- Navia, M., Ruiz, J., Vila, J., 2004. Molecular characterization of the integrons in *Shigella* strains isolated from patients with traveler's diarrhea. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 48, 175–179.
- Nešvera, J., Hochmannová, J., Pátek, M., 1998. An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 169, 391–395.
- Nikaido, H., 1998. Antibiotic Resistance Caused by Gram-Negative Multidrug Efflux Pumps. *Clin. Infect. Dis.* 27, S32–S41.
- Nivina, A., Escudero, J.A., Vit, C., Mazel, D., Loot, C., 2016. Efficiency of integron cassette insertion in correct orientation is ensured by the interplay of the three

- unpaired features of *attC* recombination sites. *Nucleic Acids Res.* 44, 7792–7803.
- Notley-McRobb, L., Seeto, S., Ferenci, T., 2003. The influence of cellular physiology on the initiation of mutational pathways in *Escherichia coli* populations. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 270, 843–848.
- Novick, A., Szilard, L., 1950. Description of the Chemostat. *Science* 112, 715.
- Nunes-Düby, S.E., Kwon, H.J., Tirumalai, R.S., Ellenberger, T., Landy, A., 1998. Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res.* 26, 391–406.
- Ochiai, K., Yamanaka, T., Kimura, K., Sawada, O., 1959. Studies on inheritance of drug resistance between *Shigella* strains and *Escherichia coli* strains. *Nippon Iji Shimpo* 1861, 34–46.
- Ochman, H., Wilson, A.C., 1987. Evolution in bacteria: Evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J. Mol. Evol.* 26, 74–86.
- Ohmori, H., Friedberg, E.C., Fuchs, R.P.P., Goodman, M.F., Hanaoka, F., Hinkle, D., Kunkel, T.A., Lawrence, C.W., Livneh, Z., Nohmi, T., Prakash, L., Prakash, S., Todo, T., Walker, G.C., Wang, Z., Woodgate, R., 2001. The Y-Family of DNA Polymerases. *Mol. Cell* 8, 7–8.
- O'Neill, A.J., Huovinen, T., Fishwick, C.W.G., Chopra, I., 2006. Molecular Genetic and Structural Modeling Studies of *Staphylococcus aureus* RNA Polymerase and the Fitness of Rifampin Resistance Genotypes in Relation to Clinical Prevalence. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 298–309.
- Ozgumus, O.B., Sandalli, C., Sevim, A., Celik-Sevim, E., Sivri, N., 2009. Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey. *J. Microbiol.* 47, 19–27.
- Palmer, A.C., Kishony, R., 2013. Understanding, predicting and manipulating the genotypic evolution of antibiotic resistance. *Nat Rev Genet* 14, 243–248.
- Pan, J.-C., Ye, R., Meng, D.-M., Zhang, W., Wang, H.-Q., Liu, K.-Z., 2006. Molecular characteristics of class 1 and class 2 integrons and their relationships to antibiotic resistance in clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 288–296.
- Papagiannitsis, C.C., Tzouveleakis, L.S., Miriagou, V., 2009. Relative Strengths of the Class 1 Integron Promoter Hybrid 2 and the Combinations of Strong and Hybrid 1 with an Active P2 Promoter. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 277–280.
- Papagrigorakis, M.J., Yapijakis, C., Synodinos, P.N., Baziotopoulou-Valavani, E., 2006. DNA examination of ancient dental pulp incriminates typhoid fever as a probable cause of the Plague of Athens. *Int. J. Infect. Dis.* 10, 206–214.

- Paquin, C., Adams, J., 1983. Frequency of fixation of adaptive mutations is higher in evolving diploid than haploid yeast populations. *Nature* 302, 495–500.
- Partridge, S.R., 2011. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 820–855.
- Partridge, S.R., Hall, R.M., 2005. Evolution of Transposons Containing *bla*(TEM) Genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1267–1268.
- Partridge, S.R., Recchia, G.D., Scaramuzzi, C., Collis, C.M., Stokes, H.W., Hall, R.M., 2000. Definition of the *attI1* site of class 1 integrons. *Microbiology* 146, 2855–2864.
- Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E., Iredell, J.R., 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 757–784.
- Paulander, W., Maisnier-Patin, S., Andersson, D.I., 2007. Multiple mechanisms to ameliorate the fitness burden of mupirocin resistance in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 64, 1038–1048.
- Payie, K.G., Clarke, A.J., 1997. Characterization of gentamicin 2'-N-acetyltransferase from *Providencia stuartii*: its use of peptidoglycan metabolites for acetylation of both aminoglycosides and peptidoglycan. *J. Bacteriol.* 179, 4106–4114.
- Peleg, A.Y., Hooper, D.C., 2010. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *N. Engl. J. Med.* 362, 1804–1813.
- Pérez-Valdespino, A., Lazarini-Martínez, A., Rivera-González, A.X., García-Hernández, N., Curiel-Quesada, E., 2016. Dynamics of a Class 1 Integron Located on Plasmid or Chromosome in Two *Aeromonas spp.* Strains. *Front. Microbiol.* 7, 1556.
- Périchon, B., Courvalin, P., 2009. VanA-Type Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4580–4587.
- Perilli, M., Mezzatesta, M.L., Falcone, M., Pellegrini, C., Amicosante, G., Venditti, M., Stefani, S., 2008. Class I Integron-Borne *bla*VIM-1 Carbapenemase in a Strain of *Enterobacter cloacae* Responsible for a Case of Fatal Pneumonia. *Microb. Drug Resist.* 14, 45–47.
- Petrillo, M., Angers-Loustau, A., Kreysa, J., 2016. Possible genetic events producing colistin resistance gene *mcr-1*. *Lancet Infect. Dis.* 16, 280.
- Petrosino, J., Cantu III, C., Palzkill, T., 1998. β -Lactamases: protein evolution in real time. *Trends Microbiol.* 6, 323–327.

- Pohlhaus, J.R., Kreuzer, K.N., 2005. Norfloxacin-induced DNA gyrase cleavage complexes block *Escherichia coli* replication forks, causing double-stranded breaks in vivo. *Mol. Microbiol.* 56, 1416–1429.
- Poirel, L., Carattoli, A., Bernabeu, S., Bruderer, T., Frei, R., Nordmann, P., 2010. A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1594–1598.
- Poirel, L., Decousser, J.-W., Nordmann, P., 2003. Insertion Sequence ISEcp1B Is Involved in Expression and Mobilization of a bla(CTX-M) β -Lactamase Gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2938–2945.
- Poirel, L., Le Thomas, I., Naas, T., Karim, A., Nordmann, P., 2000. Biochemical Sequence Analyses of GES-1, a Novel Class A Extended-Spectrum β -Lactamase, and the Class 1 Integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 622–632.
- Price, C.T., Lee, I.R., Gustafson, J.E., 2000. The effects of salicylate on bacteria. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 1029–1043.
- Rainey, P.B., Travisano, M., 1998. Adaptive radiation in a heterogeneous environment. *Nature* 394, 69–72.
- Rajpara, N., Patel, A., Tiwari, N., Bahuguna, J., Antony, A., Choudhury, I., Ghosh, A., Jain, R., Ghosh, A., Bhardwaj, A.K., 2009. Mechanism of drug resistance in a clinical isolate of *Vibrio fluvialis*: involvement of multiple plasmids and integrons. *Int. J. Antimicrob. Agents* 34, 220–225.
- Ramírez, M.S., Quiroga, C., Centrón, D., 2005a. Novel rearrangement of a class 2 integron in two non-epidemiologically related isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 5179–5181.
- Ramírez, M.S., Vargas, L.J., Cagnoni, V., Tokumoto, M., Centrón, D., 2005b. Class 2 integron with a novel cassette array in a *Burkholderia cenocepacia* isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4418–4420.
- Randall, L.P., Woodward, M.J., 2002. The multiple antibiotic resistance (*mar*) locus and its significance. *Res. Vet. Sci.* 72, 87–93.
- Rao, A.N., Barlow, M., Clark, L.A., Boring, J.R., Tenover, F.C., McGowan, J.E., 2006. Class 1 Integrons in Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.*, US Hospitals. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1011–1014.
- Recchia, G.D., Hall, R.M., 1997. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol.* 5, 389–394.
- Recchia, G.D., Hall, R.M., 1995. Plasmid evolution by acquisition of mobile gene cassettes: plasmid pIE723 contains the *aadB* gene cassette precisely inserted at a secondary site in the IncQ plasmid RSF1010. *Mol. Microbiol.* 15, 179–187.

- Recchia, G.D., Stokes, H.W., Hall, R.M., 1994. Characterisation of specific and secondary recombination sites recognised by the integron DNA integrase. *Nucleic Acids Res.* 22, 2071–2078.
- Robinson, A., Brzoska, A.J., Turner, K.M., Withers, R., Harry, E.J., Lewis, P.J., Dixon, N.E., 2010. Essential Biological Processes of an Emerging Pathogen: DNA Replication, Transcription, and Cell Division in *Acinetobacter spp.* *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 74, 273–297.
- Rodríguez-Verdugo, A., Gaut, B.S., Tenailon, O., 2013. Evolution of *Escherichia coli* rifampicin resistance in an antibiotic-free environment during thermal stress. *BMC Evol. Biol.* 13, 1–11.
- Rose, M.R., Vu, L.N., Park, S.U., Graves, J.L., 1992. Selection on stress resistance increases longevity in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.* 27, 241–250.
- Rosewarne, C.P., Pettigrove, V., Stokes, H.W., Parsons, Y.M., 2010. Class 1 integrons in benthic bacterial communities: abundance, association with Tn402-like transposition modules and evidence for coselection with heavy-metal resistance. *FEMS Microbiol. Ecol.* 72, 35–46.
- Rosser, S.J., Young, H.-K., 1999. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 44, 11–18.
- Rowe-Magnus, D.A., Guerout, A.-M., Ploncard, P., Dychinco, B., Davies, J., Mazel, D., 2001. The evolutionary history of chromosomal super-integrations provides an ancestry for multiresistant integrons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 652–657.
- Ruiz, J., Navia, M.M., Casals, C., Sierra, J.M., De Anta, M.T.J., Vila, J., 2003. Integron-mediated antibiotic multiresistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Spain. *Clin. Microbiol. Infect.* 9, 907–911.
- Ruiz-Martínez, L., López-Jiménez, L., Fusté, E., Vinuesa, T., Martínez, J.P., Viñas, M., 2011. Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 38, 398–402.
- San Millan, A., Santos-Lopez, A., Ortega-Huedo, R., Bernabe-Balas, C., Kennedy, S.P., Gonzalez-Zorn, B., 2015. Small-Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance Is Enhanced by Increases in Plasmid Copy Number and Bacterial Fitness. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 3335–3341.
- Schmieder, R., Edwards, R., 2011. Insights into antibiotic resistance through metagenomic approaches. *Future Microbiol.* 7, 73–89.
- Schmieger, H., Schicklmaier, P., 1999. Transduction of multiple drug resistance of *Salmonella enterica serovar typhimurium* DT104. *FEMS Microbiol. Lett.* 170, 251–256.

- Schmitz, F.-J., Hafner, D., Geisel, R., Follmann, P., Kirschke, C., Verhoef, J., Köhrer, K., Fluit, A.C., 2001. Increased Prevalence of Class I Integrons in *Escherichia coli*, *Klebsiella* Species, and *Enterobacter* Species Isolates over a 7-Year Period in a German University Hospital. *J. Clin. Microbiol.* 39, 3724–3726.
- Schrag, S.J., Perrot, V., 1996. Reducing antibiotic resistance. *Nature* 381, 120–121.
- Schrag, S.J., Perrot, V., Levin, B.R., 1997. Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 264, 1287–1291.
- Schröder, G., Lanka, E., 2005. The mating pair formation system of conjugative plasmids—A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. *Plasmid* 54, 1–25.
- Sepp, E., Stsepetova, J., Lõivukene, K., Truusalu, K., Kõljalg, S., Naaber, P., Mikelsaar, M., 2009. The occurrence of antimicrobial resistance and class 1 integrons among commensal *Escherichia coli* isolates from infants and elderly persons. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 8, 1–6.
- Shaheen, B.W., Oyarzabal, O.A., Boothe, D.M., 2010. The role of class 1 and 2 integrons in mediating antimicrobial resistance among canine and feline clinical *E. coli* isolates from the US. *Vet. Microbiol.* 144, 363–370.
- Shibata, N., Doi, Y., Yamane, K., Yagi, T., Kurokawa, H., Shibayama, K., Kato, H., Kai, K., Arakawa, Y., 2003. PCR Typing of Genetic Determinants for Metallo- β -Lactamases and Integrases Carried by Gram-Negative Bacteria Isolated in Japan, with Focus on the Class 3 Integron. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5407–5413.
- Silvian, L.F., Toth, E.A., Pham, P., Goodman, M.F., Ellenberger, T., 2001. Crystal structure of a DinB family error-prone DNA polymerase from *Sulfolobus solfataricus*. *Nat Struct Mol Biol* 8, 984–989.
- Simo Tchuinte, P.L., Stalder, T., Venditti, S., Ngandjio, A., Dagot, C., Ploy, M.-C., Barraud, O., 2016. Characterisation of class 3 integrons with oxacillinase gene cassettes in hospital sewage and sludge samples from France and Luxembourg. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48, 431–434.
- Skalet, A.H., Cevallos, V., Ayele, B., Gebre, T., Zhou, Z., Jorgensen, J.H., Zerihun, M., Habte, D., Assefa, Y., Emerson, P.M., Gaynor, B.D., Porco, T.C., Lietman, T.M., Keenan, J.D., 2010. Antibiotic Selection Pressure and Macrolide Resistance in Nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae*: A Cluster-Randomized Clinical Trial. *PLoS Med* 7, e1000377.
- Skaliter, R., Eichenbaum, Z., Shwartz, H., Ascarelli-Goell, R., Livneh, Z., 1992. Spontaneous transposition in the bacteriophage λ *cro* gene residing on a plasmid. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 267, 139–151.
- Skurnik, D., Le Menac'h, A., Zurakowski, D., Mazel, D., Courvalin, P., Denamur, E., Andremont, A., Ruimy, R., 2005. Integron-Associated Antibiotic Resistance

- and Phylogenetic Grouping of *Escherichia coli* Isolates from Healthy Subjects Free of Recent Antibiotic Exposure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3062–3065.
- Skurnik, D., Ruimy, R., Andremont, A., Amorin, C., Rouquet, P., Picard, B., Denamur, E., 2006. Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 1215–1219.
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M.P., Francia, M.V., Rocha, E.P.C., de la Cruz, F., 2010. Mobility of Plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 434–452.
- Smith, M.A., Bidochka, M.J., 1998. Bacterial fitness and plasmid loss: the importance of culture conditions and plasmid size. *Can. J. Microbiol.* 44, 351–355.
- Sniegowski, P.D., Gerrish, P.J., Lenski, R.E., 1997. Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. *Nature* 387, 703–705.
- Somogyi, M., 1952. Estimation of sugars by colorimetric method. *J Biol Chem* 245.
- Søndergaard, A., Lund, M., Nørskov-Lauritsen, N., 2015. TEM-1-encoding small plasmids impose dissimilar fitness costs on *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae*. *Microbiology* 161, 2310–2315.
- Sota, M., Yano, H., M Hughes, J., Daughdrill, G.W., Abdo, Z., Forney, L.J., Top, E.M., 2010. Shifts in the host range of a promiscuous plasmid through parallel evolution of its replication initiation protein. *ISME J* 4, 1568–1580.
- Soto, S.M., Lobato, M.J., Mendoza, M.C., 2003. Class 1 Integron-Borne Gene Cassettes in Multidrug-Resistant *Yersinia enterocolitica* Strains of Different Phenotypic and Genetic Types. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 421–425.
- Soufi, L., Abbassi, M.S., Sáenz, Y., Vinué, L., Somalo, S., Zarazaga, M., Abbas, A., Dbaya, R., Khanfir, L., Ben Hassen, A., Hammami, S., Torres, C., 2009. Prevalence and Diversity of Integrons and Associated Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Poultry Meat in Tunisia. *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 1067–1073.
- Spratt, B.G., 1994. Resistance to antibiotics mediated by target alterations. *Science* 264, 388–393.
- Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., Ploy, M.-C., 2012. Integron Involvement in Environmental Spread of Antibiotic Resistance. *Front. Microbiol.* 3, 119.
- Stalder, T., Barraud, O., Jové, T., Casellas, M., Gaschet, M., Dagot, C., Ploy, M.-C., 2014. Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. *ISME J.* 8, 768–777.
- Starikova, I., Al-Haroni, M., Werner, G., Roberts, A.P., Sørum, V., Nielsen, K.M., Johnsen, P.J., 2013. Fitness costs of various mobile genetic elements in

- Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. J. Antimicrob. Chemother. 68, 2755–2765.
- Starikova, I., Harms, K., Haugen, P., Lunde, T.T.M., Primicerio, R., Samuelsen, Ø., Nielsen, K.M., Johnsen, P.J., 2012. A Trade-off between the Fitness Cost of Functional Integrases and Long-term Stability of Integrons. PLoS Pathog. 8, e1003043.
- Stokes, H.W., Hall, R.M., 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. Mol. Microbiol. 3, 1669–1683.
- Stokes, H.W., Nesbø, C.L., Holley, M., Bahl, M.I., Gillings, M.R., Boucher, Y., 2006. Class 1 Integrons Potentially Predating the Association with Tn402-Like Transposition Genes Are Present in a Sediment Microbial Community. J. Bacteriol. 188, 5722–5730.
- Stokes, H.W., O’Gorman, D.B., Recchia, G.D., Parsekhian, M., Hall, R.M., 1997. Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. Mol. Microbiol. 26, 731–745.
- Storz, G., Hengge, R. (Eds.), 2011. Bacterial Stress Responses, Second Edition. American Society of Microbiology.
- Subbiah, M., Top, E.M., Shah, D.H., Call, D.R., 2011. Selection Pressure Required for Long-Term Persistence of *bla*CMY-2-Positive IncA/C Plasmids. Appl. Environ. Microbiol. 77, 4486–4493.
- Sun, L., Klein, E.Y., Laxminarayan, R., 2012. Seasonality and temporal correlation between community antibiotic use and resistance in the United States. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. 55, 687–694.
- Sunde, M., 2005. Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products of Norwegian origin. J. Antimicrob. Chemother. 56, 1019–1024.
- Sundqvist, M., Geli, P., Andersson, D.I., Sjölund-Karlsson, M., Runeheggen, A., Cars, H., Abelson-Storby, K., Cars, O., Kahlmeter, G., 2010. Little evidence for reversibility of trimethoprim resistance after a drastic reduction in trimethoprim use. J. Antimicrob. Chemother. 65, 350–360.
- Sung, W., Ackerman, M.S., Miller, S.F., Doak, T.G., Lynch, M., 2012. Drift-barrier hypothesis and mutation-rate evolution. Proc. Natl. Acad. Sci. 109, 18488–18492.
- Suzuki, S., Horinouchi, T., Furusawa, C., 2014. Prediction of antibiotic resistance by gene expression profiles. Nat. Commun. 5, 5792.
- Tenaillon, O., Barrick, J.E., Ribeck, N., Deatherage, D.E., Blanchard, J.L., Dasgupta, A., Wu, G.C., Wielgoss, S., Cruveiller, S., Médigue, C., Schneider, D., Lenski,

- R.E., 2016. Tempo and mode of genome evolution in a 50,000-generation experiment. *Nature* 536, 165–170.
- Thomas, C.M., 2014. Plasmid Incompatibility, in: Bell, E. (Ed.), *Molecular Life Sciences: An Encyclopedic Reference*. Springer New York, New York, NY, pp. 1–3.
- Toleman, M.A., Bennett, P.M., Walsh, T.R., 2006. ISCR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of the 21st Century? *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 296–316.
- Toleman, M.A., Walsh, T.R., 2010. ISCR Elements Are Key Players in IncA/C Plasmid Evolution. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 3534–3534.
- Toprak, E., Veres, A., Michel, J.-B., Chait, R., Hartl, D.L., Kishony, R., 2012. Evolutionary paths to antibiotic resistance under dynamically sustained drug selection. *Nat Genet* 44, 101–105.
- Tsakris, A., Ikonomidis, A., Spanakis, N., Poulou, A., Pournaras, S., 2007. Characterization of In3Mor, a new integron carrying VIM-1 metallo- β -lactamase and *sat1* gene, from *Morganella morganii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 739–741.
- Turton, J.F., Kaufmann, M.E., Glover, J., Coelho, J.M., Warner, M., Pike, R., Pitt, T.L., 2005. Detection and Typing of Integrons in Epidemic Strains of *Acinetobacter baumannii* Found in the United Kingdom. *J. Clin. Microbiol.* 43, 3074–3082.
- van Boven, M., Veldman, K.T., de Jong, M.C.M., Mevius, D.J., 2003. Rapid selection of quinolone resistance in *Campylobacter jejuni* but not in *Escherichia coli* in individually housed broilers. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 719–723.
- van Hoek, A.H.A.M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., Aarts, H.J.M., 2011. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front. Microbiol.* 2.
- Varga, M., Kuntová, L., Pantůček, R., Mašlaňová, I., Růžicková, V., Doškař, J., 2012. Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. *FEMS Microbiol. Lett.* 332, 146–152.
- Vasilakopoulou, A., Psychogiou, M., Tzouvelekis, L., Tassios, P.T., Kosmidis, C., Petrikos, G., Roma, E.S., Charvalos, E., Passiotou, M., Avlami, A., Daikos, G.L., 2009. Prevalence and Characterization of Class 1 Integrons in *Escherichia coli* of Poultry and Human Origin. *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 1211–1218.
- Ventola, C.L., 2015. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharm. Ther.* 40, 277–283.

- Vien, L.T.M., Minh, N.N.Q., Thuong, T.C., Khuong, H.D., Nga, T.V.T., Thompson, C., Campbell, J.I., de Jong, M., Farrar, J.J., Schultsz, C., van Doorn, H.R., Baker, S., 2012. The Co-Selection of Fluoroquinolone Resistance Genes in the Gut Flora of Vietnamese Children. *PLoS ONE* 7, e42919.
- Vinué, L., Jové, T., Torres, C., Ploy, M.-C., 2011. Diversity of class 1 integron gene cassette Pc promoter variants in clinical *Escherichia coli* strains and description of a new P2 promoter variant. *Int. J. Antimicrob. Agents* 38, 526–529.
- Vinué, L., Sáenz, Y., Rojo-Bezares, B., Olarte, I., Undabeitia, E., Somalo, S., Zarazaga, M., Torres, C., 2010. Genetic environment of *sul* genes and characterisation of integrons in *Escherichia coli* isolates of blood origin in a Spanish hospital. *Int. J. Antimicrob. Agents* 35, 492–496.
- Vinué, L., Sáenz, Y., Somalo, S., Escudero, E., Moreno, M.Á., Ruiz-Larrea, F., Torres, C., 2008. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates of healthy humans in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 934–937.
- Vo, A.T.T., van Duijkeren, E., Fluit, A.C., Gaastra, W., 2007. Characteristics of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from horses. *Vet. Microbiol.* 124, 248–255.
- Vogwill, T., MacLean, R.C., 2015. The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: a meta-analysis approach. *Evol. Appl.* 8, 284–295.
- von Wintersdorff, C.J.H., Penders, J., van Niekerk, J.M., Mills, N.D., Majumder, S., van Alphen, L.B., Savelkoul, P.H.M., Wolffs, P.F.G., 2016. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front. Microbiol.* 7, 173.
- Waksman, S.A., 1947. What Is an Antibiotic or an Antibiotic Substance? *Mycologia* 39, 565–569.
- Wei, Q., Hu, Q., Li, S., Lu, H., Chen, G., Shen, B., Zhang, P., Zhou, Y., 2014. A novel functional class 2 integron in clinical *Proteus mirabilis* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 973–976.
- Wei, Q., Jiang, X., Li, M., Li, G., Hu, Q., Lu, H., Chen, G., Zhou, Y., Lu, Y., 2013a. Diversity of Gene Cassette Promoter Variants of Class 1 Integrons in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 67, 543–549.
- Wei, Q., Jiang, X., Li, M., Li, G., Hu, Q., Lu, H., Chen, G., Zhou, Y., Lu, Y., 2013b. Diversity of Gene Cassette Promoter Variants of Class 1 Integrons in Uropathogenic *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 67, 543–549.
- White, D.G., Zhao, S., Sudler, R., Ayers, S., Friedman, S., Chen, S., McDermott, P.F., McDermott, S., Wagner, D.D., Meng, J., 2001. The Isolation of Antibiotic-

- Resistant *Salmonella* from Retail Ground Meats. N. Engl. J. Med. 345, 1147–1154.
- White, P.A., Mclver, C.J., Rawlinson, W.D., 2001. Integrons and Gene Cassettes in the *Enterobacteriaceae*. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 2658–2661.
- Whittle, G., Shoemaker, B.N., Salyers, A.A., 2002. The role of Bacteroides conjugative transposons in the dissemination of antibiotic resistance genes. Cell. Mol. Life Sci. CMLS 59, 2044–2054.
- Willmann, M., El-Hadidi, M., Huson, D.H., Schütz, M., Weidenmaier, C., Autenrieth, I.B., Peter, S., 2015. Antibiotic Selection Pressure Determination through Sequence-Based Metagenomics. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 7335–7345.
- Wiser, M.J., Ribbeck, N., Lenski, R.E., 2013. Long-Term Dynamics of Adaptation in Asexual Populations. Science 342, 1364.
- Wolkow, C.A., DeBoy, R.T., Craig, N.L., 1996. Conjugating plasmids are preferred targets for Tn7. Genes Dev. 10, 2145–2157.
- Woodford, N., Ellington, M.J., 2007. The emergence of antibiotic resistance by mutation. Clin. Microbiol. Infect. 13, 5–18.
- Wozniak, R.A.F., Waldor, M.K., 2010. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. Nat Rev Micro 8, 552–563.
- Wright, M.S., Baker-Austin, C., Lindell, A.H., Stepanauskas, R., Stokes, H.W., McArthur, J.V., 2008. Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. ISME J 2, 417–428.
- Xiong, W., Sun, Y., Ding, X., Wang, M., Zeng, Z., 2015. Selective pressure of antibiotics on ARGs and bacterial communities in manure-polluted freshwater-sediment microcosms. Front. Microbiol. 6, 194.
- Xu, H., Davies, J., Miao, V., 2007. Molecular Characterization of Class 3 Integrons from *Delftia* spp. J. Bacteriol. 189, 6276–6283.
- Yan, J.-J., Hsueh, P.-R., Lu, J.-J., Chang, F.-Y., Ko, W.-C., Wu, J.-J., 2006. Characterization of acquired β -lactamases and their genetic support in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan: the prevalence of unusual integrons. J. Antimicrob. Chemother. 58, 530–536.
- Yassine, H., Bientz, L., Cros, J., Goret, J., Bébéar, C., Quentin, C., Arpin, C., 2015. Experimental evidence for IS1294b-mediated transposition of the blaCMY-2 cephalosporinase gene in *Enterobacteriaceae*. J. Antimicrob. Chemother. 70, 697–700.

- Yu, H.S., Lee, J.C., Kang, H.Y., Ro, D.W., Chung, J.Y., Jeong, Y.S., Tae, S.H., Choi, C.H., Lee, E.Y., Seol, S.Y., Lee, Y.C., Cho, D.T., 2003. Changes in Gene Cassettes of Class 1 Integrons among *Escherichia coli* Isolates from Urine Specimens Collected in Korea during the Last Two Decades. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5429–5433.
- Yum, J.H., Yong, D., Lee, K., Kim, H.-S., Chong, Y., 2002. A new integron carrying VIM-2 metallo- β -lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 42, 217–219.
- Zhong, C., Peng, D., Ye, W., Chai, L., Qi, J., Yu, Z., Ruan, L., Sun, M., 2011. Determination of Plasmid Copy Number Reveals the Total Plasmid DNA Amount Is Greater than the Chromosomal DNA Amount in *Bacillus thuringiensis* YBT-1520. *PLoS ONE* 6, e16025.

Liens internet :

<http://integrall.bio.ua.pt/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21760>

Annexes

Table 1S : Amorces utilisées pour préparer les bibliothèques d'échantillons pour le séquençage Ion Torrent™.

Nom de l'amorce	Séquence 5'-3'
BC1_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCT AAGGTAAC CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC2_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTA AAGGAGAAC CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC3_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG AAGAGGATT CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC4_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT ACCAAGAT CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC5_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG CAGAAGGAAC CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC6_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG CTGCAAGTT CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC7_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG TTCGTGATT CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC8_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG TTCCGATAAC CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC9_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG TGAGCGGAAC CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC10_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG CTGACCGAAC CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC11_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG TCCTCGAAT CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC12_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG TAGGTGGTT CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC13_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG TCTAACGGAC CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC14_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG TTGGAGTGT CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC15_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG TCTAGAGGT CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC16_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG TCTGGATGAC CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC17_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG TCTATTCGT CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC18_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG AGGCAATTG CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC19_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG TTAGTCGGAC CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC20_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG CAGATCCAT CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC21_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG TCGCAATTA CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC22_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG TTCGAGACG CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC23_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG TGCCACGAAC CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC24_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG AACCTCATT CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC25_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG CCTGAGATA CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC26_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG TTACAACCT CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC27_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG AACCATCCG CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC28_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG ATCCGGAAT CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC29_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG TCGACCACT CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA
BC30_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG CGAGGTTAT CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA

BC31_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT CCAAGCTG <u>CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA</u>
BC32_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT TTACACAC <u>CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA</u>
BC33_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT TCTCATTGAA <u>CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA</u>
BC34_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT CGCATCGTT <u>CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA</u>
BC35_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT AAGCCATTGT <u>CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA</u>
BC36_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG AAGGAATCGT <u>CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA</u>
BC37_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG TTGAGAATGT <u>CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA</u>
BC38_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT GGAGGACGGA <u>CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA</u>
BC39_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT AACAATCGG <u>CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA</u>
BC40_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG CTGACATAAT <u>CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA</u>
BC41_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT TCCACTTCG <u>CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA</u>
BC42_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG AGCACGAAT <u>CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA</u>
BC43_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG TTGACACCG <u>CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA</u>
BC44_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT TGGAGGCCAG <u>CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA</u>
BC45_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT GGAGCTTCCT <u>CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA</u>
BC46_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT CAGTCCGAAC <u>CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA</u>
BC47_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT AAGGCAACCAC <u>CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA</u>
BC48_A_Pc_F	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGT TCTAAGAGAC <u>CGATGGAAACGGATGAAGGCACGA</u>
P1_Pc_R	<i>CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATAACGCGCTTGCTGCTTGGAT</i>

Les amorces BCX_A_Pc_F sont les amorces sens portant le code barre permettant d'identifier les échantillons à l'issue du séquençage. Le numéro du code barre est indiqué dans le nom de l'amorce après le BC. Chaque code barre est également représenté en gras. Ces amorces sens s'hybrident sur la région promotrice au moyen d'une zone d'homologie en 3' de l'amorce (nucléotides soulignés). L'amorce anti-sens (P1_Pc_R) contient l'adaptateur P1 dans sa séquence indispensable lors de la PCR émulsion. La séquence de cet adaptateur est représentée en italique tandis que la séquence permettant l'hybridation à la région promotrice est soulignée.

Communications scientifiques

Article scientifique de rang A :

Lacotte Y., Ploy M.C., Raherison S., Class 1 integrons are low cost structures in *Escherichia coli*, ISME J (accepté sous réserve de modifications mineures)

Communications orales :

Internationale :

LACOTTE Y. Assessing the fitness cost of class 1 integrons in *E. coli*. International Society of Plasmid Biology Scientific Meeting (ISPB), Cambridge, United Kingdom, 18 to 23 September 2016.

Nationale :

LACOTTE Y. Etude du coût biologique associé aux intégrons de classe 1. Journée d'animation scientifique de la fédération de recherche en infectiologie (FÉRI), Orléans, France, 1er et 2 octobre 2015.

Posters :

LACOTTE Y., PLOY MC., RAHERISON S. Mise au point d'un système de chemostat pour l'étude de la dynamique d'évolution du promoteur Pc des intégrons de multirésistance. Journée de l'institut GEIST (Génomique, Environnement, Immunité, Santé et Thérapeutiques) 2014 (Limoges, France). Poster n°14.

LACOTTE Y., PLOY MC., RAHERISON S., Etude du coût biologique associé aux intégrons de classe 1. Journée de l'institut GEIST (Génomique, Environnement, Immunité, Santé et Thérapeutiques) 2015 (Limoges, France). Poster n°19 (Prix du meilleur poster).

