



HAL
open science

Francisella et antibio-resistance : aspects génétiques, phénotypiques et cliniques

Vivien Sutera

► **To cite this version:**

Vivien Sutera. Francisella et antibio-resistance : aspects génétiques, phénotypiques et cliniques. Vi-
rologie. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAV064 . tel-01686381

HAL Id: tel-01686381

<https://theses.hal.science/tel-01686381>

Submitted on 17 Jan 2018

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de :

**DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE
GRENOBLE ALPES**

Spécialité : **Virologie, Microbiologie, Immunologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Vivien SUTERA

Thèse dirigée par **Max MAURIN**

préparée au sein du **Laboratoire Adaptation et Pathogénie des
Microorganismes**
dans l'**École Doctorale Chimie et Science du Vivant**

***Francisella* et antibio- résistance : Aspects génétiques, phénotypiques et cliniques**

Thèse soutenue publiquement le **23 juin 2016**
devant le jury composé de :

Pr Max MAURIN

PU-PH Université Grenoble-Alpes, Directeur de thèse

Mme Patricia RENESTO

DR2 TIMC-IMAG, Examinateur

Pr Bernard LA SCOLA

PU-PH Université Aix-Marseille II, Rapporteur

Pr Gérard LINA

PU-PH Université Lyon 1, Rapporteur

M Thomas HENRY

DR2 INSERM U1111, Président du jury



RÉSUMÉ FRANÇAIS

Francisella tularensis est une bactérie à Gram négatif intracellulaire facultative, agent causal de la tularémie. Cette zoonose est induite principalement par deux sous espèces : *F. tularensis* subsp. *tularensis* (type A) et *F. tularensis* subsp. *holarctica* (type B) retrouvées respectivement en Amérique du Nord et dans tout l'hémisphère Nord. Cette seconde sous espèce, moins virulente que la première induit majoritairement des formes cliniques de sévérité moyenne à modérée dites ganglionnaires. Leur traitement est basé sur l'utilisation des antibiotiques de la classe des fluoroquinolones ou des tétracyclines, l'utilisation des aminosides étant réservée aux formes graves. Les adénopathies évoluent cependant souvent vers la suppuration et la chronicité (20 à 40% des cas), malgré l'administration d'un traitement antibiotique adapté. Les travaux réalisés visent à étudier l'hypothèse de l'émergence de la résistance bactérienne chez *Francisella*, expliquant ces échecs thérapeutiques. Ils sont basés sur le développement et l'étude d'un modèle d'évolution *in vitro* de la bactérie en présence de ciprofloxacine, une fluoroquinolone. Nos travaux ont confirmé la capacité de la bactérie à évoluer vers un haut niveau de résistance à ces antibiotiques, corrélée à l'accumulation de mutations dans les gènes codant pour les topoisomérases de type II. De plus, nous avons observé la présence sur l'ensemble des souches de *F. tularensis* subsp. *holarctica* d'un niveau de résistance cliniquement significatif induit par des mutations modifiant la sous-unité GyrA de l'ADN gyrase sur les acides aminés en position 83 et 87. La recherche de ce marqueur dans des prélèvements de patients en échec thérapeutique suite à divers traitements antibiotiques s'est avérée infructueuse. Après avoir vérifié l'action de l'antibiotique sur les bactéries dans le compartiment intracellulaire (fibroblastes), nous avons recherché les autres mutations induites lors de l'évolution de *Francisella* en présence de fluoroquinolones. Cette étude a permis l'implication de plusieurs systèmes de transports transmembranaires dans la résistance antibiotique. Nous avons également révélé l'existence d'une seconde cible majeure impliquée dans le métabolisme du fer de la bactérie. L'altération de cette cible (FupA/B) en plus d'être associée à une augmentation de la résistance aux fluoroquinolones est corrélée à une forte diminution de la capacité de la bactérie à se multiplier dans les cellules phagocytaires.

Mots clés : *Francisella*, tularémie, fluoroquinolones, mécanismes de résistance, traitement, détection des résistances

RÉSUMÉ ANGLAIS

Francisella tularensis is a Gram-negative facultative intracellular bacterium, causing tularemia. This zoonosis is mainly related to two subspecies: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (type A) and *F. tularensis* subsp. *holarctica* (type B) in North America and throughout the Northern Hemisphere, respectively. Infections with this second subspecies, less virulent than the first one, predominantly induce glandular clinical forms of mild to moderate severity. Their treatment is based on antibiotherapy using a fluoroquinolone or a tetracycline. The use of aminoglycosides is reserved for severe clinical forms. The lymph nodes infection, however, often become chronic (20 to 40% of cases), despite administration of an appropriate antibiotic treatment.

The aim of this study was to verify the hypothesis of the emergence of bacterial resistance in *Francisella*, which could explain treatment failures. It is based on the development and study of an *in vitro* evolutionary experiment of the bacterium in the presence of ciprofloxacin, a fluoroquinolone. Our work confirmed the bacterium's ability to evolve towards a high-level of resistance to fluoroquinolones, this evolution being correlated with the accumulation of mutations in the genes encoding for type II topoisomerases. In addition, we observed in all strains of *F. tularensis* subsp. *holarctica* resistant to fluoroquinolones at a clinically significant level, the presence of mutations altering the GyrA subunit of DNA gyrase at amino acids positions 83 and 87. The research of this marker in clinical samples from patients with treatment failure following appropriate antibiotic treatment was however unsuccessful.

After checking the action of antibiotics on bacteria internalized in the intracellular compartment in fibroblast cells, we looked for other mutations induced during the evolution of *Francisella* to resistance to fluoroquinolones. This study unveiled the involvement of several transmembrane transport systems in antibiotic resistance. We also revealed the existence of a second major target involved in *Francisella* iron metabolism. The alteration of this target (FupA/B), in addition to being associated with an increase in fluoroquinolone resistance, is correlated with a sharp decrease in the ability of the bacteria to multiply in phagocytic cells.

Key words: *Francisella*, tularaemia, fluoroquinolones, antibiotic resistance mechanisms, treatment, antibiotic resistance detection.

*“ When I heard the learn’d astronomer;
When the proofs, the figures, were ranged in columns before me;
When I was shown the charts and the diagrams, to add,
 [divide and measure them;
When I, sitting, heard the astronomer, where he lectured
 [with much applause in the lecture-room
How soon, unaccountable, I became tired and sick;
Till rising and gliding out, I wander’d off by myself,
In the mystical moist night-air, and from time to time,
Look’d up in perfect silence at the stars.”*

Leaves of Grass, Walt Whitman

REMERCIEMENTS

L'engagement dans la préparation d'une thèse (comme pour d'autres projets de vie) est conditionné par l'ignorance naïve devant l'ampleur de la tâche à accomplir. Bref, si nous savions à quoi nous attendre, nous passerions notre chemin, esquissant un sourire poli et murmurant un « non merci. » d'ordinaire réservé à l'animateur du rayon fromage du supermarché. Mais notre nature aventureuse nous pousse toujours vers l'inconnu. Nous nous engageons alors avec zèle et bonne humeur sur ce chemin tel un pèlerin ayant devant lui la route le menant à l'objet de sa dévotion. Quand vient le temps des ampoules et des tendinites, nous ne saurions poursuivre cette voie sans le soutien de notre entourage professionnel et personnel.

Tout d'abord, je souhaite remercier le Pr Max MAURIN qui a cru en ce projet. Notre collaboration, débutée il y a 8 ans alors que j'étais technicien de laboratoire a je pense été mutuellement fructueuse tant sur le plan hospitalier que sur le plan de la recherche académique. Je remercie également le personnel médical du laboratoire de Bactériologie du CHU de Grenoble. Les Dr Jacques CROIZE, Isabelle PELLOUX, Christine RECULE, et tout particulièrement les Dr Sandrine BOISSET et Yvan CASPAR pour nos collaborations sur la thématique des *Francisella*.

Je veux également dire un grand merci aux personnels encadrants du laboratoire, Laurence PERRIN et Sophie DUBOUCH pour leur accompagnement et leur soutien dans les démarches administratives complexes (et souvent houleuses), et Marie-Claude AGERON et Sandrine NICOD pour le soutien logistique apporté à ce projet. Je remercie aussi Mme Jeanne Noëlle (aka Jany) DEL BAÑO et le Dr Briec GESTIN pour leur aide et formation sur les techniques et outils particuliers utilisés pour ce projet.

Mes pensées vont surtout à l'ensemble du personnel technique du laboratoire de Bactériologie et plus largement du Département des Agents Infectieux. Mes collègues et amis (Greg, Virg, Mamath, Isa, Fufu, Pich, Domi, Jéjé, Marco, Jef et les autres) qui m'ont accompagné tout au long de cette aventure. Vous me manquez dans ma nouvelle vie professionnelle.

Je remercie la société Cepheid pour m'avoir récemment accueilli. Merci à Jane AMOUYALE, Ricardo GONZALEZ, Johanna TACOU, Cécile CASADO, Jeanne PREVOT et François BAILLET pour nos collaborations passées, présentes et

futures.

Même si beaucoup de manipulations ont été réalisées au CHU, c'est le Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes (LAPM) qui m'a accueilli pour la réalisation de cette thèse. Je remercie pour cela le Pr Dominique SCHNEIDER pour avoir accepté et accompagné ce travail. Les échanges que nous avons pu avoir notamment sur les aspects d'évolution bactérienne ont été productifs et stimulants. Je pense également à l'ensemble des personnels et étudiants rencontrés dans ce laboratoire, qui m'ont apporté leur vision et leur bonne humeur. Je pense particulièrement à Pierre CAVAILLES et Bastien TOUQUET pour nos collaborations sur les lignées cellulaires de rats sur la plateforme de microscopie.

Je souhaite également remercier Jean BRETON pour la confiance qu'il m'a accordé tout d'abord en m'acceptant dans le Master IDIV, puis en me confiant certaines missions d'enseignement en Licence et Master.

Je remercie le Dr Olivier EPAULARD ainsi que Thomas HENRY et Patricia RENESTO pour leur participation aux comités de suivi de thèse et à la soutenance, et aux Pr Bernard LA SCOLA et Gérard LINA pour avoir accepté le rôle de rapporteur pour l'évaluation du travail de thèse et du manuscrit.

Je remercie également les enseignants et l'ensemble des membres des clubs d'Aïkido Sumikiri de St Vincent de Mercuze, Meylan et Vaulnaveys. Les séances d'entraînement et les stages ont été de vraies bouffées d'oxygène pendant cette période.

Pour finir, je remercie ma famille. Tout d'abord, mes parents, qui m'ont accompagné et soutenu dans mon projet d'études supérieures et de manière plus générale dans l'ensemble de mes (trop nombreux) projets de vie, même s'ils étaient loin d'être pour la plupart « des plans qui se déroulent sans accroc ».

A mes grands-parents, pour leur expérience et leur affection.

Merci à mes beaux-parents, pour leur soutien et accueil tout au long de ces années.

A ma sœur, mon frère, mes beaux-frères et belle-sœur, et à mes (nombreux) neveux et nièces ; Merci pour ces moments de partage et pour votre soutien.

A mes amis, Yves et Nadège pour ces moments de détente. Et bien évidemment, une pensée toute particulière à ceux qui, depuis l'école de labo, forment un groupe

soudé et joyeux. Merci à vous, Yannou, Steph', Galou (aka Jean), Oliv', Gaëlle, Elise, Aline et leurs enfants (tout particulièrement Manounette, ma filleule) pour votre soutien et ces apéros, malgré la distance.

Je remercie du fond du cœur mon épouse, Karine pour avoir supportée toutes ces années mes projets, et pour m'avoir soutenu dans les (très nombreux) moments de doutes. Merci pour ces 15 années de bonheur. Promis, demain j'arrête !!! Enfin, pour le moment...

SOMMAIRE

RÉSUMÉ FRANÇAIS	3
RÉSUMÉ ANGLAIS	4
REMERCIEMENTS	6
SOMMAIRE	9
TABLE DES FIGURES	11
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	12
1 <i>Francisella</i> , agent causal de la tularémie	12
1.1 Les bactéries du genre <i>Francisella</i> : rapide aperçu	12
1.2 <i>Francisella tularensis</i>	13
1.2.1 Caractéristiques génomiques et phylogéographie	14
1.2.2 Ecologie et réservoir	16
1.2.3 Pouvoir pathogène et facteurs de virulence	19
2 La tularémie chez l'homme	25
2.1 Les formes cliniques de tularémie	25
2.2 Epidémiologie	27
2.3 Diagnostic Biologique	28
2.4 Prophylaxies et Traitements	31
3 Les Fluoroquinolones	33
3.1 Mécanisme d'action	35
3.2 Mécanismes de résistance	36
3.2.1 Modification des cibles	37
3.2.2 Diminution intra-cytoplasmique de la concentration	38
3.2.3 Mécanismes de résistance plasmidiques	40
4 <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> et antibiothérapie	41
4.1 Détermination de la sensibilité aux antibiotiques	41
4.1.1 Remarques préliminaires sur la méthodologie	41
4.1.2 Sensibilités antibiotiques chez <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>	42
4.2 Mécanismes de résistance identifiés chez <i>F. tularensis</i>	44
5 Tularémie et traitement antibiotique	46
5.1 Evaluation in cellulo et in vivo de l'antibiothérapie	46
5.2 Tularémie et échecs thérapeutiques	47
TRAVAUX SCIENTIFIQUES	49
1 Introduction	49
2 Evolution vers un haut niveau de résistance aux fluoroquinolones chez les bactéries du genre <i>Francisella</i>	51
2.1 Résumé	51
2.1.1 Objectifs	51
2.1.2 Matériels et méthodes	52
2.1.3 Résultats	53
2.1.4 Conclusion	56
2.2 Article	57
2.3 Données complémentaires	66
3 Recherche de <i>F. tularensis</i> résistantes aux fluoroquinolones chez des patients atteints de tularémie en échec thérapeutique	67
3.1 Résumé	67
3.1.1 Objectifs	67
3.1.2 Méthode	68
3.1.3 Résultats	69

3.1.4	Conclusion	71
3.2	Manuscrit soumis.....	72
4	Recherche et évaluation des impacts phénotypiques des cibles génétiques secondaires dans l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones chez <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>	97
4.1	Résumé	97
4.1.1	Objectifs	97
4.1.2	Méthode	98
4.1.3	Résultats	99
4.1.4	Conclusion	101
4.2	Manuscrit en cours de finalisation, format JAC	102
5	Développement d'un test pour l'évaluation de l'activité des antibiotiques contre <i>F. tularensis</i> intracellulaire	133
5.1	Résumé	133
5.1.1	Objectifs	133
5.1.2	Méthode	134
5.1.3	Résultats	135
5.1.4	Conclusion	136
5.2	Article	137
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	144
1	Émergence de la résistance aux fluoroquinolones et modifications des topoïsomérasés de type II	144
2	Émergence de la résistance aux fluoroquinolones, échecs thérapeutiques et rechutes.....	146
3	Émergence de la résistance aux fluoroquinolones et mutations hors topoïsomérasés de Type II	147
4	Évaluation de l'activité des antibiotiques contre <i>F. tularensis</i> intracellulaire	149
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	150

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Arbre phylogénique de <i>F. tularensis</i> d'après une analyse combinée des SNP (dans Vogler et al. Journal of microbiology, 2009).....	15
Figure 2 : Hôtes et vecteurs de <i>F. tularensis</i> subsp. <i>tularensis</i> et subsp. <i>holarctica</i> (dans Keim et al. Annal of New York academy of science, 2007)	17
Figure 3 : Multiplication d'un clone fluorescent de <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> LVS dans les macrophages murins J774-A1 (Collaboration CNR Francisella/SCIMI – Chu de Grenoble/LAPM)	21
Figure 4 : Cycle intracellulaire de Francisella dans les macrophages (dans Chong and Celli, Frontiers in microbiology, 2010)	23
Figure 5 : Enveloppe de Francisella et virulence (dans Rowe and Huntley, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2015)	24
Figure 6 : Adénopathie cervicale chez un patient atteint de tularémie (dans Ellis et al., Clinical microbiology reviews, 2002).....	26
Figure 7 : Frottis de <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> coloré par la méthode de Gram (CNR Francisella – CHU de Grenoble).....	29
Figure 8 : Culture de <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> sur milieu chocolat PolyViteX (bioMérieux®) après 48 heures d'incubation à 37°C en atmosphère aérobie enrichie avec 5% de CO ₂ (CNR Francisella – CHU de Grenoble)	30
Figure 9 : Structure des quinolones et fluoroquinolones (dans Drlica et Zhao, Microbiology and molecular biology, 1997).....	34
Figure 10 : Cycle de l'activité de super-enroulement de l'ADN par l'ADN gyrase et action des quinolones (dans Hawkey, Journal of antimicrobial chemotherapy, 2003)	35
Figure 11 : Représentation schématique des cinq familles de pompes d'efflux (dans Cattoir, Pathologie Biologie, 2004)	40
Tableau 1 : Revue des résistances aux antibiotiques chez <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> dans la littérature.....	45

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1 *Francisella*, agent causal de la tularémie

Ce sont McCoy et Chapin qui ont pour la première fois décrit la tularémie en 1911. Ils ont un an plus tard isolé l'agent causal de cette maladie décrite comme une « simili peste des rongeurs », qu'ils nomment *Bacterium tulareense*¹ d'après le nom du comté californien de Tulare où la maladie a été observée pour la première fois. Cette bactérie sera par la suite classée dans les genres *Brucella* et *Pasteurella* avant d'être définitivement attribuée au nouveau genre *Francisella* en 1947², créé en l'honneur d'Edward Francis qui approfondit par ces nombreuses recherches les connaissances disponibles sur cette maladie³.

1.1 Les bactéries du genre *Francisella* : rapide aperçu

Les bactéries du genre *Francisella* sont les principales représentantes de la famille des *Francisellaceae*, appartenant à la sous-classe des gamma-proteobactéries⁴. De récentes analyses réalisées par séquençage de nouvelle génération (NGS) ont permis l'ajout à cette famille de *Wolbachia persica*^{5,6} ainsi que d'autres endosymbiotes des tiques *Ornithodoros moubata*⁶ et *Dermacentor sp.* baptisés *Francisella-like* endosymbiotes⁷.

Les bactéries du genre *Francisella* sont de petits bacilles à Gram négatif aérobies stricts, non mobiles, fermentant un nombre limité de carbohydrates sans production de gaz⁸. Ce sont des microorganismes intracellulaires facultatifs⁹. Leur classification est complexe et en constante évolution. A ce jour, sept espèces de *Francisella* sont officiellement validées : *Francisella tularensis*, *Francisella novicida*, *Francisella hispaniensis*, *Francisella philomiragia*, *Francisella noatunensis*, *Francisella haliotida* et *Francisella guangzhouensis*³.

- *F. guangzhouensis* a été isolée pour la première fois en Chine dans un système d'air conditionné¹⁰. A ce jour, cette espèce isolée dans divers systèmes d'air conditionné en Chine¹¹ et en Allemagne¹² n'a jamais été impliquée en pathologie humaine.
- *F. haliotida* a été isolée pour la première fois au Japon¹³. C'est une bactérie pathogène des haliotis (mollusques marins).
- *F. philomiragia* et *F. noatunensis* sont deux espèces très proches d'un point de vue phylogénétique¹⁴. Ce sont des pathogènes des poissons, causant chez

ces derniers des granulomes cutanés et multi-viscéraux⁴. *F. philomiragia* a été en de rares occasions incriminée en pathologie humaine, le plus souvent chez des patients présentant une inflammation granulomateuse chronique et/ou ayant eu un contact étroit et prolongé avec l'eau (épisode de noyade)^{15,16}.

- *F. novicida* a été isolée pour la première fois en 1950, dans un échantillon d'eau turbide prélevé à proximité de cadavres de rats musqués, dans l'Utah¹⁷. La niche écologique de cette bactérie semble être étroitement liée au compartiment hydrique¹⁸. Comme pour *F. philomiragia* les cas d'infections humaines sont rares et souvent associés à un tableau d'immunodépression ou à une noyade¹⁹⁻²³. La classification de cette espèce dans la nomenclature est incertaine, certains considérant cette bactérie comme une sous espèce de *F. tularensis*^{24,25} et d'autres comme une espèce à part entière du genre *Francisella*²⁶. La proximité génétique de *F. novicida* avec *F. tularensis*, sa virulence en modèles cellulaires et animaux, et la grande facilité de manipulation génétique et culturale ont fait de cette espèce un modèle d'étude très utilisé¹⁸.
- *F. hispaniensis* est une espèce génétiquement proche de *F. novicida*²⁴. Cette espèce n'a, à ce jour, été décrite que dans deux cas d'infections humaines^{14,24,27}.
- *F. tularensis* est l'agent causal majeur de la tularémie humaine. De récentes analyses phylogéniques ont montré que cette espèce aurait évolué à partir d'un ancêtre aquatique en s'adaptant à une niche « terrestre »¹⁴. Etant l'objet de la présente étude, la description détaillée de cette espèce fait l'objet de la prochaine section.

1.2 *Francisella tularensis*

Plusieurs sous espèces ont été décrites au cours du temps. La taxonomie actuellement admise est proposée par Olsufjev et Meshcheryakova en 1983²⁸. Ces auteurs décrivent trois sous-espèces pour *F. tularensis*; différant par leurs répartitions géographiques, leurs pathogénicités, leurs écologies et leurs caractéristiques biochimiques : *F. tularensis* subsp. *tularensis*, *F. tularensis* subsp. *holarctica* et *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*.

1.2.1 Caractéristiques génomiques et phylogéographie

C'est l'espèce *F. tularensis* qui est majoritairement impliquée en pathologie humaine. Sa répartition géographique se limite à l'hémisphère nord, principalement sur les continents Nord-Américain et Eurasien^{4,29}, même si un cas a récemment été rapporté en Afrique (Soudan)³⁰.

Le génome de *F. tularensis* est constitué d'un unique chromosome circulaire. De petite taille (environ 1,9Mb), il présente une proportion de G+C inhabituellement faible (environ 32%). Le nombre moyen de cadres de lecture ouverts (open reading frames ou ORF) est de 1730, dont environ 85% codent pour de protéines, 1/3 d'entre elles n'ayant pas de fonction connue. Six différentes sortes de séquences d'insertion (ISFtu1 à 6) ont été identifiées chez *Francisella*. Les ISFtu1 sont les plus représentées (53 à 66). Le principal élément discriminant entre les génomes des sous-espèces *tularensis* et *holarctica* est le nombre d'ISFtu2 en moyenne 17 et 45, respectivement³¹.

F. tularensis subsp. *tularensis*, aussi désignée comme la sous espèce *nearctica* ou *F. tularensis* Type A correspond à la souche originellement isolée par McCoy et Chapin en 1912. Cette souche (B-38 ou ATCC 6223) ayant perdu sa virulence au fil des repiquages successifs en laboratoire, c'est aujourd'hui la souche SCHU-S4, isolée en 1941 chez un humain, qui est la représentante de cette sous espèce²⁸. *F. tularensis* subsp. *tularensis* est endémique en Amérique du Nord. Elle a récemment été isolée en Slovaquie à l'occasion d'une étude épidémiologique sur le réservoir naturel³². Une étude basée sur la technique MLVA (*multilocus variable-number tandem repeat* (VNTR) *analysis*) a mis en évidence une proximité génétique des souches isolées en Slovaquie avec la souche de laboratoire SCHU-S4, laissant supposée que cette localisation géographique originale pouvait être liée à d'anciennes activités humaines³³. Cette étude avec d'autres basées sur l'analyse de régions de différenciation (RD)^{32,34}, la technique de macrorestriction génomique par champ pulse (*pulse-field gel electrophoresis*, PFGE)³⁵ ou l'étude du polymorphisme nucléotidique (*single nucleotide polymorphism*, SNP)³⁶ ont également permis la subdivision en deux clades de cette sous-espèce, respectivement nommées A1 ou A-East et A2 ou A-west. Le clade A1 est elle-même divisible en deux sous-clades distincts : A1a et A1b. Les clades et sous-clades A1a, A1b et A2 se distinguent par leur répartition géographique au sein du continent Nord-Américain et leur morbidité et mortalité chez l'homme^{35,36}. Notons que la souche SCHU-S4 fait partie du clade *F.*

tularensis subsp. *tularensis* A1a³⁷.

Figure 1 : Arbre phylogénique de *F. tularensis* d'après une analyse combinée des SNP (dans Vogler *et al.* Journal of microbiology, 2009)

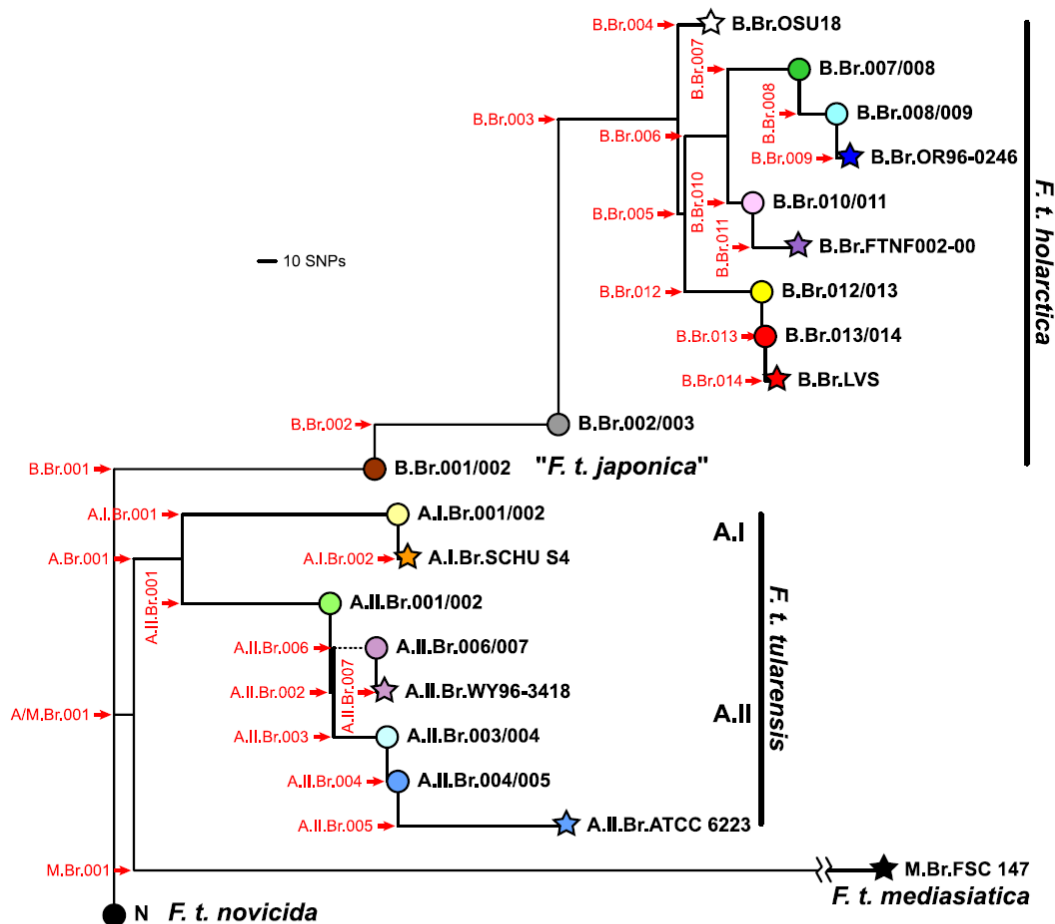


FIG. 3. MIP SNP phylogeny indicating canSNPs, clades, and subclades. Stars indicate terminal subclades defined by one of the eight *F. tularensis* genomes used for MIP SNP discovery. Circles represent collapsed branch points along the lineages that contain subgroups of isolates. These subclades are named for the two flanking canSNPs. canSNP names and positions are indicated in red. Branch A.II.Br.006 has a branch length of 1 SNP but is presented as a longer, dashed line to avoid obscuring other parts of the tree.

F. tularensis subsp. *holarctica* était précédemment désignée sous les appellations *F. palaeartica* ou *F. tularensis* type B²⁸. Cette sous espèce est présente dans tout l'hémisphère Nord. Historiquement, trois biovars ont été décrits pour cette sous-espèce²⁷ :

- Biovar I Ery^s : sensible à l'érythromycine, ce biovar est endémique en Amérique du Nord, Europe de l'Ouest, du Nord et Centrale, ainsi que dans les parties Nord et Est de Sibérie.
- Biovar II Ery^r : résistant de haut niveau à l'érythromycine, il est endémique en Europe centrale et de l'Est, dans les parties Ouest de Sibérie, de Russie, du

Caucase et du Kazakhstan.

- Biovar japonica : Sensible à l'érythromycine comme le biovar I, il se distingue des autres biovars par son aptitude à fermenter le glycérol. Il est endémique au Japon où il est le seul biovar présent, mais également dans d'autres zones géographiques d'Asie.

Les analyses génomiques les plus récentes, basées sur une étude de marqueurs MLVA croisée avec celle de SNP dits « canoniques » (canSNP) ont permis l'identification de six clades et dix sous-clades pour cette sous espèce, se distinguant par leur localisation géographique^{33,36}. Le biovar japonica est représenté par la clade B.V et la sous-clade B.Br.001/002 ; les clades B.II (B.Br.OSU18) et B.IV (B.Br.007/008, B.Br.008/009 et B.Br.OR96-0246) sont présentes majoritairement en Amérique du Nord, et à un degré moindre en Scandinavie ; les clades B.I (B.Br.013/014) and B.III (B.Br.012/013 et B.Br.LVS) sont présents en Europe de l'Est, Scandinavie et Eurasie ; et le clade « Spain, France and Sweden » qui comprend les sous-clades B.Br.010/011 et B.Br.FTNN002-00, est spécifiquement présent en Europe de l'Ouest^{36,38}. Ce dernier clade, appartenant au biovar I Ery^s est également caractérisé par la présence d'une délétion appelée RD23³⁹. Remarquons qu'à ce jour toutes les souches isolées en France font partie de la sous-clade B.Br.FTNN002-00 à l'exception de souches isolées de lièvres importés d'Europe de l'Est appartenant à la sous-clade B.Br.013/014^{36,40}.

F. tularensis subsp. *mediasiatica* a uniquement été isolée en Asie Centrale²⁸.

1.2.2 Ecologie et réservoir

F. tularensis est une bactérie intracellulaire facultative. Elle a été isolée d'une très grande diversité d'hôtes, incluant des mammifères, des oiseaux, des reptiles, des invertébrés et des protozoaires ; ainsi que des échantillons de sol et d'eau^{4,41}. Si les hôtes peuvent être contaminés par contact direct avec le pathogène dans l'environnement, le cycle inclus très souvent la transmission de la bactérie par un vecteur (insectes ou arthropodes hématophages)⁴¹.

F. tularensis subsp. *tularensis* a pour hôte principal les mammifères du genre *Sylvilagus* et *Lepus* représentés respectivement par les lapins et les lièvres. Ces deux représentants de la famille des lagomorphes sont très largement répandus à travers le continent Nord-américain.

Les vecteurs principaux identifiés pour *F. tularensis* subsp. *tularensis* sont les tiques *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis* et *D. andersoni*, ainsi que les taons (*Chrysops discalis*). Ces vecteurs présentent une répartition particulière, les deux premiers étant présent dans la moitié Est et en Californie et les deux derniers dans la moitié Ouest des Etats Unis d'Amérique⁴². Il a été observé que cette répartition géographique des vecteurs suit celle des clades des souches de *F. tularensis* subsp. *tularensis*, isolées chez les patients atteints de tularémie ; suggérant que les clades A1 et A2 occupent des niches écologiques différentes⁴.

Figure 2 : Hôtes et vecteurs de *F. tularensis* subsp. *tularensis* et subsp. *holarctica* (dans Keim *et al.* Annal of New York academy of science, 2007)

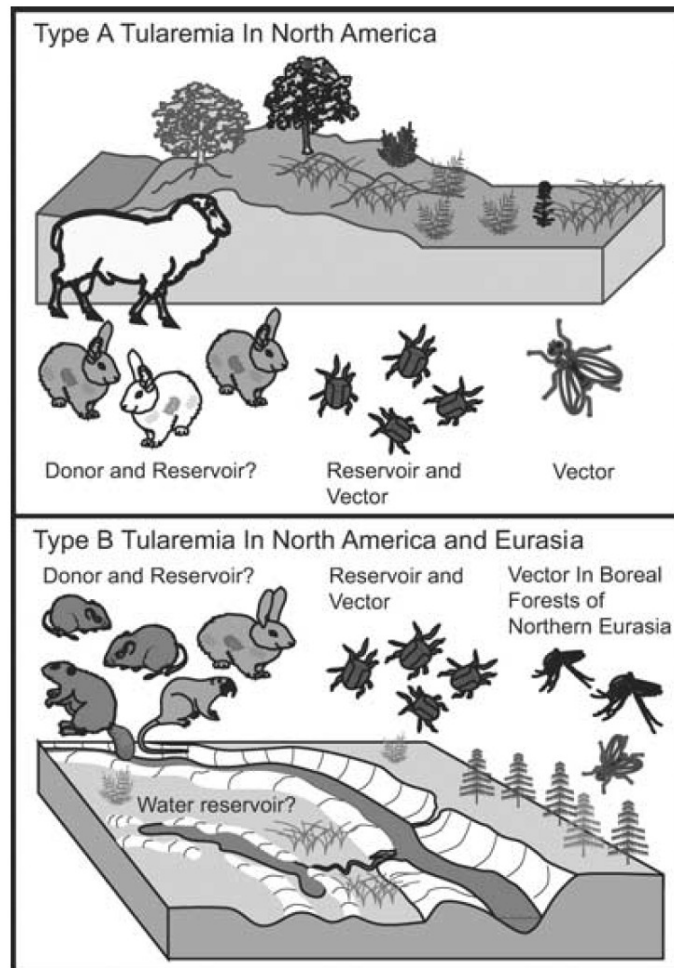


FIGURE 11. Host and vector associations of Type A and Type B tularemia. Type A is found in North America and associated with wild rabbits, ticks, and tabanid flies. Also, Type A tularemia outbreaks among sheep were historically frequently recorded in the western United States until the 1950s, though this association has been less clear in more recent times. Type B tularemia is distributed across the northern hemisphere and is associated with multiple rodent species, hares, ticks, blood feeding mosquitoes, and tabanid flies. There is an apparent relationship with rivers and streams and temporarily flooded landscapes.

F. tularensis subsp. *holarctica* est présente dans une plus grande diversité d'hôtes que la sous-espèce *tularensis*. Si les hôtes principaux en Europe et Amérique restent les lapins et les lièvres, cette sous-espèce est présente chez de nombreux rongeurs comme les campagnols, les rats, les souris ou les écureuils ; dont certains ont un style de vie aquatique (rats musqués et castors)^{4,41}.

Comme pour la sous-espèce *tularensis*, les tiques représentent un vecteur important pour *F. tularensis* subsp. *holarctica*. De nombreuses espèces de tiques appartenant à la famille des *Ixodidae* ont été identifiées comme étant naturellement infectées par la bactérie. Parmi ces espèces, *D. reticulatus* semble jouer un rôle majeur dans le maintien du réservoir de par sa large répartition géographique (de l'Atlantique au Kazakhstan et à la Sibérie du Sud) et son fort taux d'infection des populations. La tique *Ixodes ricinus* semble fréquemment impliquée dans la transmission à l'homme⁴.

Les moustiques jouent un rôle important de vecteur pour *F. tularensis* subsp. *holarctica* dans le Nord de l'Europe (Suède et Finlande)⁴³. Dix espèces des genres *Aedes*, *Culex* et *Anopheles* ont été identifiées comme étant naturellement infectées^{4,41}.

Les puces et les acariens ont également été suggérés comme des vecteurs potentiels de *F. tularensis* subsp. *holarctica*, même si leur implication dans le cycle de vie du pathogène est incertaine^{4,43}.

L'écologie de *F. tularensis* subsp. *mediasatica* est mal connue. Olsufjev et Meshcheryakova indiquent dans leur description initiale de la bactérie une distribution dans la nature chez les lièvres, les gerbilles et les tiques²⁸.

La diversité des hôtes potentiels rend difficile la détermination exacte du réservoir de ce pathogène. L'hypothèse la plus probable avancée à ce jour est le maintien du réservoir par une transmission trans-stadiale (de la larve à l'adulte) chez certains vecteurs arthropodes (tiques), associée à une persistance prolongée chez certains animaux « porteurs sains » et dans l'environnement⁴¹. La forte mortalité observée chez certains mammifères positionnerait plutôt ces hôtes comme le support de l'amplification du pathogène. Remarquons que les autres vecteurs décrits ci-dessus (taons, moustiques, puces, acariens) agiraient comme des vecteurs mécaniques, transmettant la bactérie après un repas récent, laissant des traces de la bactérie vivante au niveau des organes buccaux pour une période de plusieurs semaines⁴.

Les tiques se contaminent par les repas de sang effectués à chaque stade de vie, sur un mammifère potentiellement contaminé. Cet événement répété au cours du cycle de vie permet la contamination de tiques saines par un mammifère. Les *Francisella* sont alors présentes en temps qu'endosymbiotes au niveau des viscères et de l'hémolymphe des tiques, et apparemment de manière transitoire au niveau des glandes salivaires. Une seconde voie de maintien de ce réservoir serait une transmission verticale, via une contamination trans-ovarienne. Celle-ci reste aujourd'hui controversée, les études en laboratoire présentant des résultats contradictoires. Cependant, la mise en évidence de larves contaminées n'ayant pas encore effectué de repas de sang dans l'environnement semble indiquer que ce mode de contamination est possible⁴².

Les contaminations environnementales par *F. tularensis* (sol et eau) sont principalement liées aux mammifères infectés. La décomposition de cadavres d'animaux contaminés ainsi que l'excrétion de bactéries par ces derniers (urines et selles)^{42,43} entraînent le relargage de la bactérie dans l'environnement. Le maintien de *F. tularensis* dans ce compartiment, et spécialement le compartiment hydrique, passerait par la colonisation de protozoaires. En effet, il a été montré *in vitro* que *F. tularensis* peut infecter *Acanthamoeba castellanii* et s'y répliquer lentement, induisant une faible mortalité de ces protozoaires. De plus, *Francisella* peut survivre dans certains organismes protozoaires ciliés après ingestion par ces derniers⁴. Récemment, Bäckman *et al.* ont démontré la possibilité de la contamination de larves de moustiques par contact avec de l'eau contaminée, et la persistance de la bactérie vivante au stade adulte ; proposant une nouvelle voie de maintien de la bactérie dans le compartiment hydrique⁴⁴.

1.2.3 Pouvoir pathogène et facteurs de virulence

Si toutes les sous-espèces de *F. tularensis* sont hautement virulentes pour les souris et les cochons d'Inde, la sous-espèce *tularensis* est la plus virulente pour le lapin et pour l'homme avec des doses létales 50 (DL₅₀) inférieures à 10 bactéries par voie sous-cutanée²⁹, et des doses infectantes du même ordre (environ 25 bactéries) par voie aérienne^{43,45}. Si l'on ajoute à cela un taux de mortalité pouvant aller de 30 à 60% pour les formes sévères en l'absence d'un traitement adéquat, *F. tularensis* subsp. *tularensis* est l'un des agents pathogènes les plus dévastateurs potentiellement utilisables en bioterrorisme⁴⁶. Les deux clades semblent différer par leur virulence. En effet, les infections humaines causées par les souches de clade

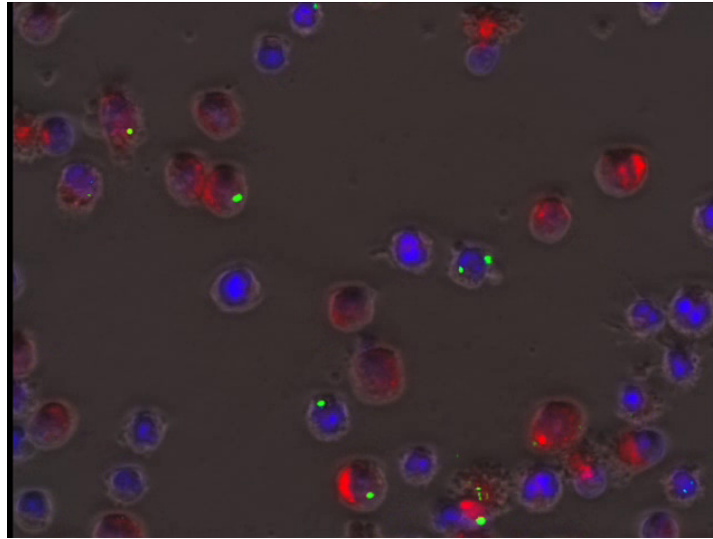
A1a et A2 paraissent moins graves que celles causées par les souches appartenant à la clade A1b^{35,37}. Ces constatations sont concordantes avec l'observation d'un temps réduit de survie chez la souris pour les souches A1b, comparé aux autres clades de *F. tularensis* subsp. *tularensis*¹⁸.

Comparativement, *F. tularensis* subsp. *holarctica* présente une DL₅₀ par administration sous-cutanée équivalente à la sous-espèce *tularensis* chez la souris et le cochon d'inde²⁹ mais provoque la mort de manière retardée¹⁸. La virulence chez le lapin et l'homme est en revanche bien inférieure pour la sous-espèce *holarctica*, avec des DL₅₀ pour une exposition sous-cutanée supérieures à celles observées pour la sous-espèce *tularensis* d'environ 10⁵ et 10², respectivement²⁹.

Chez l'animal, l'infection par *F. tularensis* se traduit de manière similaire qu'elle que soit la sous-espèce (subsp. *tularensis* ou subsp. *holarctica*). Les symptômes suivants sont observés de manière générale : augmentation de température, déshydratation, léthargie, baisse de l'appétit et asthénie. La présence de plaies ulcérées au point d'inoculation est souvent associée à ces symptômes généraux. Au cours de l'infection naturelle, la contamination se faisant le plus souvent par voie orale (ingestion de viande ou d'eau contaminée), ces lésions ulcérées sont localisées au niveau de la bouche et de la langue. Chez les animaux de laboratoire les deux voies d'inoculation de la bactérie principalement étudiées étant sous-cutanée ou aérienne, les ulcérations sont respectivement observées au niveau cutané et du tractus respiratoire haut. Elles sont associées à des adénopathies périphériques au point d'inoculation, une hépatomégalie et une splénomégalie, ces organes présentant des lésions nécrotiques en tête d'épingle ; et parfois un foyer nécrotique pulmonaire secondaire à une diffusion par voie hématogène^{43,47}. Cet épisode septicémique associé à la réaction inflammatoire de l'hôte semble avoir un rôle central dans la mort de ce dernier. De forts taux de cytokines inflammatoires et de chemokines dans la rate et les poumons sont corrélés à la mortalité dans l'étude de la tularémie pulmonaire⁴⁷.

Le pouvoir pathogène de *F. tularensis* réside dans sa capacité à survivre et moduler la réponse immune de l'hôte, puis dans sa capacité de multiplication intracellulaire, spécialement dans les macrophages, les hépatocytes, ainsi que dans une grande diversité de cellules endothéliales (tissu pulmonaire, digestif, rénal, etc.)^{48,49}.

Figure 3 : Multiplication d'un clone fluorescent de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS dans les macrophages murins J774-A1 (Collaboration CNR *Francisella*/SCIMI – Chu de Grenoble/LAPM)



Le mode d'action de *F. tularensis* dans la modulation des réponses immunes innées et acquises est un vaste terrain d'étude. Les récentes revues de Jones *et al.* et Steiner *et al.* (2014) font état des observations suivantes. Les macrophages infectés par *F. tularensis* relarguent des composés impactant par diverses voies la présence des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe II, suggérant la réduction *in vivo* de la présentation des antigènes aux lymphocytes T CD4⁺. Les macrophages infectés produisent également de la prostaglandine E2 (PGE2), inhibant la maturation des macrophages, la prolifération des lymphocytes T et la production d'interféron- γ , facteurs essentiels dans la réponse de l'hôte contre l'infection de *F. tularensis*⁴⁸. De plus, il a été constaté chez la souris et chez l'homme une incapacité des sujets à augmenter le niveau de cytokines pro-inflammatoires, voir une surexpression de cytokines immunosuppressives⁴⁷.

In vivo, *Francisella* est décrite comme une bactérie intracellulaire obligatoire. De très nombreuses études ont été menées sur les différentes étapes nécessaires à la réalisation de ce cycle de vie de la bactérie²⁹.

L'internalisation de la bactérie dans les cellules, et plus particulièrement dans les cellules phagocytaires est réalisée par un pseudopode asymétrique en forme de boucle. L'opsonisation des bactéries par les molécules du complément est un facteur clé dans l'optimisation de la phagocytose par les macrophages, cette dernière étant principalement médiée par le récepteur du complément CR3⁵⁰. D'autres récepteurs

sont également impliqués dans le recrutement par les cellules phagocytaires tels que les récepteurs Fc γ et scavenger de classe A. Une autre voie, médiée par les récepteurs du mannose permet l'internalisation des bactéries non-opsonisées⁹.

Une fois internalisée dans la cellule phagocytaire, la survie de *Francisella* tient à trois évènements : la survie de la bactérie dans l'environnement du phagosome, l'arrêt de la maturation de phagolysosome et l'échappement du phagosome dans le cytoplasme de la cellule hôte⁴⁸. *F. tularensis* utilise une stratégie multifactorielle dans la résistance contre les agents antimicrobiens du phagosome. Par exemple, l'activité des complexes NADPH oxydase responsable de la production des dérivés réactifs de l'oxygène (« reactive oxygen species » ou ROS) est limitée par *F. tularensis* via une exclusion de composés de ces complexes des phagosomes et la baisse de phosphorylation d'autres composés d'origine cytoplasmique de ces mêmes complexes. La production d'enzymes, telles que les phosphatases alcalines, permettant de contrer l'action de composés antimicrobiens spécifiques a aussi été mise en évidence⁹. L'échappement du phagosome suit rapidement l'entrée de la bactérie dans le compartiment cytoplasmique de la cellule hôte (1 à 4heures). La sortie du phagosome se produit consécutivement à la dégradation de la membrane de ce dernier. Observons que l'acidification de l'environnement intra-phagosome joue un rôle important dans sa lyse⁴⁸.

La dernière étape du cycle intracellulaire de *Francisella* est la multiplication intracytoplasmique du pathogène. La bactérie entre après l'échappement de la vacuole dans une phase de réplication intensive dans le cytosol. L'infection provoque l'entrée des cellules en apoptose ou pyroptose. Cette phase aboutie à la lyse de l'enveloppe cellulaire et la libération des bactéries dans le milieu extracellulaire. Elles peuvent alors réinfecter les cellules adjacentes ou celles d'autres organes par dissémination par voie sanguine⁹. Un phénomène d'autophagie peut également être observé dans le cytoplasme des macrophages avec la formation de « *Francisella*-containing vacuoles » (FCV). Ce phénomène qui s'amplifie avec le temps d'infection est intrinsèquement lié au métabolisme bactérien⁵¹ participant activement à la rapide réplication intracellulaire du pathogène⁵².

Figure 4 : Cycle intracellulaire de *Francisella* dans les macrophages (dans Chong and Celli, *Frontiers in microbiology*, 2010)

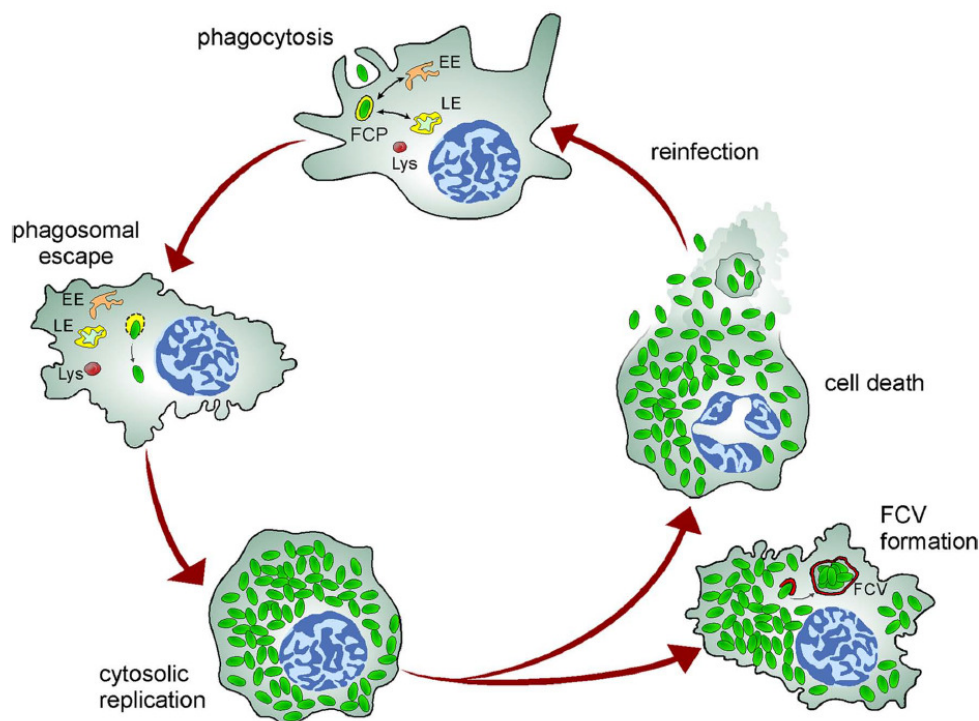


FIGURE 2 | Model of the *Francisella* intracellular cycle in macrophages. Upon phagocytosis, bacteria reside in an early phagosome (FCP) that interacts with early (EE) and late (LE) endocytic compartments but not lysosomes (Lys). Bacteria rapidly disrupt the FCP membrane and reach the cytosol where they undergo extensive replication, a process followed by cell death and bacterial release or reentry of cytosolic bacteria within *Francisella*-containing vacuoles (FCV) via autophagy in murine macrophages.

Ces capacités sont majoritairement médiées par trois facteurs de virulence : la capsule, le lipopolysaccharide (LPS) et l'îlot de pathogénicité de *Francisella* (FPI).

La capsule confère à *F. tularensis* la capacité de résister aux actions d'opsonisation et de lyse bactérienne induites par l'action combinée des anticorps circulants et du complément⁴⁸. Elle ne présente cependant pas de rôle dans la survie intracellulaire après phagocytose par les cellules polynucléaires²⁹.

Les composants du LPS de *F. tularensis* sont très atypiques. Le lipide A présente des différences dans la longueur des chaînes d'acides gras (16-18 vs. 12-14 carbones) et dans le nombre d'acétylation (tetra vs. hexa), comparé au LPS d'autres bactéries à Gram négatif. Le LPS de *F. tularensis* n'interagit pas avec la voie d'activation de la réaction inflammatoire de l'hôte par les Toll-Like Récepteurs-4 (TLR-4), retardant cette dernière⁴⁸. Le LPS semble cependant interagir indirectement avec les TLR-2, entraînant la cascade pro-inflammatoire à l'origine des symptômes de la maladie. Le LPS atypique semble être à l'origine du mode de phagocytose particulier observé chez *F. tularensis*⁴¹.

Le FPI est un locus d'environ 30kb. Certains des gènes présents sur ce locus

encodent pour des composants similaires à ceux d'un système de sécrétion de type IV récemment identifié chez *Vibrio cholerae* et *Pseudomonas aeruginosa*⁹. Deux copies identiques du FPI sont présentes dans le génome de *F. tularensis* et une seule dans celui de *F. novicida*. Même si le fonctionnement exact de l'ensemble des protéines encodées n'est pas connu, le FPI tient une place centrale dans tous les aspects de la virulence de *F. tularensis*. Par exemple, le gène *iglC*, qui code pour une protéine hypothétique de 23KDa, joue un rôle important dans la suppression de la réponse immunitaire de l'hôte, l'échappement de la FCP et la réplication intracellulaire^{9,47}.

Figure 5 : Enveloppe de *Francisella* et virulence (dans Rowe and Huntley, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2015)

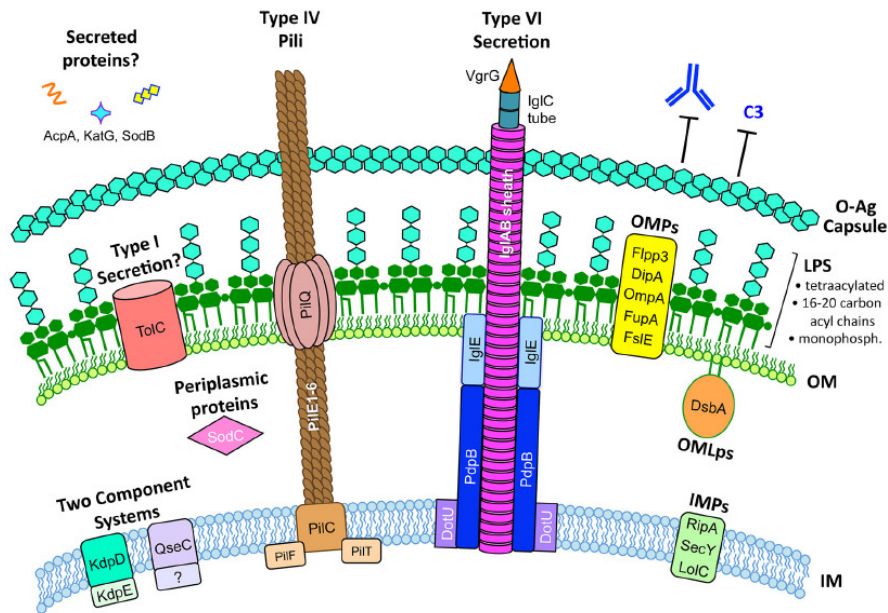


FIGURE 1 | The *F. tularensis* envelope and its role in virulence. The *F. tularensis* capsule, identical to the O-antigen of LPS, blocks IgM and complement component C3 binding. *F. tularensis* LPS differs from prototypic LPS in that it is tetraacylated, possesses long-chain acyl chains (16-20 carbons long), is either non- or mono-phosphorylated, and is a weak TLR4 agonist. Type IV pili form horn-like protrusions on the bacterial surface and, while correlated with virulence, the exact function of *F. tularensis* type IV pili are not known. A *Francisella* Pathogenicity Island (FPI)-encoded Type VI-like secretion system has been reported in *F. novicida* (Table 3) but expression and function in virulent *F. tularensis* strains has not been reported. Various proteins have been reported to be secreted by *F. tularensis*, including AcpA, KatG, and SodB (Table 3), but the mechanisms for their secretion are unknown. The *F. tularensis* outer membrane (OM) contains many outer membrane proteins (OMPs) and outer membrane lipoproteins (OMLps) that are required for virulence (Table 4). Periplasmic and inner membrane proteins (IMPs) also play roles in *F. tularensis* virulence (Table 5), but much less is known about these envelope compartments. See individual sections for specific details and references.

De nombreux autres déterminants de virulence ont pu être identifiés chez *F. tularensis*, certains étant liés à la captation d'éléments nutritifs nécessaires à la vie intracellulaire de la bactérie. Nous pouvons citer de manière non exhaustive les transporteurs des acides aminés (cystéine, glutamate et asparagine)⁵³ et les systèmes protéiques impliqués dans la captation du fer tel que *fsIABCDEF*, *feoAB*, *fupAB*, et le régulateur *fur*⁵⁴. D'autres facteurs de virulences sont liés à la régulation

de la transcription tel que *mglA*, *fevR*, *sspA* et *migR* impliqués directement ou indirectement dans la régulation du FPI ; à la régulation de la traduction comme les small RNA (sRNA)⁵⁵ ; ou les systèmes de sécrétion permettant le relargage de protéines impliquées dans la survie intracellulaire⁵⁶.

2 La tularémie chez l'homme

2.1 Les formes cliniques de tularémie

Les premiers symptômes de la maladie apparaissent de manière brutale après une période d'incubation courte, en moyenne 3 à 5 jours (jusqu'à 14 jours). Ils sont aspécifiques et s'apparentent à un syndrome pseudo-grippal : fièvre, frissons, courbatures généralisées, céphalées et prostration⁴¹. Les symptômes spécifiques apparaissent ensuite. Ils sont classés en 6 formes cliniques qui dépendent de la voie de contamination, de la dose infectante et de la virulence de la souche bactérienne de *F. tularensis*⁵⁷.

La forme clinique de tularémie habituellement la plus fréquente est la forme ulcéro-ganglionnaire. Elle est consécutive à une contamination par contact direct de la bactérie avec la peau. Les sources de contaminations majeures sont la manipulation de carcasses d'animaux infectés et les piqûres de vecteurs. La maladie se présente sous la forme d'une lésion vésiculo-papulaire évoluant vers une ulcération au point d'inoculation, associée à une ou plusieurs adénopathies satellites. Ces ganglions sont souples à la palpation et peuvent évoluer vers une fistulisation avec écoulement purulent^{45,57}.

Trois autres formes cliniques de tularémie se rapprochant de la forme ulcéro-ganglionnaire peuvent être décrites. Tout d'abord la forme ganglionnaire qui présente un tableau identique à la forme ulcéro-ganglionnaire. Elle se distingue par l'absence de lésion détectable au point d'inoculation du pathogène⁵⁷.

La forme oculo-ganglionnaire ou syndrome de Parinaud survient après une contamination conjonctivale par aérosolisation ou manu-portée. Les lésions sont unilatérales et localisées au niveau de la conjonctive sous forme d'ulcères ou de nodules pouvant être associés à un œdème périorbitaire. Les adénopathies satellites sont alors localisées au niveau des ganglions pré-auriculaires ou cervicaux⁴¹.

Figure 6 : Adénopathie cervicale chez un patient atteint de tularémie (dans Ellis *et al.*, Clinical microbiology reviews, 2002)



FIG. 4. Enlarged lymph node in a tularemia patient.

Enfin, la forme oropharyngée de tularémie, consécutive à une contamination par voie orale (par ingestion d'eau ou d'aliments contaminés) se manifeste par une pharyngite souvent sévère, parfois pseudo-membraneuse, et des adénopathies cervicales. Il est possible d'observer des formes dites « digestives » de tularémie si la contamination s'étend au tractus digestif bas. Dans ce cas, des douleurs abdominales et une diarrhée peuvent survenir²⁹.

L'ensemble de ces formes présente le plus souvent une gravité modérée et un taux de mortalité faible. Les infections ganglionnaires évoluent cependant vers l'abcédations chez

environ 30% des patients, avec une évolution souvent prolongée et une possible fistulisation cutanée, même en cas de traitement antibiotique adapté^{29,58}.

Les deux dernières formes cliniques de tularémie correspondent souvent à des tableaux cliniques plus sévères. En effet, la tularémie dite « typhoïdique » est une forme grave se traduisant par une septicémie, sans site infectieux détectable, ni site d'inoculation apparent. Cette forme est plus souvent liée à *F. tularensis* subsp. *tularensis* et présente une forte mortalité (30 à 60%)²⁹.

La forme respiratoire est consécutive à l'inhalation du pathogène ou plus rarement à une dissémination hémotogène de la bactérie au tissu pulmonaire à partir d'un autre foyer infectieux. La sévérité de cette forme est très variable en fonction de la sous espèce à l'origine de l'infection. La sous espèce *tularensis* peut provoquer des pneumopathies sévères d'apparition brutale, rapidement mortelles. La sous-espèce *holarctica* entraîne le plus souvent une adénopathie hilare associée ou non à des symptômes pulmonaires, d'évolution chronique, et pouvant évoquer une

tuberculose ou un lymphome. En l'absence d'une antibiothérapie adaptée, les formes respiratoires graves sont associées à un fort taux de mortalité⁴³.

Notons que l'ensemble des formes de tularémie décrites ci-dessus peuvent être compliquées en l'absence de traitement précoce et adapté, ainsi qu'en présence d'un état d'immunodépression chez le patient infecté, ou si la bactérie à l'origine de l'infection présente une virulence élevée (*F. tularensis* subsp. *tularensis* Clade A.1.b). L'infection peut alors gagner d'autres tissus (rénal, hépatique, nerveux, musculaire, pulmonaire, etc.) par voie hématogène^{29,37}.

2.2 Epidémiologie

L'épidémiologie de cette zoonose est intrinsèquement liée à la sous-espèce de *F. tularensis* à l'origine de l'infection et en conséquence à la source de la contamination et la localisation géographique. Les premiers cas humains étiquetés de tularémie sont décrits en 1914, aux Etats-Unis d'Amérique chez deux personnes découpant de la viande de lapin sauvage. La maladie se présente alors pour les deux patients sous la forme oculoganglionnaire¹. L'incidence de la maladie y a beaucoup diminuée au cours du XXème siècle pour atteindre une incidence inférieure à 1 cas pour 100000 habitants, principalement du fait de la réduction de l'exposition humaine aux animaux sauvages malades^{4,41}. Une étude épidémiologique analysant 316 cas de tularémie nord-américains sur une période de 40ans (1964-2004) a mis en évidence les caractéristiques suivantes : 2/3 des infections sont dues à la sous espèce *tularensis* contre 1/3 pour la sous-espèce *holarctica*. Les hommes sont principalement touchés et présentent majoritairement une forme ulcéro-ganglionnaire, l'âge ayant un impact sur la gravité de la maladie. Les infections ont lieu principalement entre mai et septembre, cette période correspondant à un contact accru avec les sources d'infections qui sont majoritairement les animaux malades (lagomorphes, rongeurs et chats), suivi de près par les morsures d'arthropodes³⁵.

En dehors du continent Nord-Américain, c'est la sous-espèce *holarctica* qui est très majoritairement impliquée en pathologie humaine. En Europe du Nord, la prévalence de la maladie connaît depuis le milieu des années 90 une augmentation notable pour atteindre en 2012 des valeurs proches de 4cas/100000habitants/an en Suède. Ces cas apparaissent majoritairement sous la forme d'épidémies estivales localisées. Les zones de forêts boréales proches d'étendues d'eau douces semblent corrélées à des incidences très fortes. La classe d'âge à haut risque correspond à la

tranche 40-70ans, avec une majorité d'hommes⁵⁹.

L'étude de cas de tularémie survenus entre 2009 et 2011 en Anatolie Centrale (Turquie) montre des caractéristiques épidémiologiques très différentes. L'origine des contaminations est ici hydrique ; *F. tularensis* subsp. *holarctica* ayant été identifiée dans des prélèvements d'eau. En effet, la majorité des patients sont de sexe féminin, avec une majorité de cas pour la tranche d'âge 30-39ans. La forme clinique la plus représentée est la forme oro-pharyngée lors d'un pic épidémique hivernal (décembre à mars)⁶⁰.

Pour finir, évoquons brièvement l'épidémiologie récente de la tularémie en France. L'incidence de la maladie y est très faible (0,07/100000habitants/an). Elle émerge aujourd'hui très majoritairement sous forme de cas sporadiques, même si des phénomènes épidémiques localisés peuvent être observés. La majorité des formes cliniques mises en évidence sont ganglionnaires et ulcéro-ganglionnaires. Les hommes sont plus touchés que les femmes. La source de contamination la plus fréquente est le contact avec un animal contaminé, bien corrélé avec le pic automnal de contamination⁶¹.

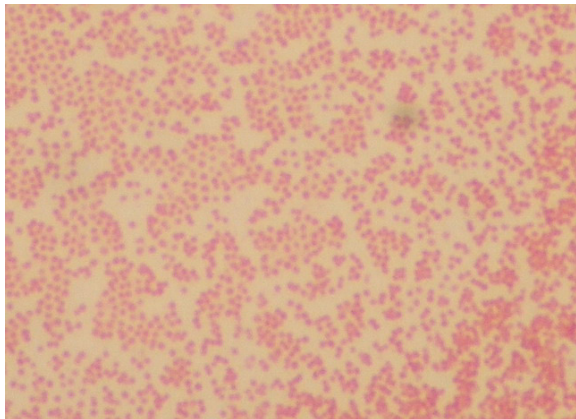
2.3 Diagnostic Biologique

Le diagnostic de la tularémie est très souvent retardé par rapport au début des symptômes en dehors des événements épidémiques⁶¹. Les tableaux cliniques sont peu spécifiques rendant le diagnostic différentiel complexe, que la forme clinique soit ganglionnaire ou respiratoire. De plus, les marqueurs biologiques habituels des infections profondes sont peu marqués, avec une numération des globules blancs normale à peu élevée avec augmentation du ratio des cellules mononuclées et le dosage de la protéine C réactive modérément augmentée. Seule la vitesse de sédimentation reste augmentée pendant le premier mois de la maladie⁶².

Le diagnostic biologique de la tularémie peut être basé sur la mise en évidence directe ou indirecte de la bactérie chez le patient. Le diagnostic direct peut être établi avec plusieurs techniques à commencer par l'examen direct par la coloration de Gram. Il est souvent peu révélateur. *Francisella* ne présentant qu'une faible affinité pour le contre colorant, elles apparaissent rose pâle en intra ou extracellulaire dans des prélèvements présentant des matrices souvent complexes. Les bactéries sous la forme de bacilles à Gram négatifs de forme coccoïde et de petite taille (0,2 à 0,5µm sur 0,7 à 1,0µm)^{29,43}, sont entourées d'un halo clair

matérialisant la capsule⁴³.

Figure 7: Frottis de *F. tularensis* subsp. *holarctica* coloré par la méthode de Gram (CNR *Francisella* – CHU de Grenoble)



L'isolement de la souche bactérienne en culture est un aspect majeur du diagnostic direct. La culture de *F. tularensis* nécessite l'utilisation de milieux de culture enrichis en cystéine. Elle est favorisée par un apport d'ions ferriques. Aérobic stricte, *F. tularensis* pousse plus facilement sur milieux solides (ex : Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE), Cystine Heart Agar with 9% chocolatized Blood (CHAB), gélose chocolat supplémentée en

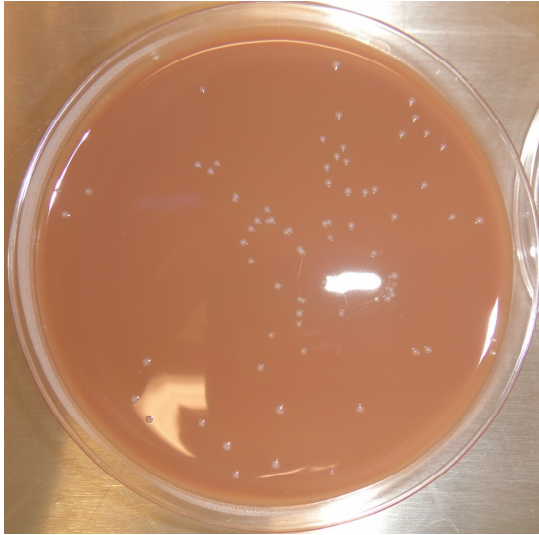
PolyViteX (PVX) ou Thioglycollate-glucoseblood agar (TGBA)) dans une atmosphère supplémentée ou non en CO₂⁴³.

Les colonies de *F. tularensis* apparaissent en 24 à 48heures. D'un diamètre proche d'1mm, elles présentent sur géloses chocolat supplémentées en PVX (GC-PVX) une coloration grise très légèrement verdâtre liée à l'hémolyse, avec un aspect bombé et brillant. Si l'incubation est prolongée au-delà de 48heures, les colonies grossissent et montrent un important polymorphisme de taille.

Les milieux de culture liquides tels que le Brain-Heart Infusion (BHI), le Müller-Hinton (MHB) ou le milieu de Chamberlain, toujours supplémentés en cystéine peuvent être utilisés. La pousse bactérienne est plus lente (3 à 7 jours) surtout si le milieu n'est pas agité pour favoriser son oxygénation (>10jours)²⁹.

Enfin, les prélèvements peuvent être inoculés sur cultures cellulaires ou à la souris pour permettre la récupération de la souche par ensemencement secondaire sur milieu solide des lysats de culture ou des broyats de foie ou de rate prélevés sur les animaux moribonds^{43,63}. Ces techniques nécessitant à la fois des installations et une maitrise technique spécifique sont réservées à certains centres spécialisés.

Figure 8: Culture de *F. tularensis* subsp. *holarctica* sur milieu chocolat PolyViteX (bioMérieux®) après 48 heures d'incubation à 37°C en atmosphère aérobie enrichie avec 5% de CO₂ (CNR *Francisella* – CHU de Grenoble)



L'identification des cultures peut être réalisée par technique biochimique. *F. tularensis* ne présente pas d'activité oxydase et ne fermente qu'un nombre limité de sucres, sans production de gaz. La mise en évidence de la fermentation du glucose, du glycérol, du maltose et de la citrulline permet la distinction des différentes sous espèces de *F. tularensis*^{28,43}. Aujourd'hui, l'avènement de la spectrométrie de masse par technique MALDI-TOF pour l'identification des bactéries permet également la différenciation au niveau

de la sous espèce des bactéries du genre *Francisella*⁶⁴. D'autres techniques permettent d'identifier *F. tularensis* à partir des cultures ou directement dans les prélèvements. La biologie moléculaire apporte de nombreuses solutions. Des outils utilisant la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel (RT-PCR) ont été développés ces dernières années permettant la détection sensible et spécifique de *F. tularensis*. Plusieurs cibles génomiques ont été utilisées pour le développement des essais, comme par exemple des gènes codant pour des protéines membranaires (*tul4* et *fopA*), des déterminants antigéniques (*pdpD*), et des éléments mobiles *isftu2*⁶². Cette dernière présente l'avantage d'avoir plusieurs copies dans le génome de la bactérie (16-18 copies pour *F. tularensis* subsp. *tularensis* et 41-57copies pour *F. tularensis* subsp. *holarctica*)³¹, augmentant la sensibilité du test⁶². La différenciation des espèces et sous espèces est également maintenant réalisée par techniques de biologie moléculaire. La PCR conventionnelle ou en temps réel, basée sur la mise en évidence de RD³⁴ et ou de gènes spécifiques d'espèces⁶²; le séquençage de la zone inter-génique entre les gènes codant pour les ARN16S et 23S⁶⁵ ou l'étude des VNTR³³ permettent d'établir cette distinction dans la plupart des laboratoires pratiquant la biologie moléculaire.

Les techniques immunologiques sont beaucoup moins utilisées dans le diagnostic direct de la tularémie. Si l'immunofluorescence directe, l'ELISA ou l'immunohistochimie ont longtemps été mises en œuvre pour l'identification de *Francisella* dans les prélèvements d'origine animale et environnementale en recherche, seule l'immunohistochimie a montré un intérêt en diagnostic humain. Son usage reste très restreint, la PCR étant privilégiée pour sa sensibilité et l'accessibilité de ses réactifs⁶². Le développement de ces techniques n'est toutefois pas abandonné. Même si leurs sensibilités n'atteignent pas celles des tests de biologie moléculaire, leur rapidité et facilité de mise œuvre reste un avantage, notamment pour les tests immunochromatographiques⁶⁶.

Les techniques immunologiques demeurent très utilisées dans le diagnostic indirect de la tularémie. Le sérodiagnostic a souvent une utilité rétrospective, l'apparition des anticorps étant trop tardive pour permettre l'instauration rapide d'un traitement. Les anticorps apparaissent chez le patient en 10 et 20 jours post-infection⁴³. Toutes les classes d'anticorps synthétisées lors de la réaction immunitaire (IgM, IgG et IgA) le sont simultanément, et sont présentes dans le sérum du patient pendant plusieurs années, ce qui explique les difficultés parfois rencontrées pour dater une infection par ce biais⁶². Il existe des réactions croisées notamment avec les infections à *Brucella*, *Yersinia*, *Legionella* ou *Salmonella*⁴¹. Les critères d'interprétation diagnostique peuvent dépendre de la technique utilisée et du laboratoire effectuant le test, mais correspondent habituellement à un titre d'anticorps supérieur ou égal à 160 ou une multiplication du titre par 4 sur une période de 2 semaines à 1 mois^{41,58}.

De nombreuses techniques immunologiques sont utilisées : Micro-agglutination (MAT), ELISA, immunofluorescence indirecte, immunochromatographie, microarray ou western blot. Les antigènes utilisés sont, soit des antigènes de la membrane externe (protéique ou glycoprotéique, LPS), soit des extraits de bactéries entières tuées^{58,67}.

2.4 Prophylaxies et Traitements

Deux lignes directrices peuvent être observées concernant la prophylaxie de la tularémie. La première ligne correspond à la réduction du contact avec les sources de contamination. Comme nous l'avons vu précédemment, ce réservoir est très variable et les mesures prises doivent être adaptées à ce dernier, et mise en place

dans les zones identifiées comme des foyers récurrents de la maladie. Ces mesures pourraient être aussi variables que par exemple, le port de vêtements à manches longues, de pantalon et d'un couvre-chef pour les travailleurs en forêt en prévention des contaminations par morsure de vecteurs ; le port de gant et de masques lors de la prise en charge de carcasses de lagomorphes et rongeurs par les chasseurs ; la décontamination de l'eau de source utilisée pour la boisson et la maîtrise du contact des stocks de nourriture avec les rongeurs.

De manière complémentaire, le maintien de l'information sur les zones d'endémie pour les personnels médicaux permettrait la réduction du délai diagnostique en dehors des épisodes épidémiques.

Le second axe de prévention de la tularémie est basé sur la vaccination. Le premier vaccin a été développé dans le second quart du XX^{ème} siècle en U.R.S.S. par El'bert, Gaiskii et Kudo. Ce vaccin, inoculé par voie dermique est développé à partir de souches atténuées par passages sur milieux de culture artificiels. De grandes campagnes de vaccination ont alors été menées à la fois dans la population et les personnels de laboratoire de production de la bactérie montrant une incidence 20 fois inférieure dans les populations vaccinées. Cependant une part non négligeable de cette population (0,17%) développait une forme de tularémie de gravité moyenne dans les 15 jours suivant l'inoculation⁶⁸. Deux de ces souches atténuées furent transférées aux USA en 1956, desquelles la souche vaccinale de *F. tularensis* subsp. *holarctica* dites Live Vaccine Strain (LVS) fut dérivée. Cette souche est aujourd'hui le seul vaccin efficace connu conférant une protection contre la tularémie. Cependant, son utilisation sur la population n'est toujours pas approuvée, eut égard à l'absence de caractérisation de la réponse protectrice chez l'homme et au manque de stabilité (virulence et immunogénicité) de cette souche après repiquages successifs²⁹. De nombreuses recherches sont en cours à la fois pour identifier les déterminants génétiques de l'atténuation de cette souche⁶⁹, et pour développer des vaccins alternatifs à base de bactéries tuées ou d'antigènes originaires du cytoplasme ou de l'enveloppe bactérienne²⁹.

Le traitement de la tularémie est aujourd'hui principalement basé sur l'antibiothérapie. Historiquement, la tularémie était traitée par la streptomycine. Cet aminoside n'étant plus disponible dans plusieurs pays, la gentamicine lui est souvent substituée. Son utilisation est réservée aux cas sévères de tularémie. En effet, sa voie d'administration (parentérale) et sa potentielle toxicité nécessitent une

surveillance médicale stricte⁷⁰. Les dernières recommandations de l'organisation mondiale de la santé (OMS) préconisent l'administration en deux doses quotidiennes de 5mg/kg/jour de gentamicine sur une période de 10 jours, cette période pouvant se prolonger jusqu'à amélioration des symptômes pour les cas sévères⁴³.

Les tétracyclines sont également une alternative thérapeutique pour la tularémie. L'utilisation de cette classe d'antibiotique est limitée aux cas de sévérité modérée. Leur action bactériostatique nécessite une durée de traitement minimale de 15 jours correspondant à la mise en place de l'immunité à médiation humorale. La posologie recommandée pour la doxycycline est de 200mg/jour en deux prises par voie orale pour les adultes. L'utilisation des tétracyclines est proscrite pour les enfants avant 8 ans et les femmes enceintes⁴³.

Enfin, la troisième alternative thérapeutique contre la tularémie est l'utilisation des fluoroquinolones. Même si cette alternative n'est actuellement pas validée par la Food and Drug Administration (FDA)⁴³, des études montrent que les deux sous espèces *tularensis* et *holarctica* sont sensibles à cette classe d'antibiotique⁷¹, et qu'ils présentent une activité bactéricide *in vitro* et *in cellulo*⁷². Les doses recommandées pour la ciprofloxacine sont de 1000mg/jour par voie intraveineuse ou orale chez l'adulte et de 15mg/kg/jour pour les enfants, le traitement devant être prolongé au moins 10 jours⁴³.

3 Les Fluoroquinolones

Les quinolones sont des antibiotiques de synthèse décrits pour la première fois dans les années 1960. La première molécule décrite comme appartenant à cette classe d'antibactériens était l'acide nalidixique⁷³. Sur le plan chimique, ces molécules sont composées d'un cycle pyridine affublé d'une fonction cétonique en position 4 et d'un groupement carboxylique en position 3. L'azote de ce cycle peut être diversement substitué (ex : fonction éthyle pour l'acide nalidixique). Est accolé à ce premier cycle, un second cycle aromatique dont la nature varie en fonction de la molécule (ex : une pyridine pour l'acide nalidixique)⁷⁴. De par leurs propriétés pharmacocinétiques et leurs effets secondaires, ces molécules ne sont utilisées dans un premier temps que chez l'adulte pour le traitement des infections urinaires⁷⁵.

C'est dans les années 1980, avec la modification de ce noyau (notamment par l'addition d'un atome de fluor en position 6 et d'un troisième cycle aromatique en position 7)⁷⁴ que les nouvelles quinolones, nommées fluoroquinolones, vont

connaître un véritable essor. Ces modifications vont tout d'abord entraîner un élargissement du spectre d'action de ces antibiotiques. Alors que la première génération n'était utilisée que contre les bactéries aérobies à gram négatif, la seconde génération voit son utilisation étendue au traitement des infections par les bactéries aérobies à gram positif⁷⁵. D'autres modifications, comme par exemple, la substitution en C8 d'un atome halogène ou encore par l'addition à cette position d'une fonction methoxy vont faire émerger de nouvelles générations de fluoroquinolones (3ème et 4ème génération) actives notamment contre le pneumocoque et certaines bactéries anaérobies. Ces modifications structurales vont entraîner en plus d'un élargissement du spectre d'action, une amélioration des propriétés pharmacocinétiques. Parmi les améliorations les plus importantes, nous pouvons noter un allongement de la demi-vie d'élimination, une meilleure pénétration dans les tissus, ainsi qu'une amélioration de l'efficacité d'un traitement par voie orale et une meilleure activité in vivo. Ces modifications vont permettre d'élargir les indications thérapeutiques de cette classe d'antibiotique à d'autres infections que celles de la sphère urinaire (infections respiratoires, infections cutanées, ostéites et infections articulaires, etc.)⁷³.

Figure 9 : Structure des quinolones et fluoroquinolones (dans Drlica et Zhao, Microbiology and molecular biology, 1997)

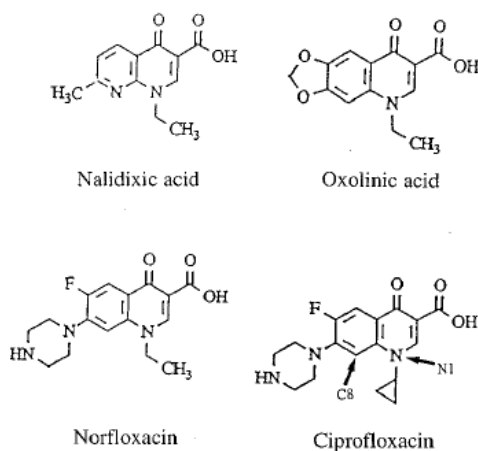


FIG. 1. Quinolone structures.

Les principaux effets indésirables associés aux fluoroquinolones sont la cardiotoxicité, l'hépto-toxicité et l'hypoglycémie. Ces derniers semblent plus fréquents et plus sévères avec les fluoroquinolones comportant un atome d'azote en position 8. Un autre effet indésirable important est la photo-toxicité. Ce dernier est lié à l'accumulation de l'antibiotique au niveau cutané. Cet effet est molécule dépendant⁷³.

3.1 Mécanisme d'action

L'action antimicrobienne des fluoroquinolones est basée sur l'inhibition partielle de l'activité enzymatique des topoisomérases de type II : l'ADN gyrase et la topoisomérase IV. Ces deux enzymes cytoplasmiques sont homologues. Ce sont des tétramères constitués de 2 homodimères des sous-unités GyrA et GyrB pour l'ADN gyrase, et ParC et ParE pour la topoisomérase IV, respectivement codés par les gènes *gyrA* et *gyrB*, et *parC* et *parE*⁷⁶.

L'ADN gyrase tient un rôle majeur dans des fonctions cellulaires vitales comme la réplication et la transcription par son activité régulatrice ATP-dépendante sur le super-enroulement du chromosome bactérien. Son action se déroule en trois étapes : 1/ L'ADN gyrase introduit dans la molécule d'ADN double brin une cassure, 2/ l'ADN, positivement enroulé autour de l'enzyme est passé au travers de cette cassure, 3/ l'enzyme répare la coupure de l'ADN double brin précédemment introduite⁷⁷. La partie N-terminale de la sous-unité GyrA assure l'introduction et la stabilisation de la cassure dans l'ADN double brin. Le rôle de la partie C-terminale de GyrA est moins clair. Ce fragment (acide aminés 572 à 875) présente cependant une forte affinité pour les fragments d'ADN, laissant supposer son implication dans l'enroulement de ce dernier autour de l'enzyme⁷⁸.

Figure 10 : Cycle de l'activité de super-enroulement de l'ADN par l'ADN gyrase et action des quinolones (dans Hawkey, Journal of antimicrobial chemotherapy, 2003)

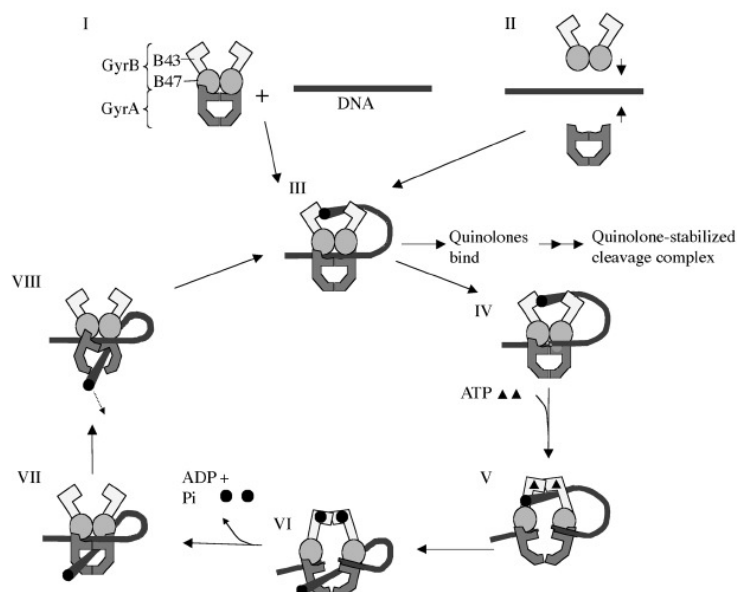


Figure 1. Schematic illustration of the DNA gyrase supercoiling cycle, showing the point of action of quinolones. The domains of gyrase are shown in different grey shades with the C-terminal (DNA-wrapping) domain of GyrA omitted for clarity. Figure provided by Dr J. G. Heddle and Professor A. Maxwell, John Innes Centre, Norwich, UK.

La topoisomérase IV diffère de l'ADN gyrase par l'absence d'enroulement de la molécule d'ADN autour de l'enzyme. Cette distinction confère à cette enzyme une fonction de caténation/décaténation des ADN double brins, elle aussi réalisée par introduction de cassure double brins. L'action de cette enzyme est indispensable dans les dernières étapes de la réplication. Notons que l'ADN gyrase présente également une capacité de décaténation, mais son activité est 100 fois inférieure à celle de la topoisomérase IV⁷⁷.

Les quinolones, en se fixant sur la molécule d'ADN au niveau de la cassure induite par les topoisomérases de type II, vont inhiber le ré-appariement de la molécule d'ADN double brins clivée par la formation d'un complexe enzyme-antibiotique-ADN stable. L'impact des fluoroquinolones sur la survie bactérienne se fait suivant deux modalités. D'une part, les quinolones induisent une stase bactérienne par l'inhibition de la synthèse d'ADN résultant du blocage de la fourche de réplication. D'autres parts, la stabilisation des coupures du chromosome bactérien entraîne la mort de la bactérie⁷⁷.

La cible de ces molécules antibactériennes étant située au niveau du cytoplasme, elles doivent pour l'atteindre, traverser les membranes externes et internes des bactéries à Gram négatif. Les fluoroquinolones empruntent pour cela des porines de la membrane externe permettant le passage de molécules hydrophiles d'un poids moléculaire inférieur à 600g/mol ($232 < MW_{\text{quinolone}} < 360$). Pour les fluoroquinolones hydrophobes (comme l'acide nalidixique ou la pefloxacin), elles passeraient par les mêmes porines après chélation à un ion magnésium. Une seconde voie d'entrée, directement au travers de la membrane externe est possible pour les composés plus hydrophobes⁷⁹.

3.2 Mécanismes de résistance

Deux mécanismes majeurs de résistance aux fluoroquinolones ont été identifiés à ce jour chez les bactéries à Gram négatif : la modification des cibles et la diminution d'accumulation intra-cytoplasmique d'antibiotique par efflux actifs ou diminution de la perméabilité membranaire. Plus rarement, la résistance aux fluoroquinolones peut être d'origine plasmidique par protection de la cible ou modification de l'antibiotique. Étudions pour chacun d'eux les modalités d'actions chez les bactéries à Gram négatif.

3.2.1 Modification des cibles

La modification des cibles a été le premier mécanisme de résistance aux fluoroquinolones identifiées chez les bactéries à Gram négatif. Cette modification est causée par une mutation des gènes codant pour les sous unités de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV.

Les mutations les plus fréquentes chez les bactéries à Gram négatif sont situées au niveau de la sous-unité A de l'ADN gyrase. Ces mutations impactant le gène *gyrA* sont pour la plupart situées dans une région du gène appelée Quinolone Resistance-Determining Region (QRDR). Cette dernière est localisée à proximité du site de fixation ADN- sous-unité A de l'enzyme (tyrosine 122), entre l'acide aminé 67 et 106. Les acides aminés en positions 83 et 87 sont particulièrement concernés. Le niveau de résistance conféré par une mutation dépend de la position de la substitution et de la nature de l'acide aminé substitué, ainsi que de la structure de la molécule concernée. Par exemple, la mutation la plus fréquente chez les bactéries Gram négatif se situe en position 83. Elle confère des résistances de haut niveau à la fois pour les quinolones et les fluoroquinolones, même si la résistance aux quinolones reste plus élevée que pour les molécules de générations plus récentes^{76,79}. Nous pouvons noter que certaines mutations ont été trouvées légèrement à l'extérieur du QRDR (acide aminé en position 51, 131, 139, 196)^{79,80}.

Une fois la sensibilité aux quinolones diminuée par une mutation du gène *gyrA*, de nouvelles mutations peuvent apparaître sur le même gène ou sur les gènes codant pour les autres sous-unités concernées. Ces mutations additionnelles ont pour effet d'augmenter le niveau de résistance s'ajoutant à l'effet de la première mutation⁷⁶.

Les modifications de la sous-unité B de l'ADN gyrase peuvent entraîner des résistances de bas niveaux quand elles sont caractérisées isolément de toutes autres mutations. Très peu rencontrées chez des souches isolées d'échantillons cliniques, les variations de sensibilité engendrées sont molécules et mutations dépendantes. Le QRDR de ce gène déterminé chez *Escherichia coli* se situe au niveau des acides aminés 426 et 447. Pour d'autres espèces bactériennes étudiées (*Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Proteus mirabilis*) des mutations peuvent être trouvées en dehors de cette zone, notamment au niveau des acides aminés 463 à 466⁷⁹⁻⁸¹.

La topoisomérase IV est une cible secondaire des quinolones pour les bactéries à Gram négatif. Les mutations de cette topoisomérase n'entraînent une résistance qu'en présence d'une mutation sur la sous-unité *gyrA*. Elles ont pour effet d'accroître significativement la résistance aux quinolones des souches mutées. Les deux sous-unités de l'enzyme peuvent être touchées. L'homologie entre les deux enzymes peut expliquer que la localisation des QRDR soit sensiblement la même pour *gyrA* et *parC* (acides aminés 56 à 108 sur ParC de *E. coli*), et *gyrB* et *parE* (acides aminés 416 à 464, une mutation décrite en 529 pour ParE)^{79,80}.

3.2.2 Diminution intra-cytoplasmique de la concentration

Étudions maintenant le mécanisme de résistance aux quinolones par défaut d'accumulation d'antibiotique intra-cytoplasmique. Nous avons vu précédemment que pour atteindre leurs cibles, les quinolones devaient pénétrer dans la cellule. Deux solutions ont émergé pour limiter la quantité d'antibiotique intra-cytoplasmique : soit l'entrée de l'antibiotique dans la cellule est limitée, soit l'antibiotique rentre dans la cellule mais est aussitôt évacué à l'extérieur de celle-ci.

Le premier mécanisme correspond à une résistance par défaut d'accumulation causé par une diminution de la perméabilité membranaire. Les mécanismes mis en jeu dans ce type de résistance sont peu connus. Nous pouvons cependant distinguer deux types d'anomalies des porines permettant l'entrée des fluoroquinolones dans la bactérie. D'une part, une anomalie qualitative par modification des porines. D'autre part, une anomalie quantitative par diminution de l'expression de ces mêmes porines.

Le second mécanisme implique des pompes à efflux actifs, très souvent exprimées de manière naturelle chez les bactéries. Elles ont plusieurs fonctions :

- l'extrusion de produits toxiques exogènes (métaux lourds, détergents, antibiotiques, etc.)
- l'extrusion de produits toxiques endogènes (métabolites)
- l'excrétion de toxines dans le milieu extérieur⁸².

Nous pouvons distinguer deux grands groupes de pompes divisées suivant la source d'énergie utilisée : les pompes de types ABC (ATP-binding cassette) et les pompes de type PMF (Proton Motive Force).

Les premières sont qualifiées de transporteurs primaires et utilisent comme source d'énergie l'ATP. Situées au niveau de la membrane plasmique, elles sont plus

souvent retrouvées chez les eucaryotes. Dans le domaine de la résistance aux antibiotiques chez les procaryotes, elles sont souvent spécifiques d'une classe d'antibiotique, même s'il existe un nombre limité de pompes dites MDR (MultiDrug Resistante) ABC, notamment chez les bactéries à Gram négatif⁸³.

Les secondes sont des transporteurs secondaires. Ces pompes sont ainsi qualifiées car elles associent diffusion facilitée de protons (H⁺, Na⁺) et transport actif de molécules. Elles sont divisées en quatre grands groupes :

- Les pompes de type MFS (Major Facilitator Superfamily) sont localisées au niveau de la membrane plasmique. Retrouvées fréquemment chez les bactéries à Gram positif et négatif, elles ne reconnaissent qu'un nombre limité de classes d'antibiotiques, et éventuellement les fluoroquinolones.
- Les pompes de types RND (Resistance Nodulation Division) sont exprimées par les bactéries à Gram négatif. Elles reconnaissent un large spectre de molécules dont les fluoroquinolones. Ce sont les seules pompes qui peuvent excréter directement les molécules dans le milieu extérieur grâce à leur architecture sous forme de complexe protéique tripartite. Ce complexe associe un transporteur de la membrane plasmique, un canal protéique périplasmique (MFP : Membrane Fusion Protein) et une porine de la membrane externe. Nous pouvons noter que ces trois éléments sont codés par un unique opéron.
- Les pompes MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) s'apparentent aux pompes MFS. Elles ont été décrites chez des bactéries à Gram positif et négatif, et sont capables d'extruder les fluoroquinolones. Elles se situent au niveau de la membrane plasmique.
- Les pompes SMR (Small multidrug Resistance) sont, comme leur nom l'indique, les plus petits transporteurs de ce groupe. Elles sont impliquées dans le transport des molécules cationiques lipophiles. Elles ne permettent donc pas le transport des fluoroquinolones^{83,84}.

Figure 11 : Représentation schématique des cinq familles de pompes d'efflux (dans Cattoir, Pathologie Biologie, 2004)

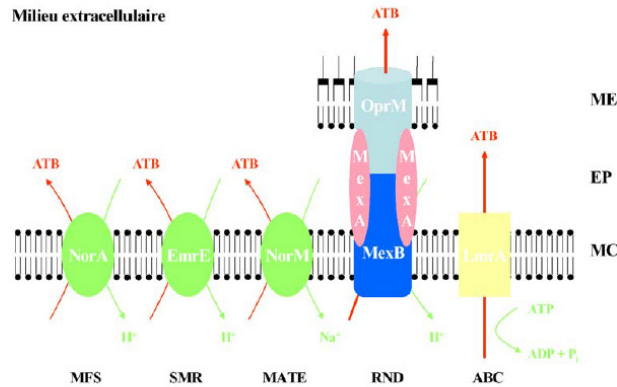


Fig. 1. Représentation schématique des cinq familles de pompes d'efflux [5,6,10,15]. MFS ou *major facilitator superfamily* (ex. NorA chez *Staphylococcus aureus*) ; SMR ou *small multidrug resistance* (ex. EmrE chez *Escherichia coli*) ; MATE ou *multidrug and toxic compound extrusion* (ex. NorM chez *Vibrio parahaemolyticus*) ; RND ou *resistance-nodulation cell division* (ex. MexB chez *Pseudomonas aeruginosa*) avec MexA (*membrane fusion protein*) et OprM (*outer membrane factor*) ; ABC ou *ATP-binding cassette* (ex. LmrA chez *Lactococcus lactis*). ME, EP : membrane externe et espace périplasmique des bactéries à Gram négatif ; MC : membrane cytoplasmique ; ATB : antibiotique substrat.

Ces transporteurs peuvent conférer chez les bactéries à Gram négatif, une résistance naturelle pour certaines classes d'antibiotiques si les pompes à efflux sont associées à un mécanisme d'imperméabilité membranaire.

La résistance peut également émerger après mutation des régions régulatrices ou des gènes codant pour des protéines régulatrices, engendrant une hyper-activation du système d'efflux. La complexité du système de régulation de ces pompes rend difficile l'étude génétique de ces dysfonctionnements⁷⁹.

3.2.3 Mécanismes de résistance plasmidiques

Le plasmide pMG252 a été découvert en 1994 dans une souche de *Klebsiella pneumoniae* isolée d'un prélèvement urinaire en Alabama, USA. Ce dernier portait des gènes codant pour des protéines conférant une résistance à différentes classes d'antibiotiques, dont *qnrA* pour les fluoroquinolones. Ce gène code pour une protéine de 218 acides aminés de la famille des pentapeptide-repeat⁸⁵, dont certains représentants proches (18 à 20% d'identité de séquence) montrent une structure tridimensionnelle et une répartition de charge proche de l'ADN. QnrA en interagissant avec les topoïsomérasés de type II inhiberait partiellement les interactions gyrase-ADN, réduisant ainsi les opportunités pour les fluoroquinolones de stabiliser les coupures introduites dans le chromosome bactérien. La présence de ces gènes confère une augmentation de résistance de 32 à 125 fois la CMI pour les fluoroquinolones et de 4 à 8 fois pour l'acide nalidixique. Des variants du gène *qnrA* ont plus tard été identifiés notamment chez *Salmonella antum* (*qnrS*), *Shewanella*

algae (*qnrA3-5*) ou *K. pneumoniae* (*qnrB*) portés par différents plasmides⁸⁶.

Les souches porteuses du plasmide pMG252 présentant une certaine hétérogénéité dans leur CMI vis-à-vis de la ciprofloxacine, un second mécanisme de résistance a été recherché sur les plasmides. Cette étude a permis la mise en évidence d'un nouveau variant d'une aminoside acétyl-transférase AAC(6')-Ib baptisée AAC(6')-Ib-cr. Cette dernière diffère par deux mutations ponctuelles affectant les acides aminés 102 et 179. Elle présente la capacité d'ajouter un groupement acétyl sur l'azote du substitut pipérazine greffé en position 7 du noyau. Ce mécanisme n'affecte que la ciprofloxacine et la norfloxacine, seules fluoroquinolones non substituées pour cette position. Il confère seul un niveau modeste de résistance (4 fois la CMI) pour ces molécules. Il est cependant très souvent couplé à la présence du gène *qnr*, leur association élevant la résistance de la souche à un niveau cliniquement significatif^{85,86}.

4 *F. tularensis* subsp. *holarctica* et antibiothérapie

4.1 Détermination de la sensibilité aux antibiotiques

4.1.1 Remarques préliminaires sur la méthodologie

De nombreuses études ont été menées visant à déterminer le profil de sensibilité aux antibiotiques des souches de *F. tularensis* subsp. *holarctica* par la détermination des Concentrations Minimales inhibitrices (CMI). Elles ont permis l'analyse de très nombreuses souches provenant de l'ensemble de l'hémisphère nord. Nous avons résumé les résultats de ces études dans le Tableau 1 : ***Revue des résistances aux antibiotiques chez F. tularensis subsp. holarctica dans la littérature*** pour différents représentants des molécules utilisées dans le traitement (ciprofloxacine, gentamicine, tétracycline, chloramphénicol) ainsi que pour l'érythromycine, la rifampicine et le linezolide^{38,71,87-98}.

Pour l'interprétation des résultats, nous nous référons aux recommandations de l'organisation mondiale de la santé (OMS). Ces dernières se basent sur les critères du Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) donnant les valeurs suivantes pour les limites de sensibilité : $\leq 0,5\text{mg/L}$ pour la ciprofloxacine, $4,0\text{mg/L}$ pour la gentamicine, la doxycycline et la tétracycline et $8,0\text{mg/L}$ pour le chloramphénicol.⁴³ Pour les autres molécules antibiotiques, nous utiliserons les valeurs limites du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)

2016⁹⁹.

Avant de présenter ces résultats, la comparaison de ces derniers nécessite la prise compte des biais potentiels suivants. Tout d'abord la plupart des souches étudiées ont été isolées dans des régions diverses de l'Hémisphère Nord. Or il existe des disparités régionales concernant la résistance antibiotique, comme pour la résistance à l'érythromycine pour les souches de *F. tularensis* subsp. *holarctica* d'Europe de l'Est²⁸.

Ensuite, il existe une grande disparité concernant les méthodes utilisées. Trois méthodes ont été utilisées pour la détermination des CMI : les dilutions en Agar, les microdilutions en milieu liquide et les bandelettes imprégnées d'antibiotiques. De plus, pour chaque méthode les milieux de culture utilisés sont très différents. Valade *et al.* et Origgi *et al.* ont montré que la modification de la technique et du milieu de culture pouvait influencer de manière importante les résultats en fonction des molécules testées^{38,97}.

Enfin, comme rappelé dans les recommandations de l'OMS, la lecture des CMI de *Francisella*, particulièrement par technique de micro dilutions en milieu liquide est délicate. Un effet de repousse résiduelle est présent, particulièrement pour les antibiotiques bactériostatiques⁴³. Ce phénomène de trainées rend difficile l'interprétation de la CMI et peut introduire un biais non négligeable dans l'évaluation de cette dernière.

4.1.2 Sensibilités antibiotiques chez *F. tularensis* subsp. *holarctica*

Les différentes études présentent un certain nombre de résultats convergents. L'ensemble des souches testées sont sensibles aux antibiotiques préconisés en thérapeutique, à savoir les fluoroquinolones, les aminosides et les tetracyclines (*cf.* Tableau 1 : *Revue des résistances aux antibiotiques chez F. tularensis subsp. holarctica dans la littérature*). La seule exception est la publication de García del Blanco *et al.* pour laquelle seule les fluoroquinolones et le chloramphénicol semblent présenter une activité. Les auteurs remettent en cause ces niveaux de sensibilité invoquant une diminution de ces valeurs liée au milieu de culture utilisé pour la méthode par microdilution en milieu liquide, le Müller Hinton (MH) II modifié (mMHII) par ajout d'ion calcium et magnésium, de glucose, d'IsoVitaleX™ et de pyrophosphate ferric⁸⁷. Cette analyse semble être confirmée par les résultats obtenus par Origgi *et al.* qui

montrent une augmentation de 8 et 16 fois la CMI pour la gentamicine et la tétracycline, respectivement. Cette augmentation est observée avec l'utilisation de milieu mMHII comparé au milieu recommandé par le CLSI : le Cation-Adjusted MH (CAMH) modifié par ajout de 2% de PolyViteX™ (mCAMH)³⁸.

Pour les autres antibiotiques testés, trois tendances se dessinent. La rifampicine présente des valeurs de CMI entre 0,094 et 2,0mg/L, correspondant à des souches sensibles ou de sensibilité intermédiaire. Cette variabilité observée peut être en partie liée à la modification de technique. En effet, Valade *et al.* ont montré une augmentation importante des valeurs de CMI pour la rifampicine quand la détermination était réalisée avec les bandelettes E-test comparé à la méthode de dilutions en agar⁹⁷.

La sensibilité au linézolide n'a été évaluée que dans 3 études, cet antibiotique étant traditionnellement utilisé pour traiter les infections causées par des bactéries à Gram positif. Seule la méthode par diffusion a été utilisée mais sur trois milieux de culture différents. Pour deux de ces études, les souches isolées en Hongrie et aux USA sont toutes résistantes avec des valeurs de CMI supérieures à 4,0mg/L^{71,93}. La troisième étude réalisée sur 39 souches isolées en Anatolie Centrale montre au contraire une sensibilité vis-à-vis du linézolide avec des valeurs de CMI allant de 0,5-2,0mg/L⁹⁸. L'origine de cette variabilité n'est pas connue et nécessite des investigations complémentaires. Elle pourrait par exemple être liée aux différents milieux de culture utilisés ou à une variabilité régionale.

Enfin, les différentes études ont pu mettre en évidence les résistances naturelles aux β -lactamines, céphalosporines, carbapénèmes et érythromycine. L'ensemble des souches sont résistantes aux β -lactamines. Concernant les céphalosporines et les carbapénèmes, la majorité des souches testées présentent des résistances de haut niveau. Seules les souches japonaises¹⁰⁰ et autrichiennes⁹⁵ testées présentent une hétérogénéité vis-à-vis des carbapénèmes et les souches japonaises vis-à-vis des céphalosporines¹⁰⁰. Pour l'érythromycine, deux populations de *F. tularensis* subsp. *holarctica* sont identifiées : l'une sensible ($0,094\text{mg/L} \leq \text{CMI}_{\text{Ery}} \leq 4,0\text{mg/L}$) et l'autre résistante à haut niveau ($\text{CMI}_{\text{Ery}} \geq 256\text{mg/L}$). La répartition géographique suit une ligne de séparation Est/Ouest passant par la péninsule scandinave, et la Suisse. La région Ouest, où les souches de biovar I et japonica, sensibles à l'érythromycine, sont endémiques des pays de l'hémisphère Nord allant du Japon à la France ; et la région Est où les souches de biovar II

résistantes à l'érythromycine sont présentes, inclut les pays de l'hémisphère Nord allant de la Suisse à la Russie. Une « zone grise » où les deux biovars cohabitent peut être identifiée, cette dernière incluant les pays à l'Est de la France, jusqu'à la Turquie.

4.2 Mécanismes de résistance identifiés chez *F. tularensis*

Comme nous l'avons vu précédemment, *F. tularensis* présente certaines résistances naturelles vis-à-vis de certaines classes d'antibiotiques. Certains mécanismes à l'origine de ces phénotypes ont été étudiés.

La résistance aux β -lactamines présente chez l'ensemble des souches de *F. tularensis* subsp. *holarctica* testées a des origines multiples. Deux au moins ont été identifiées. L'une est liée à la production d'une β -lactamase constitutive de classe A : FTU-1. Cet enzyme identifié chez l'ensemble des *Francisella* présente une activité importante sur les pénicillines avec restitution partielle de l'activité en association avec un inhibiteur de β -lactamase. L'activité de cet enzyme est relativement faible sur les céphalosporines et les carbapénèmes et n'impacte pas ou peu la résistance d'une souche d'*E. coli* l'exprimant¹⁰¹. L'autre mécanisme de résistance associé à la résistance aux β -lactamines est une pompe d'efflux de type RND. L'inactivation de ce système entraîne chez le mutant nul un phénotype de sensibilité vis-à-vis des β -lactamines testées (pénicillines et céphalosporines). Notons que ce système d'efflux est également impliqué dans l'export d'autres antibiotiques et molécules toxiques ; ainsi que dans la capacité d'infection¹⁰².

La résistance à l'érythromycine observée chez les souches de biovar II de *F. tularensis* subsp. *holarctica* n'a pas été formellement identifiée. Des comparaisons génomiques ont montré la présence d'une mutation sur le gène *rrl* codant pour l'ARN ribosomal 23S. Cette mutation (2059A>C) est bien connue pour altérer l'interaction des macrolides avec la sous-unité ribosomale 50S, cible de cette classe d'antibiotiques¹⁰³.

Enfin, une étude bioinformatique ciblant les systèmes d'efflux ABC de *F. tularensis* a mis en évidence deux systèmes pouvant potentiellement être impliqués dans l'export de molécules antibiotiques¹⁰⁴.

Tableau 1 : Revue des résistances aux antibiotiques chez *F. tularensis* subsp. *holarctica* dans la littérature

Publication	Souches de <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>			Détermination de la CMI		Intervalle des valeurs de CMI (mg/L)						
	Env/Hum	Date	Région	Méthode	Milieu Culture	CIP	GEN	TET	ERY	CHL	LNZ	RIF
García del Blanco et al.	34/8	1997-1999	Espagne	micro dilution	mMH ^b	0,06-0,25	1,0-8,0	4,0-64	2,0->4,0	≤8,0	NT	NT
Georgi et al.	53/16	2012 ^a	Hémisphère Nord	micro dilution	mCAMH ^c	≤0,031-0,125	≤0,25-0,5	≤0,125-2,0	1,0-≥32	1,0-4,0	NT	≤0,5-2,0
Gestin et al.	4/3	2010 ^a	France	micro dilution	MH II + 2% PolyViteX TM	0,06-0,125	0,25-1,0	0,25	2,0-4,0	NT	NT	0,125-1,0
Hotta et al.	7/27	1926-1989	Japon	Diffusion	Chocolate II TM	0,003-0,023	0,023-0,5	0,094-1,5	0,094-1,5	NT	NT	NT
Ikäheimo et al.	18/20	2000 ^a	Finland	Diffusion	Bacto TM heart agar + 2%SB ^d	0,008-0,023	0,38-1,5	0,094-0,5	NT	0,125-0,5	NT	0,094-0,38
Johansson et al.	16	1996-2001	USA	Diffusion	MH II + 1% isovitalax	0,016-0,064	0,016-0,125	0,125-2,0	0,125-1,0	0,25-1,0	4,0-16	0,125-1,0
Kiliç et al.	40/210	2009-2012	Turquie	Diffusion	CHAB ^e	0,004-0,023	0,094-0,38	0,094-0,5	1-256	0,094-0,75	NT	0,125-1,0
Kreizinger et al.	29/0	2003-2010	Hongrie	Diffusion	Francis Agar modifiée	0,047 ^g	0,75 ^g	0,5 ^g	>256 ^g	1,5 ^g	32 ^g	1,0 ^g
Marinov et al.	7/1	1998-2005	Bulgarie	Diffusion	GCBA ^f	0,023-0,064	0,023-0,25	NT	≤2,0->256	NT	NT	NT
Origgi et al.	17/7	1996-2013	Suisse	micro dilution	mCAMH	≤0,06	≤0,12-0,25	≤0,25	2,0-≥32	≤2,0	NT	NT
Tomaso et al.	47/3	1992-1998	Autriche Est	Diffusion	Bacto TM heart agar + 10%SB	0,003-0,125	0,094-2,0	0,38-3,0	8,0-≥256	0,023-2,0	NT	0,25-2
Urich et al.	77	1974-2005	USA-Canada	micro dilution	mCAMH	0,004-0,06	0,03-0,5	0,25-4,0	0,5-4,0	0,5-4,0	NT	NT
Valade et al.	68/3	1996-2005	France	Agar Dilution	MH II	0,015-0,03	0,03-0,5	0,125-1,0	NT	0,25-2,0	NT	0,125-0,25
Yesilyurt et al.	0/39	2009-2010	Anatolie Centrale	Diffusion	GCBA + 9% SB	0,008-0,016	0,094-0,25	0,125-0,5	>256	0,094-0,25	0,5-2,0	0,25-1,0

^a : année de publication, quand les années d'isolement des souches n'étaient pas disponible, ^b : Muller Hinton modifié, ^c : modified cation adjusted muller hinton, ^d : sang de mouton, ^e : cystein heart agar with chocolatized 9% sheep blood, ^f : glucose cystein blood agar, ^g : CMI⁹⁰, CIP : ciprofloxacine, GEN : gentamicine, TET : tétracycline ou doxycycline, ERY : érythromycine, CHL : Chloramphénicol, LNZ : linézolide, RIF : rifampicine.

5 Tularémie et traitement antibiotique

5.1 Evaluation in cellulo et in vivo de l'antibiothérapie

F. tularensis étant une bactérie intracellulaire facultative, la question de la biodisponibilité des molécules antibiotiques dans ce compartiment est essentielle. L'activité *in cellulo* de *F. tularensis* subsp. *holarctica* a été évaluée sur une lignée de macrophage-like murine. Cette étude a confirmé l'absence d'activité pour les pénicillines, la clarythromycine et le thiamphénicol. Le ceftriaxone est inactif à faible dose (10µg/mL) et bactériostatique à dose plus importante (100µg/mL), tout comme le cotrimoxazol et l'érythromycine. Les autres molécules testées permettent la diminution de la charge bactérienne intracellulaire. Les aminosides testés (amikacine, streptomycine et gentamicine) ont une activité bactéricide retardée (72h) et dose dépendante. La telithromycine présente un profil similaire avec une action maximale mesurée à 72 heures. La doxycycline et les fluoroquinolones (ofloxacine et ciprofloxacine) présentent l'action la plus rapide et la plus intense avec une diminution de la charge bactérienne supérieure à 2,5log, stabilisée après 48 heures⁷².

Ces résultats obtenus *in cellulo* sont corrélés avec les expérimentations réalisées *in vivo*. Très tôt, l'efficacité thérapeutique et prophylactique des antibiotiques historiques (streptomycine, doxycycline, gentamicine, chloramphénicol) a été étudiée sur le modèle animal et humain^{105,106}. Ces résultats combinés à l'expérience de ces traitements en clinique humaine ont montré : 1/ l'efficacité de la streptomycine, considérée comme le traitement de choix ; 2/ le positionnement de la gentamicine comme alternative thérapeutique, cette dernière présentant une action retardée mais des taux de rechute faibles ; 3/ l'alternative des molécules bactériostatiques (doxycycline et chloramphénicol) avec des durées de traitement plus longues et des rechutes plus nombreuses^{45,105}.

Les fluoroquinolones ont suscité un intérêt dans le traitement de la tularémie de par leur action sur les bactéries à Gram négatif, leur bonne pénétration intracellulaire et leur facilité d'utilisation. De nombreuses études ont été réalisées avec la sous espèce *tularensis* (souche SCHU-S4) sur les modèles murins¹⁰⁷⁻¹¹⁰ et simiens¹¹¹. Elles ont toutes mises en évidence une bonne efficacité *in vivo* dépendante de la dose d'antibiotique, du délai d'instauration et de la durée du

traitement. De plus, une meilleure efficacité des fluoroquinolones de 3^{ème} (gatifloxacin) et 4^{ème} génération (moxifloxacin) a été montrée, comparé à l'action de la ciprofloxacine (2^{ème} génération)⁷³ sur un modèle murin infecté par voie aérienne¹¹⁰ et transcutanée¹⁰⁹.

Ces données concordent avec celles obtenues par Rotem *et al.* sur un modèle d'infection intranasale murin avec la souche vaccinale de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS. Cette étude compare l'action de la ciprofloxacine et de la doxycycline par la mise en place d'un traitement 72 heures post-infections (PI) en mesurant la charge bactérienne intra-hépatique et intra-pulmonaire. Les résultats obtenus sont similaires pour les deux organes. Rotem observe une très forte augmentation de la charge bactérienne jusqu'à la mise en place du traitement. Dès l'administration, la charge bactérienne diminue très fortement jusqu'à devenir indétectable à 10 jours PI. Notons que la décroissance est plus rapide dans le cas du traitement avec la ciprofloxacine et que la charge bactérienne reste indétectable jusqu'à 35 jours PI. Sur ce point, les animaux traités avec la doxycycline montrent une augmentation de la charge bactérienne de 10³ et 10⁴ au niveau hépatique et pulmonaire, respectivement, 19 jours PI (2 jours après l'arrêt du traitement). L'ensemble des animaux survivent à cette rechute, la charge bactérienne diminuant spontanément 6 jours après la réémergence de la bactérie. Ce phénomène de survie, non observé avec la sous-espèce *tularensis* tiens probablement à l'atténuation de la virulence de la souche vaccinale¹¹².

5.2 Tularémie et échecs thérapeutiques

Les nombreux rapports décrivant la prise en charge médicale de cas cliniques épidémiques ou sporadiques montrent des données convergentes avec les résultats obtenus *in vitro*, *in cellulo* et *in vivo* précédemment décrits. Malgré l'efficacité des traitements utilisant les aminosides, les tetracyclines et les fluoroquinolones, les taux de récurrence et d'échecs thérapeutiques chez les patients atteints de tularémie sont particulièrement élevés, variant entre 20 à 40%. Ils sont très souvent associés aux formes ganglionnaires, ulcéro-ganglionnaires, oculo-ganglionnaires ou oropharyngées ; se présentant sous la forme d'adénopathies chroniques fluctuantes. Dans ces cas d'échec, la plupart des études rapporte la mise en place d'une antibiothérapie alternative, associée au drainage du ganglion aboutissant à la guérison des patients^{58,60,113-116}.

Les causes associées à ces récurrences varient d'une étude à l'autre, certaines sont récurrentes. Ainsi, le facteur le plus souvent incriminé dans l'échec de l'antibiothérapie est le délai de mise en place du traitement après l'apparition des symptômes. Ce délai critique d'instauration du traitement varie entre 14 et 21 jours^{60,114-116}. Ces observations sont corrélées avec celles réalisées sur le modèle murin^{108,112}. Deux études ne font toutefois pas état de cette caractéristique. La première relate des temps de diagnostic moyen bien supérieurs aux délais critiques précédemment observés (47,5+/-31jours)¹¹³. La seconde n'étudie pas ce paramètre. Elle fait cependant état de la chronicité et de la suppuration de l'adénopathie comme facteur de rechute, ces symptômes apparaissant en général sur des infections plus anciennes⁵⁸.

Le second facteur influençant la rechute présent dans plusieurs publications indépendantes concerne la nature de l'antibiothérapie. L'utilisation des tétracyclines est associée à un taux de rechute supérieur, comparé aux aminosides et fluoroquinolones^{113,115,116}. Ce constat pourrait trouver une explication dans le type d'activité de ces différentes classes d'antibiotiques. En effet, les tétracyclines sont bactériostatiques alors que les aminosides et les fluoroquinolones sont bactéricides *in cellulo*⁷².

Enfin, plusieurs facteurs de récurrence et d'échecs thérapeutiques ont été identifiés isolément. Nous pouvons citer le sexe¹¹⁵, l'élévation du niveau de protéine C-réactive (CRP) plasmatique et de la vitesse de sédimentation (VS)⁶⁰, et la posologie des antibiotiques. Ce dernier facteur a été évalué pour la ciprofloxacine. Une dose quotidienne de 1500mg s'est montrée plus efficace qu'une dose de 1000mg. La prolongation de la durée de ce traitement de 14 à 21 jours n'a pas montré d'amélioration du taux d'échec⁶⁰.

TRAVAUX SCIENTIFIQUES

1 Introduction

Les travaux réalisés avaient pour objectifs l'étude de la ou des causes à l'origine des rechutes et échecs thérapeutiques chez les patients atteints de tularémie. Pour expliquer ces taux élevés de rechute, nous avons émis l'hypothèse de l'émergence au cours du traitement de clones résistants aux antibiotiques. Le choix s'est porté pour notre étude sur la classe des fluoroquinolones. Leur utilisation dans le traitement de la tularémie est très répandue pour les formes de sévérité moyenne à modérées. Ces formes sont majoritaires en Europe^{113,114,116} et en France^{58,61}, zone d'endémie de la sous-espèce *holarctica*, et sont associées aux échecs thérapeutiques observés (cf. paragraphe 5.2).

De plus, le mécanisme principal de résistance émerge consécutivement à une mutation des gènes codant pour les topoïsomérases de type II⁷⁶, contrairement à la résistance aux tétracyclines, majoritairement médiée par des éléments plasmidiques¹¹⁷. Ce mécanisme de résistance a été identifié à partir de souches cliniques chez de nombreuses bactéries à Gram-négatif (*E. coli*, *S. enterica*⁸⁰, *P. aeruginosa*⁸¹) ; mais aussi chez certaines espèces intracellulaires (*L. pneumophila*¹¹⁸, *M. tuberculosis*¹¹⁹, *Bartonella sp.*, *Ehrlichia chaffeensis* et *Tropherima whipplei*¹⁰³). D'autres mutants résistants aux fluoroquinolones par modification des cibles ont été sélectionnés *in vitro* notamment chez *Legionella pneumophila*¹²⁰, *Coxiella burnetii*, *Bartonella bacilliformis*, mais aussi chez *F. tularensis* subsp. *holarctica*^{103,121} et subsp. *tularensis*¹²².

La souche résistante de *F. tularensis* subsp. *holarctica* porte une mutation 248C>T du gène *gyrA* entraînant la substitution de la thréonine en position 83 par une isoleucine. Aucune donnée concernant le niveau de résistance de cette souche n'est apportée par cette étude¹²¹.

La souche résistante de *F. tularensis* subsp. *tularensis* a été obtenue à partir de la souche SCHU-S4 par repiquages successifs en milieu liquide enrichi en présence de concentrations croissantes de ciprofloxacine. Après séquençage des gènes codant pour les topoïsomérases de type II, la même mutation que dans l'étude précédente a été identifiée associée à une seconde mutation dans le QRDR du gène *gyrA* (259G>T) modifiant l'acide aminé en position 87, et à une délétion de 5 bases en position 653-657 du gène *parE*. La CMI exacte n'est pas précisée, mais la souche

utilisée pour l'étude a été sélectionnée sur un milieu contenant 64mg/L de ciprofloxacine¹²². Aucun autre mécanisme de résistance n'a été mis en évidence pour ces différents clones.

Nous nous proposons pour étudier cette hypothèse de réaliser une expérience d'évolution *in vitro* sur le modèle de celle déjà réalisée chez *F. tularensis* subsp. *holartctica* pour la résistance aux macrolides⁸⁹. Ces lignées d'évolution sont propagées à partir d'un clone unique, mis en présence d'une gamme de raison 2 de 8 concentrations croissantes de l'antibiotique. Pour chaque étape de sélection, le milieu montrant après incubation un trouble proche du témoin positif de culture sera propagé dans une nouvelle gamme de concentrations croissantes d'antibiotique. Dans notre modèle expérimental, 3 souches de *Francisella* de virulence diminuée pour l'homme sont utilisées pour initier les lignées : *F. tularensis* subsp. *holartctica* LVS, *F. novicida* CIP56.12 et *F. philomiragia* ATCC25015. Pour chaque espèce, 4 lignées sont propagées de manière indépendante en présence de ciprofloxacine. Ceci nous permet d'apprécier la variabilité intra- et inter-espèces pour les chemins évolutifs empruntés vers un haut niveau de résistance antibiotique.

Cette procédure nous permet de conserver à chaque étape du processus évolutif des populations « fossiles » qui pourront être revivifiées, permettant ainsi leur étude génotypique et phénotypique. Dans un premier temps, l'aspect génotypique est appréhendé par l'étude des mutations apparues sur les gènes codant pour les topoïsomérasés de type II, cibles principales des fluoroquinolones. L'aspect phénotypique est quant à lui étudié par le niveau de résistance à différentes fluoroquinolones (ciprofloxacine, lévofloxacine et moxifloxacine), aux autres classes d'antibiotique utilisées en thérapeutique (doxycycline et gentamicine), et à l'érythromycine. Cette approche nous permet d'apprécier l'impact des différentes mutations observées sur le niveau de résistance à la ciprofloxacine, et d'évaluer les résistances croisées intra- et inter-familles d'antibiotiques résultant des mécanismes de résistance apparus au cours de l'évolution. L'objectif serait de mettre en évidence une ou un ensemble de cibles génomiques prédictives d'un niveau de résistance ayant une expression clinique. Nous pourrions ainsi mettre au point un outil moléculaire permettant la caractérisation des souches bactériennes isolées de prélèvements cliniques. Un tel outil permettrait également l'analyse directe d'échantillons quand l'isolement de la souche bactérienne n'est pas possible,

situation fréquemment rencontrée en cas d'échec thérapeutique.

2 Evolution vers un haut niveau de résistance aux fluoroquinolones chez les bactéries du genre *Francisella*

2.1 Résumé

2.1.1 Objectifs

Comme nous l'avons précédemment mis en évidence, la littérature scientifique concernant le traitement de la tularémie contient de nombreux exemples d'échecs thérapeutiques ou de rechutes après arrêt des antibiotiques. Ces échecs et rechutes, observés pour les différentes classes d'antibiotiques utilisées dans le traitement de cette zoonose, sont majoritairement associés aux formes ganglionnaires de la maladie avec mise en place tardive d'un traitement adapté. De plus, les patients ayant reçu des antibiotiques associés à une action bactériostatique sur *F. tularensis* (tétracyclines et chloramphénicol) présentent un taux de récurrence supérieur aux patients traités avec des antibiotiques bactéricides (aminosides et fluoroquinolones).

Aujourd'hui, les fluoroquinolones sont le traitement de première ligne pour les formes de gravité moyenne à modérée de tularémie, incluant la plupart des formes ganglionnaires⁴³. L'émergence de la résistance à cette classe d'antibiotique chez les bactéries à Gram négatif, a été mise en évidence dans des modèles *in vitro*¹²⁰ et *in vivo*. Elle est principalement liée à la modification des topoisomérases de type II, cibles des fluoroquinolones. De telles mutations ont été mises en évidence chez *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU4¹²² et subsp. *holarctica*¹²¹ sur des clones sélectionnés *in vitro* sans toutefois établir un lien entre ces mutations et le niveau de résistance aux fluoroquinolones.

La présente étude a pour objet la sélection et l'étude de mutants de *Francisella* résistants à haut niveau aux fluoroquinolones à partir de lignées d'évolutions. Ces dernières, initiées *in vitro* à partir de 3 souches de différentes espèces de *Francisella* non pathogènes pour l'homme permettront l'étude phénotypique et génétique de clones bactériens sélectionnés au cours et au terme de ce processus évolutif. Ces analyses sont respectivement réalisées par l'évaluation du niveau de résistance vis-à-vis de différents antibiotiques et la détermination des

mutations apparues sur les gènes codant pour les topoïsomérasés de type II. L'ensemble de ces données, croisé à certaines données bibliographiques et études bioinformatiques a permis la description du phénomène évolutif pour les bactéries du genre *Francisella* et l'évaluation de l'impact des mutations observées sur le niveau de résistance. Enfin, la comparaison des résultats obtenus pour les trois espèces de *Francisella* ont permis d'établir la pertinence des modèles *F. novicida* et *F. philomiragia* comparativement à la souche vaccinale *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS pour l'observation de l'acquisition de la résistance aux fluoroquinolones.

2.1.2 Matériels et méthodes

La sélection de clones est initiée à partir des 3 souches de référence *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (FthLVS), *F. novicida* CIP56.12 (Fno), *F. philomiragia* ATCC25015 (Fph). Quatre lignées d'évolution indépendantes ont été propagées à partir de ces 3 souches. Une lignée issue de Fth s'est éteinte au cours des repiquages successifs.

Chaque étape de ce processus évolutif est réalisée par la mise en présence en milieu de culture liquide de suspension bactérienne avec des concentrations croissantes de ciprofloxacine. Après 3 à 5 jours d'incubation à 37°C dans une atmosphère enrichie avec 5% de CO₂, le puit présentant un trouble avec la concentration en antibiotique la plus élevée est prélevé. Son contenu est en partie congelé pour conservation et en partie repiqué pour une nouvelle étape de sélection dans une nouvelle gamme de concentration croissante de ciprofloxacine. Le premier puit ne présentant pas de pousse visible est désigné comme la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la population (CMIp). 14 étapes ont été ainsi réalisées pour chacune des lignées.

La sélection des clones est réalisée par isolement des suspensions bactériennes précédemment stockées sur milieu solide, repiquage d'une colonie isolée après 3 à 5 jours d'incubation pour enrichissement. Cette procédure a été répétée 52 fois, un clone ayant été isolé à chaque étape finale des lignées et 41 souches isolées au cours de l'évolution des 3 lignées issus de Fth.

Chacun des clones sélectionnés est caractérisés phénotypiquement et génétiquement. L'aspect phénotypique est étudié par la détermination de la CMI pour la ciprofloxacine, l'antibiotique utilisé pour la sélection. Pour les 11 clones isolés à la dernière étape de sélection des différentes lignées, cette étude est complétée par la

détermination des CMI vis-à-vis de la lévofloxacine et de la moxifloxacine, de la gentamicine, de la doxycycline et de l'érythromycine.

L'aspect génétique est abordé par la recherche de mutations sur les gènes codant pour les topoïsomérasés de type II : *gyrA*, *gyrB*, *parC* et *parE*. Cette dernière est réalisée par séquençage de ces gènes pour les souches isolées lors des étapes finales de l'ensemble des lignées. Chacune des mutations ainsi identifiées ont été localisées sur un modèle connu de complexe topoïsomérase-ADN-antibiotique afin d'évaluer par sa position et la nature de ce changement, l'impact probable sur la résistance antibiotique.

Enfin, les mutations mises en évidence pour les lignées issues de Fth ont été spécifiquement recherchées sur les clones sélectionnés dans les étapes précoces des lignées d'évolution, afin de mettre en évidence l'ordre d'apparition des mutations et un potentiel polymorphisme des populations bactériennes évoluées.

2.1.3 Résultats

Les trois souches parentales utilisées pour initier les lignées d'évolution présentent toutes des niveaux de CMI bas pour la ciprofloxacine (0,016-0,064mg/L). Pour l'ensemble des lignées, le niveau de CMIp à l'étape finale de sélection est considérablement augmenté comparé au niveau de sensibilité des souches parentales (entre 500 et 4000 fois la CMI de départ). Ce très haut niveau de résistance est atteint par une augmentation progressive de la CMIp au cours des 14 étapes d'évolution (2 à 4-fois par étape). Toutefois, nous avons observé pour les lignées issues de Fth et Fph, la présence d'une augmentation plus importante de la CMIp (8 à 32 fois/étape) pour une étape se situant dans la première moitié du processus évolutif.

L'étude phénotypique des mutants isolés aux étapes finales d'évolution a montré pour l'ensemble des lignées l'émergence de clones présentant un très haut niveau de résistance à la ciprofloxacine, la fluoroquinolone de 2^{ème} génération utilisée pour la génération des lignées (500 à 2000 fois la CMI des souches parentales). Celle-ci est systématiquement accompagnée d'une résistance croisée d'un niveau similaire aux autres fluoroquinolones testées, la lévofloxacine et la moxifloxacine appartenant à la 3^{ème} et 4^{ème} génération de fluoroquinolone, respectivement. Une augmentation beaucoup plus modérée du niveau de résistance de la doxycycline est également observée pour l'ensemble de ces souches (2 à 8 fois

la CMI de départ).

Les comportements des clones évolués vis-à-vis des autres classes d'antibiotiques testées sont différents en fonction des espèces de *Francisella*. Là où les mutants terminaux issus de Fth ne montrent pas de modification des niveaux de résistance pour la gentamicine et l'érythromycine, ceux issus de Fno et Fph présentent de fortes variations. Pour 7 souches sur 8, nous pouvons observer une augmentation de 2 à >16 fois pour la CMI de l'érythromycine ; et pour une souche de Fno une augmentation de 4 fois la CMI de la gentamicine. Ces variations ainsi que celles observées pour la doxycycline laissent supposer la présence de mécanismes de résistance transversaux tels que les pompes à efflux dites « multidrug ». Par ailleurs, 7 souches sur 8 présentent une surprenante augmentation de la sensibilité à la gentamicine allant de 2 à 32 fois la CMI de la souche parentale. Un tel phénomène a été observé par Mates *et al.* chez *Staphylococcus aureus* suite à une modification du potentiel électrique transmembranaire induite dans ce cas par une modification de la composition en oxygène de l'atmosphère d'incubation, entraînant une diminution quasi complète du passage vers le compartiment intracellulaire de la gentamicine¹²³.

L'étude génotypique des clones finaux a permis la mise en évidence de nombreuses mutations sur les gènes codant pour les topoisomérases de type II. L'ensemble des clones terminaux porte une modification sur le gène *gyrA*, codant pour une sous unité de l'ADN gyrase. Sur ces 11 clones, 9 présentent la ou les mutations sur les acides aminés en position 83 et/ou 87. La mutation de ces acides aminés, localisés dans la QRDR, est bien connue chez les bactéries à Gram négatif pour induire une résistance de niveau important pour l'acide aminé en position 83 (4 à 32 fois la CMI) et plus modérée pour celui en position 87 (1 à 4 fois la CMI). Ces derniers sont proches du site d'interaction de l'antibiotique avec l'enzyme. Trois mutations localisées à l'extérieur du QRDR ont été mise en évidence sur des clones issus de Fno et Fph. Deux correspondent à des délétions dans le cadre de lecture sur les acides aminés 523 et 524 d'une part et 570 d'autre part. Localisés à une grande distance du site actif de l'enzyme et d'interaction avec les fluoroquinolones, leurs implication dans l'émergence de la résistance est peu probable. La 3^{ème} et dernière mutation découverte sur le gène *gyrA*, est située au niveau de l'acide aminé en position 43. Son implication dans la résistance antibiotique est beaucoup plus probable. Etant localisée dans une portion très conservée de la protéine, son

positionnement sur le modèle protéique est proche du site d'interaction Enzyme-ADN-antibiotique.

Les mutations identifiées pour le gène codant pour la seconde sous unité formant l'ADN gyrase, *gyrB* sont les secondes plus fréquentes. Elles sont présentes chez 8 clones sur 11. Les mutations impliquant les acides aminés 464 à 466 présents sur 2 souches de Fth et 1 souche de Fno, proche de l'antibiotique sont bien connues chez les bactéries à Gram négatif. Plus surprenant, une mutation inhabituelle présente sur l'ensemble des clones issus de Fph affectant l'acide aminé en position 747 partage la même proximité du site actif suggérant son implication dans la résistance. Les 2 dernières mutations observées pour ce gène impliquent des acides aminés en surface de la protéine (486-487) ou hors du modèle protéique (86), laissant supposer l'absence d'impact sur la résistance de ces clones.

Nous avons enfin observé seulement 4 clones portant des mutations sur les gènes codant pour les composants de la topoisomérase IV, *parC* et *parE* : les 3 clones issus de Fth et 1 mutant issu de Fno. Une de ces mutations impacte l'acide aminé en position 82 du gène *parC*, proche du site d'interaction Enzyme-ADN-Fluoroquinolone. Une autre résulte par l'introduction d'un codon stop précoce en une protéine ParC tronquée à l'acide aminé 453, compromettant très probablement le fonctionnement de l'enzyme. Enfin, les 2 mutations mises en évidence sur le gène *parE* impactant les acides aminés en position 472 et 488 (localisés sur la périphérie de la protéine) n'ont certainement pas d'implication dans le phénomène de résistance antibiotique.

Pour finir, l'étude génétique et phénotypique de clones sélectionnés dans les étapes intermédiaires d'évolution sur les lignées issues de Fth a permis l'identification de quatre tendances.

Premièrement, l'évolution vers un haut niveau de résistance se fait progressivement. Cette augmentation progressive de la résistance antibiotique est concomitante à l'accumulation de mutation sur les gènes des topoisomérases de type II.

Deuxièmement, les mutations sur les gènes codant pour les protéines constituant l'ADN gyrase tiennent une place essentielle dans le processus évolutif. D'une part leur apparition est précoce dans le processus évolutif, dans les trois premières étapes de sélection ; d'autre part, tous les mutants présentant un niveau de résistance cliniquement significatif portent au moins une mutation sur les acides aminés en position 83 et 87 de *gyrA*, cette dernière émergeant dans le présent

modèle dans les 4 premières étapes de sélection.

Troisièmement, quand plusieurs clones ont été sélectionnés dans une même étape, d'importants polymorphismes génétiques et phénotypiques ont été observés.

Quatrièmement, certaines augmentations de CMI à la ciprofloxacine ne pouvaient pas être corrélées à l'apparition de mutations sur les régions des gènes précédemment mises en évidence, suggérant la présence dans les lignées issues de *Fth* de mécanismes annexes de résistance aux fluoroquinolones.

2.1.4 Conclusion

En conclusion, cette étude a confirmé la capacité pour les bactéries du genre *Francisella* à acquérir un très haut niveau de résistance aux fluoroquinolones. Les processus évolutifs pour les différentes espèces présentent d'importantes différences pointant l'incapacité d'extrapoler les conclusions observées d'un modèle à l'autre. Ces différences concernent notamment la modification de la sensibilité vis-à-vis des différentes classes d'antibiotiques testés et la nature des mutations observées sur les gènes codant pour les topoisomérases de type II.

Nous avons pu également montrer l'importance des mutations de *gyrA*, notamment celles impactant les acides aminés en position 83 et 87 à la fois dans l'émergence de la résistance et dans l'acquisition d'un niveau cliniquement significatif pour les lignées issues de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS. Ce travail a également permis la mise en évidence de nouvelles mutations présentant un intérêt dans l'acquisition de la résistance aux fluoroquinolones de par leur proximité avec le site d'interaction Enzyme-ADN-Antibiotique. Enfin, de nombreux éléments pointent la présence de mécanismes de résistance additionnels, autres que la modification des cibles, pour l'ensemble des espèces testés.

2.2 Article

Journal of Antimicrobial Chemotherapy Advance Access published August 20, 2013

J Antimicrob Chemother
doi:10.1093/jac/dkt321

Journal of
Antimicrobial
Chemotherapy

Evolution toward high-level fluoroquinolone resistance in *Francisella* species

Vivien Sutera¹⁻³, Maxime Levert^{2,3}, Wim Pascal Burmeister⁴, Dominique Schneider^{2,3} and Max Maurin^{1-3*}

¹Centre Hospitalier Universitaire Grenoble, CS10217, 38043 Grenoble cedex 9, France; ²Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Micro-organismes, Université Joseph Fourier-Grenoble, BP 170, F-38042 Grenoble cedex 9, France; ³CNRS UMR 5163, F-38042 Grenoble cedex 9, France; ⁴Université Joseph Fourier-Grenoble/EMBL/CNRS UMI 3265—Unit for Virus Host-Cell Interactions, 6 rue Jules Horowitz, 38042 Grenoble cedex, France

*Corresponding author. Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, Université Joseph Fourier, CS 10217, 38043 Grenoble cedex 9, France. Tel: +33-4-76-76-54-79; Fax: +33-4-76-76-52-28; E-mail: mmaurin@chu-grenoble.fr

Received 23 April 2013; returned 3 June 2013; revised 9 July 2013; accepted 16 July 2013

Objectives: *Francisella tularensis*, a CDC class A potential bioterrorism agent, is a Gram-negative bacterium responsible for tularaemia. Understanding the mechanisms of resistance to antibiotics used as first-line treatment is of major security relevance.

Methods: We propagated the three parental reference strains *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* live vaccine strain, *Francisella novicida* and *Francisella philomiragia* with increasing concentrations of ciprofloxacin, a fluoroquinolone used as curative and prophylactic treatment for tularaemia. This evolution procedure provided us with high-level ciprofloxacin-resistant mutants and all evolutionary intermediates towards high-level resistance. We determined the resistance levels to other fluoroquinolones (levofloxacin and moxifloxacin) and other antibiotic families (aminoglycosides, tetracyclines and macrolides) and characterized the genetic changes in the fluoroquinolone target genes encoding DNA gyrase and topoisomerase IV.

Results: All high-level resistant mutants shared cross-resistance to the tested fluoroquinolones, while some also revealed striking levels of cross-resistance to other clinically relevant antibiotic classes. High-level resistant mutants carried one to three mutations, including some not previously reported. We mapped all mutations onto known topoisomerase three-dimensional structures. Along the pathways towards high-level resistance, we identified complex evolutionary trajectories including polymorphic states and additional resistance mechanisms likely to be associated with efflux processes.

Conclusions: Our data demonstrated the efficiency and speed of *in vitro* production of mutants highly resistant to fluoroquinolones in *Francisella* species. They emphasize the urgent need to identify all antibiotic resistance mechanisms in these species, develop molecular tools for their detection and design new therapeutic alternatives for tularaemia.

Keywords: tularaemia, ciprofloxacin, type II topoisomerase, DNA gyrase, topoisomerase IV, antibiotic resistance

Introduction

Francisella tularensis is a Gram-negative facultative intracellular bacterium, which causes the life-threatening zoonosis tularaemia.¹ Two subspecies are responsible for human tularaemia: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (type A) in North America² and *F. tularensis* subsp. *holarctica* (type B) in the entire northern hemisphere. The latter subspecies includes the two biovars: I (naturally susceptible to macrolides) in Western Europe and North America; and II (naturally resistant to macrolides) in Eastern Europe and Asia.³ *F. tularensis* is a CDC Category A bioterrorism agent,⁴ especially because of its very high infectiousness.⁵ Dissemination of an

infectious aerosol in a human population may cause many pneumonic cases, with mortality rates as high as 60% for the more virulent type A strains.⁶

A live vaccine strain (LVS) of *F. tularensis* subsp. *holarctica* has been used for prophylaxis of tularaemia, especially for laboratory workers.⁶ It is, however, no longer used because of limited efficacy⁷ and concerns about the possibility of reversion to virulence.⁸ No other vaccine is currently available for human use. Antibiotics are effective in treating tularaemia patients and represent the main counter-measure in the context of biological threat. The aminoglycosides streptomycin and more recently gentamicin are considered to be the reference treatment.^{9,10} Because of their side

effects, especially nephrotoxicity and ototoxicity, their use is currently restricted to severe tularaemia cases. The fluoroquinolones and tetracyclines, especially ciprofloxacin and doxycycline, respectively, are advocated as first-line drugs for patients with diseases of mild to moderate severity.^{9,10} However, treatment failures and relapses occur in 10%–15% of patients treated with a fluoroquinolone^{11,12} and even more frequently when a tetracycline is administered.¹⁰

Treatment failures and relapses are considered to be independent of the acquisition of antibiotic resistance in *F. tularensis*, mainly because no strains with acquired resistance to first-line antibiotics have been isolated so far.¹³ However, acquired resistance to fluoroquinolones has emerged in many bacterial species,^{14–16} and difficulties in isolating *F. tularensis* from clinical samples may preclude the detection of antibiotic-resistant mutants. Mutants resistant to fluoroquinolones have been selected *in vitro* from the type A Schu4 strain¹⁷ and to fluoroquinolones¹⁸ and macrolides¹⁹ from type B strains. Antibiotic resistances resulted from target modifications, but only few mutations were identified in the topoisomerase-encoding genes *gyrA* and *parE*^{17,18} for fluoroquinolones and in the ribosomal genes *rrl* and *rplV* for macrolides.¹⁹ More detailed information is therefore required about the antibiotic resistance mechanisms, but also on the evolutionary pathways leading to high-level resistance in *F. tularensis*. Such results will optimize resistance detection and therefore antibiotic treatment of tularaemia patients. Moreover, a rapid DNA-based assay would be essential in the context of a biological threat related to the use of antibiotic-resistant *F. tularensis* strains.

Here, we show that high-level fluoroquinolone-resistant mutants can be easily and quickly obtained from diverse *Francisella* species strains after propagation with increasing antibiotic doses. We characterized the phenotypic and genetic evolutionary pathways from low to high resistance levels. Strikingly, these evolutionary pathways resulted in threatening cross-resistances to other antibiotic families.

Materials and methods

Bacterial strains and culture media

Three reference strains of *Francisella* species were used: *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS NCTC 10857 (a gift from Emile Pardé Research Center, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, Grenoble, France), *F. novicida* CIP56.12 [Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur (CRBIP), Institut Pasteur, Paris, France] and *F. philomiragia* ATCC 25015 (CRBIP). These strains were chosen to increase the likelihood of identifying different types of fluoroquinolone resistance mechanisms in *Francisella*, and for safety reasons related to their attenuated virulence in humans. We used *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (CRBIP) as control strains for the determination of MICs. All experiments were conducted in a biosafety level 3 laboratory.

Francisella strains were grown on Polyvitex-enriched chocolate agar (PVX-CHA) plates (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) that were incubated at 37°C in a 5% CO₂-enriched atmosphere for 48–72 h. Selection of fluoroquinolone-resistant mutants and MIC determination were performed using liquid MHPV medium, consisting of Mueller–Hinton broth (AES, Bruz, France) supplemented with 2% Polyvitex (bioMérieux). Control strains were grown on 5% sheep blood-enriched Columbia agar (COS) plates (bioMérieux), which were incubated in the same conditions for 24 h.

Selection and sampling of ciprofloxacin-resistant mutants

Four independent lineages were founded using each of the three antibiotic-susceptible reference *Francisella* strains. We named each lineage after the

species of its corresponding parental strain (Fth for *F. tularensis* subsp. *holarctica*, Fno for *F. novicida* and Fph for *F. philomiragia*), followed by an arbitrary number (1–4) denoting each of the four individual lineages. For example, Fno1 is the first of the four lineages propagated from *F. novicida*. Owing to growth difficulties during the propagation of one lineage derived from *F. tularensis* subsp. *holarctica*, only three lineages could be obtained with this strain, Fth1 to Fth3. Therefore, a total of 11 lineages were started and propagated by serial passages in MHPV medium supplemented with increasing concentrations of ciprofloxacin (Mylan, Saint Priest, France; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France; and Panpharma, Fougères, France) as described previously.¹⁹ Briefly, increasing 2-fold serial concentrations of ciprofloxacin (in MHPV) were added volume-to-volume to bacterial suspensions containing 10⁷ cells/mL, resulting in final ciprofloxacin concentrations from 0.5- to 64-fold the MIC for the parental strain. After 3–5 days incubation at 37°C in a 5% CO₂-enriched atmosphere, the lowest concentration of ciprofloxacin inhibiting bacterial growth was recorded for each lineage. This procedure constituted the first selection passage. This concentration, denoted MIC_p, measures the MIC of ciprofloxacin for the entire cell population, which may be heterogeneous and contain different mutants. For each lineage, the bacterial population present in the well with a ciprofloxacin concentration of MIC_p/2 was diluted 10-fold in MHPV into new wells that contained 2-fold serial concentrations of ciprofloxacin (0.5- to 64-fold the MIC_p for the previous passage). A total of 14 selection passages were performed, resulting in MIC_p ranging from 512 to 4096 times the ciprofloxacin MIC for the parental susceptible strains. At each selection passage, a sample of the MIC_p/2 bacterial population from each of the 11 lineages was collected and frozen in cryotubes at –80°C. A growth control (no antibiotic) and a negative control (only MHPV) were prepared at each selection passage.

To isolate individual resistant clones, the frozen mixed-lineage samples were plated on PVX-CHA medium and incubated for 2–5 days at 37°C. Individual colonies, each representing a single resistant clone, were picked, subsequently grown on PVX-CHA medium and stored at –80°C. This sampling procedure was performed to isolate one high-level resistant mutant from each lineage after the final (14th) selection passage and a total of 52 clones at intermediate selection passages (see Figure 1). Sampling times were either distributed along the evolutionary pathways of a lineage or corresponded to passages showing a significant (≥4-fold) increase in the MIC_p of ciprofloxacin. We named each of the evolved high-level resistant clones after its lineage, followed by P14. For example, Fth1P14 is the clone sampled from lineage 1 of *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS at passage P14, the final passage.

MIC determination

We determined the MICs of ciprofloxacin, levofloxacin (Sigma-Aldrich) and moxifloxacin (Bayer, Loos, France) to evaluate the impact of the mutations we identified on fluoroquinolones of different generations. We also determined the MICs of gentamicin (Panpharma), doxycycline (Sigma-Aldrich) and erythromycin (Sigma-Aldrich) to evaluate cross-resistance. Indeed, aminoglycosides and tetracyclines are used in the treatment of tularaemia, and resistance to erythromycin frequently involves changes in efflux systems resulting in multidrug resistance. Antibiotic stock solutions were prepared according to the manufacturers' instructions and stored at –80°C. The MICs were determined using a microdilution method in MHPV, as recommended by CLSI.²⁰ For each antibiotic, 2-fold serial concentrations in MHPV were distributed (75 µL per well) in 96-well microtitre plates (Becton Dickinson), and an equal volume of a bacterial suspension containing 10⁶ cells/mL prepared in MHPV was added to each well. The plates were incubated at 37°C for 48 h in a 5% CO₂-enriched atmosphere. The lowest antibiotic concentration inhibiting bacterial growth was recorded as the MIC. All experiments were performed in duplicate. For each experiment, a growth control (no antibiotic), a negative control (MHPV with the lowest antibiotic concentration tested, without bacterial cells) and the three control strains (see above) were performed in parallel.

Lineage ^a	Passage														MIC _p at P14 (mg/L)
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	
Fth1	1 ^b		1 ^b	1	1		1		20				1	32	
Fth2	1			1		1	1						1	32	
Fth3	1			1				1		1	19	1	1	64	
Fno1													1	64	
Fno2													1	128	
Fno3													1	32	
Fno4													1	64	
Fph1													1	64	
Fph2													1	64	
Fph3													1	16	
Fph4													1	128	

Figure 1. Evolution of MIC_p and sampling of resistant mutants for each lineage. Increases in MIC_p for each selection step are indicated as follows: empty cell, no increase; diagonal lines, 2-fold increase; grid, 4-fold increase; chequerboard, 8-fold increase; mesh, 16-fold increase; black cell, 32-fold increase. ^aThe naming of lineages is explained in the Materials and methods section. ^bThe number of individual clones analysed for a given passage is indicated. All these clones (11 at the final passage for all lineages and 52 from intermediate passages for lineages Fth1–Fth3) were analysed for the DNA sequences of the type II topoisomerase-encoding genes.

Sequencing the type II topoisomerase-encoding genes

Bacterial cells were grown at 37°C for 2–5 days on PVX-CHA plates from which colonies were harvested and resuspended in sterile water. Genomic DNA was extracted using the QiaAmp DNA Minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The PCR reactions were performed using the Pwo Master kit (Roche Applied Science, Meylan, France). Primers (Table S1, available as Supplementary data at JAC Online) were designed based on the available genome sequences of *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (NC_007880), *F. novicida* U112 (NC_008601) and *F. philomiragia* ATCC 25017 (NC_010336). Five, four, four and three primer pairs were designed to amplify the four genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE*, respectively, each primer pair allowing the amplification of 507–800 bp regions of each gene, including their quinolone resistance-determining regions (QRDRs). The PCR reactions, containing 0.4 μM of each primer and 2 ng/μL genomic DNA, were optimized for annealing temperatures and cycle numbers for each primer pair and *Francisella* strain. All PCR products were sequenced in the high-level resistant clones isolated after the final (14th) passage in each of the 11 lineages, while only the PCR products corresponding to the regions carrying mutations were sequenced in the 52 evolved clones sampled at intermediate selection passages. Sequencing was performed using the same primers and the dye terminator method, with the DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, Villepinte, France) on a Ceq 8000 sequencer (Beckman Coulter). Sequence alignments were performed using Ceq 8000 software (Beckman Coulter).

Mapping resistance mutations on three-dimensional topoisomerase structures

Sequences were retrieved and aligned using tools from the NPS@ web site.²¹ The effect of deletion alleles was analysed using SwissModel.²² Structures were analysed and illustrations generated using PyMOL (www.pymol.org). The DNA gyrase mutations were analysed using the structure of an engineered GyrAB construct from *Staphylococcus aureus* complexed with DNA and ciprofloxacin (pdb entry 2XCT),²³ and the topoisomerase IV mutations using the structure of an engineered ParCE construct from *Streptococcus pneumoniae* complexed with DNA and moxifloxacin (pdb entry 3FOF).²⁴

The amino acid sequence identity of *S. aureus* GyrAB and *S. pneumoniae* ParCE with the corresponding *Francisella* proteins is ~55% and ~35%, respectively.

Results

Selection of ciprofloxacin-resistant mutants from three low-virulence *Francisella* strains

We first determined the MICs of ciprofloxacin for each of the three *Francisella* species parental strains that we used to propagate the 11 lineages. These MICs were 0.016, 0.064 and 0.032 mg/L for *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, *F. novicida* and *F. philomiragia*, respectively. In all lineages, the 14 selective passages resulted in high resistance levels, with measured ciprofloxacin concentrations inhibiting growth (MIC_p) between 16 and 128 mg/L (Figure 1). These MIC_p values were obtained for the mixed populations after P14. Two types of evolutionary trajectories towards high resistance levels were observed in the 11 lineages (Figure 1): one showed gradual increases in the ciprofloxacin MIC_ps by 2- to 4-fold incremental steps, and one showed steeper variations in the MIC_ps, including 8- to 32-fold incremental steps. All four Fno-derived lineages revealed a gradual trajectory type, while the three Fth- and four Fph-derived lineages showed steep steps along their respective evolutionary pathways. These data suggested evolution towards high resistance through the successive substitution of resistance mutations conferring increasingly high resistance levels. Moreover, each steep step may be conferred by either several mutations occurring over a single passage or a single mutation with stronger impact on MIC. To get insights into the mechanistic details of increased resistance levels, we sampled not only one evolved clone from each of the 11 lineages at the final passage (P14), but also 52 clones from intermediate passages in the three lineages derived from *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (Figure 1).

Resistance phenotypes of parental strains and evolved mutants

We determined the MICs of several antibiotics for the parental susceptible strains and the high-level resistant clones sampled at the final passage from each of the 11 lineages (Table 1): the fluoroquinolones ciprofloxacin (the selection agent), levofloxacin and moxifloxacin; the aminoglycoside gentamicin; the macrolide erythromycin; and doxycycline, a tetracycline compound. All three parental strains showed low MIC values, except for the well-known natural resistance to macrolides of the Fth strain²⁵ and, to a lesser extent, the Fno and Fph strains.

As expected from the selection procedure, all evolved clones displayed high levels of resistance to ciprofloxacin, with 512- to 2048-fold increases in the MIC values (Table 1). We observed cross-resistance to the two other fluoroquinolones, with similar increases in MICs. All evolved clones revealed moderate (2- to 8-fold) increases in doxycycline MICs, with the highest levels observed in the Fno-derived clones. We also observed a further increase in the erythromycin MICs for the Fno- and Fph-derived clones, with Fno2P14 and Fno4P14 displaying high-level resistance (MIC \geq 256 mg/L). Finally, the MIC profiles of gentamicin were more surprising and were different for the three parental strains (Table 1). Hence, we observed decreases in the gentamicin MICs for more than half of the evolved clones (seven) compared with their respective parental strains, by 2- to 4-fold for Fno1P14, Fno2P14 and Fno3P14, and 4- to 32-fold for the four Fph-derived clones (Table 1). By contrast, a 4-fold increase in the gentamicin MIC was observed for clone Fno4P14 while no change was detected for Fth1P14, Fth2P14 and Fth3P14.

Mapping resistance mutations on the three-dimensional structures of topoisomerases

We identified a total of 26 mutations affecting the type II topoisomerase-encoding genes in the 11 high-level resistant mutants isolated after P14 in each lineage (Table 1), and located these mutations on the three-dimensional structure of topoisomerases (Figure 2). Twenty-two mutations resulted in changes in the GyrAB proteins and four in ParCE changes. Three mutations were identified in each of the three Fth-derived clones, in one Fno- and two Fph-derived clones, while we found two mutations in another Fno-derived and the other two Fph-derived clones, and only one in the two last Fno-derived clones. These results suggested that mutations also occurred in some other genes not encoding type II topoisomerases (see next section). Most mutations in *gyrA* (10/13) affected codons 83 and 87, located in the QRDR (Table 1 and Figure 2a). These mutations were located next to the carboxylate group of fluoroquinolones (see Discussion) and resulted in significant increases in MICs.²³ One-third of the mutations in *gyrB* (3/9, in two Fth-derived clones and one Fno-derived clone) affected codons 464–466, changes in which had been previously shown to be associated with fluoroquinolone resistance in *E. coli*.²⁶ The affected residues in the GyrB protein were close to the fluoroquinolone intercalation site (Figure 2a) and had smaller effects on MICs.^{23,24} Nine mutations, three in *gyrA* and six in *gyrB*, were located outside the defined QRDRs. The P43H change in GyrA was located in a region of the protein that likely interacts with DNA (Figure 2a). The in-frame Δ E523–S524 change in GyrA affected the surface of the GyrAB–DNA complex

as was the case for the D486E– Δ K487 change in GyrB (Figure 2a). The unusual P747S change in GyrB was found in all Fph-derived clones, this residue being located close to the bound DNA and the intercalated fluoroquinolone. The last two changes, Δ T570 in GyrA and E86K in GyrB, could not be mapped as they occurred outside the catalytic core of the enzyme. The E86K change might have no effect on fluoroquinolone resistance as this position is variable across bacterial species.

The mutational pattern in *parC* and *parE* (Table 1) revealed that only one of four mutations, resulting in the Δ C82 change in ParC, was located in the QRDR (Figure 2b). The other mutation affecting *parC* resulted in the introduction of a stop codon at position 453 that most likely destabilized the overall structure of the topoisomerase IV and abolished its activity. We indeed observed a highly reduced growth rate of this particular mutant, Fth2P14, in the absence of antibiotic (data not shown). The P472S change in ParE was located at the surface of the ParCE–DNA complex in a loop similar to the one that carries the D486E– Δ K487 GyrB change (Figure 2b). It might therefore have a similar effect. We were unable to predict the effect of the rather conservative L488I substitution within the hydrophobic core of *parE*.

Phenotypic and genotypic evolution of resistance lineages

The study of frozen bacterial populations, obtained at different stages of selection of ciprofloxacin resistance, allowed us to characterize the evolutionary trajectories towards high-level resistance to this antibiotic in the three lineages Fth1, Fth2 and Fth3 (Figure 3). After plating the frozen mixed-lineage samples from several selection passages we isolated 52 individual clones (Figure 1), for which we determined the MIC of ciprofloxacin. We scored these 52 clones for the presence or absence of mutations affecting the type II topoisomerase-encoding genes that we found in the high-level resistant mutants from the corresponding lineages. Four main trends emerged from these data (Figure 3).

First, the MIC of ciprofloxacin for the different individual clones confirmed the progressive increase in the fluoroquinolone resistance levels, indicative of the substitution of successive resistance mutations in the different lineages. Moreover, steep steps of MIC increase were observed, as observed for MIC_p, in all three lineages (Figures 1 and 3). However, discrepancies were apparent at given passages between the MIC_p for the entire population (Figure 1) and the MICs for individual clones (Figure 3). For example, the MIC_p for Fth1 at P4 increased by 8-fold compared with the MIC for the parental susceptible strain, whereas a 256-fold increase was measured for an individual clone sampled at that time. These differences may indicate polymorphic states of the corresponding population during the different passages (see below).

Second, our sampling procedure allowed identification of the order of substitution of different mutations resulting in high resistance levels (Figure 3). The first genetic change detected in all three of the lineages Fth1–Fth3 targeted the DNA gyrase-encoding genes through a mutation either in codon 83 of *gyrA* (*gyrA*⁸³, Fth2 and Fth3) or in the codon 466 of *gyrB* (*gyrB*⁴⁶⁶, Fth1). These mutations were subsequently shared by all descendant clones studied in their respective lineage. The second change in Fth1 also affected DNA gyrase through a *gyrA*⁸³ mutation, while the third mutation occurred at codon 488 of *parE*. Considering lineage Fth3, the second change occurred in *parC*⁸², followed by a third change in *gyrB*⁴⁶⁴. In lineage Fth2, the final P14-sampled

Table 1. MICs and mutations for high-level resistance mutants sampled from the 11 lineages at P14, compared with the three parental *Francisella* strains

Clone	MIC (mg/L)						Mutations ^a			
	CIP	L VX	MXF	GEN	ERY	DOX	GyrA; gyrA	GyrB; gyrB	ParC; parC	ParE; parE
Fth	0.016	0.016	0.032	0.25	≥256	0.13				
Fth1P14	32	32	32	0.25	≥256	0.25	T83I, C248T	E466D, G1401T		L488I, C1462A
Fth2P14	32	32	64	0.25	≥256	0.25	T83K, C248A; D87Y, G259T		S453X, +T1368	
Fth3P14	32	32	64	0.25	≥256	0.25	T83K, C248A	S464Y, C1394A	ΔC82, ΔGTT254–256	
Fno	0.064	0.064	0.13	1	16	2		+P465, +CTC1397		P472S, C1414T
Fno1P14	32	32	64	0.25	64	8	D87Y, G259T			
Fno2P14	64	64	128	0.5	≥256	16	D87G, A260G	D486E–NK487, ΔMTA1460–1462 ^b		
Fno3P14	32	32	64	0.25	64	16	ΔE523–5524, ΔANGAGTC1509–1514 ^c			
Fno4P14	32	32	64	4	≥256	16	P43H, C128A			
Fph	0.032	0.032	0.064	0.5	8	2				
Fph1P14	32	32	64	0.016	16	4	D87G, A260G	E86K, G262A, P747S, C2236T		
Fph2P14	64	64	128	0.13	64	8	T83M, C248T	P747S, C2236T		
Fph3P14	32	32	32	0.13	8	8	ΔT83, ΔMCG247–249	P747S, C2236T		
Fph4P14	64	64	128	0.064	16	8	T83M, C248T; ΔT570, ΔCAA1709–1711	P747S, C2236T		

CIP, ciprofloxacin; LVX, levofloxacin; MXF, moxifloxacin; GEN, gentamicin; ERY, erythromycin; DOX, doxycycline.

^aThe amino acid changes resulting from the different mutations (in *italics*) are numbered according to the sequence of the corresponding *E. coli* proteins. Δ and + denote the deletion and insertion of a single codon, respectively. X indicates a stop codon. The nucleotide changes are numbered according to the sequence of the *Francisella* species genes. Δ and + denote deletion and insertion of nucleotide(s).

^bThis single mutational event consists of an out-of-frame 3 bp deletion.

^cThis single mutational event consists of an in-frame 6 bp deletion.

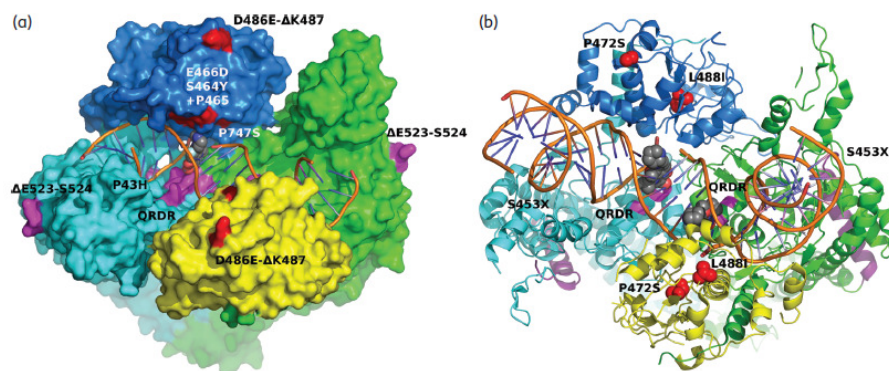


Figure 2. Location of amino acid changes associated with resistance mutations in *Francisella* in GyrAB (a) and ParCE (b) complex structures. Both structures are shown in a similar orientation with the bound DNA in orange as a cartoon representation and a fluoroquinolone with black carbon atoms in a space-filling representation. Residues corresponding to positions 81–84 and 87 are labelled QRDR. (a) Surface representation of the catalytic core of the heterotetrameric *S. aureus* GyrA₂ (green and cyan)–GyrB₂ (blue and yellow) complex (pdb entry 2XCT). The positions of amino acid changes that we found in the corresponding *Francisella* proteins are mapped onto the surface and indicated in magenta (GyrA) and red (GyrB). (b) Cartoon representation of the catalytic core of the heterotetrameric *S. pneumoniae* ParC₂ (green and cyan)–ParE₂ (blue and yellow) complex (pdb entry 3FOF). The positions of amino acid changes in the corresponding *Francisella* proteins are shown in magenta (ParC) and red (ParE). The part of the ParC structure that is deleted in the Fth2P14 mutant after the S453X change (Table 1) is shown in violet at the back of the model.

clone also carried three mutations. After the first *gyrA*⁸³ mutation in Fth2, two others occurred in *gyrA*⁸⁷ and *parC*⁴⁵³, but their precise order of substitution is unknown (Figure 3).

Third, genetic and phenotypic polymorphisms were detected in the two lineages Fth1 and Fth3. Indeed, several passages were characterized by the co-existence of different resistant clones (Figure 3), some of which went extinct without leaving progeny during the later evolutionary steps (at least at our detection level). This was the case at P10 in lineage Fth1, where three different types of resistant clones with different mutations co-existed, with similar resistance levels (Figure 3). This suggests different genetic pathways towards ciprofloxacin resistance. In addition, we detected a polymorphism at P12 in lineage Fth3. Indeed, three types of clones with only the *gyrA*⁸³ mutation had three different MIC values (Figure 3). These findings emphasize the presence of additional mutations targeting other resistance mechanisms (see below). The sub-population dynamics fitted well with the values of the MIC of ciprofloxacin. Hence, the winning clones that eventually took over the population in lineage Fth3 emerged from the sub-lineage that had the highest MIC at the polymorphic P12 (Figure 3).

Fourth, by focusing on the known genetic targets of fluoroquinolones we evidently missed mutations that occurred during evolution towards high levels of resistance. Three lines of evidence suggested that gyrase and topoisomerase IV were not the only targets of selection during our experiment. Indeed, different resistant clones with the same genotype for the topoisomerase-encoding genes had different MIC values. This was the case for clones sampled from the same passage as at P12 in Fth3 (see above and Figure 3), but also across evolutionary passages while the MIC was increasing (in Fth1 from P4 to P8, and in Fth3 from P2 to P12). Moreover, we found cross-resistance to other antibiotic classes in the Fno- and Fph-derived lineages that could not be explained by the type II topoisomerase mutations. Finally, we detected only a single *gyrA*

mutation in the resistant clones sampled at the final passage (P14) for lineages Fno3 and Fno4 (Table 1), suggesting that the same was true for these Fno-derived lineages.

Discussion

We investigated the evolutionary pathways towards high-level fluoroquinolone resistance in three different *Francisella* species by *in vitro* exposure of the parental susceptible strains to increasing concentrations of ciprofloxacin. By focusing on the known targets of fluoroquinolones, we identified mutations in the QRDR of type II topoisomerases that were already known to be associated with increased resistance,²⁶ but also previously uncharacterized changes both outside the QRDR of *gyrA* and *parC* and in unusual genetic regions of *gyrB*. Moreover, cross-resistance to gentamicin and doxycycline, which are commonly used in the treatment of tularemia, was detected. The evolutionary pathways towards high-level resistance were characterized at one extreme by a high level of genetic parallelism, with the same genes, and sometimes even the same codons, being altered by mutations among replicate lineages of the same and even different parental strains, and at the other extreme by lineage specificity at either the allelic level or the order of mutations. We also detected a high level of diversity with several genetically differentiated sub-populations co-existing at given evolutionary times.

The two major mechanisms of fluoroquinolone resistance are mutations in either genes *gyrAB* and *parCE*, encoding the targets of fluoroquinolones, or genes leading to overexpression of efflux pumps.²⁶ We focused here on the first type of mutation.²⁷ In Gram-negative bacteria, GyrA is usually the major target of fluoroquinolones, and *gyrA* mutations often correspond to the first step towards high-level resistance. They mostly occur in the QRDR of *E. coli* GyrA.²⁸ Codons 83 and 87 are the main targets of mutations

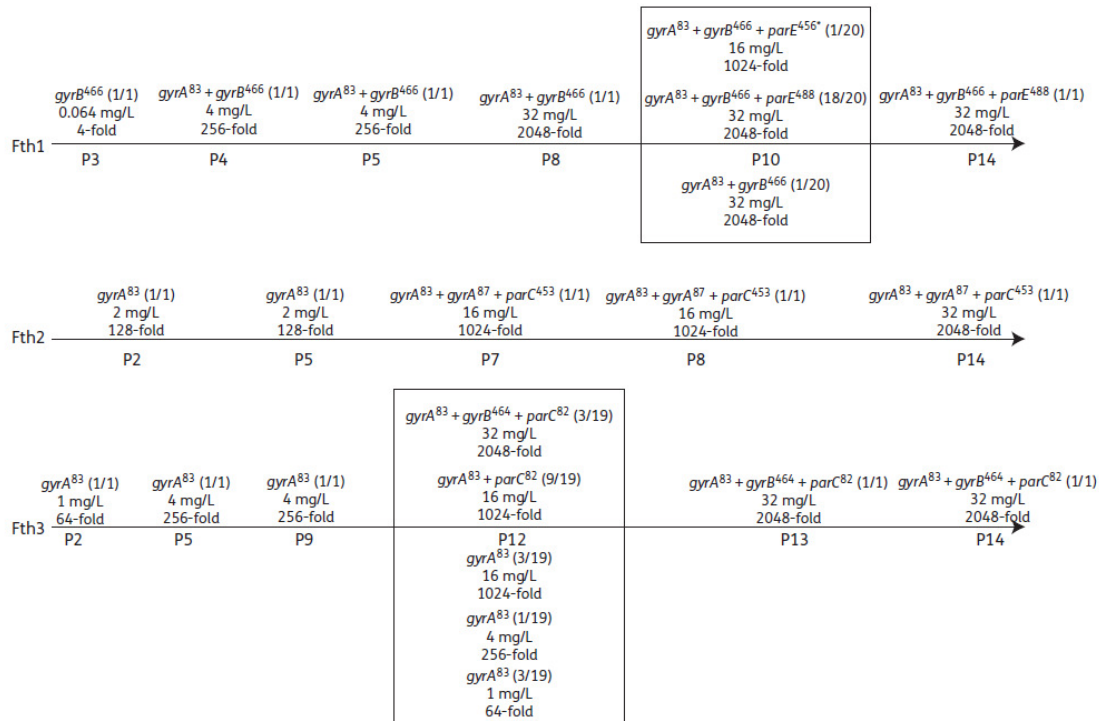


Figure 3. Evolutionary pathways towards high-level fluoroquinolone resistance in the three lineages Fth1–Fth3 founded from the *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS strain. The genotypes for *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* and the MIC of ciprofloxacin (both in mg/L and as fold increase compared with the LVS susceptible strain) are indicated for all sampled resistant clones. For each gene, the codon affected by mutations is given (e.g. the *gyrA*⁸³ mutation resulted in the change in codon 83), the precise nucleotide changes being described in Table 1. In a given lineage, the nucleotide changes affecting a given codon at intermediate passages are identical to those identified at P14. In one case (*) we identified a mutation ($\Delta A1366$ in *parE*, resulting in the introduction of a stop codon at position 456 of the ParE protein) that was not present in the resistant clone at the final passage. The proportion of each particular genotype found at a given passage is indicated in parentheses. When a high level of polymorphism was detected, all genotypes observed at a given passage are grouped inside a black box. A total of 52 individual clones were isolated at intermediate passages (Figure 1): 1 clone at each of P3, P4, P5 and P8, and 20 clones at P10 for Fth1, corresponding to 4-, 8-, 256-, 512- and 1024-fold increases in MICp, respectively; 1 clone at each of P2, P5, P7 and P8 for Fth2, corresponding to 64-, 128-, 512- and 1024-fold increases in MICp, respectively; and 1 clone at each of P2, P5, P9, P11 and P13, and 19 clones at P12 for Fth3, corresponding to 64- and 128-fold increases in MICp for P2 and P5, respectively, to 512-fold increases for P9, P11 and P12, and to a 2048-fold increase for P13.

in many bacteria, including *E. coli*,¹⁵ *Pseudomonas aeruginosa*¹⁶ and *Legionella pneumophila*.¹⁴ Mutations of codons 83 and 87 are associated with 4- to 32-fold and 1- to 4-fold increases in fluoroquinolone MICs, respectively,²⁶ including in clinical isolates of several Gram-negative species.²⁹ Resistance levels to fluoroquinolones may be further increased by additional mutations in *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE*.^{14,26,28} In contrast to *gyrA*, resistance-associated mutations in *gyrB*, *parC* and *parE* present higher variability in position, nature and simultaneous presence of mutations in other genes.²⁶ *In vitro* high-level resistance to fluoroquinolones has previously been reported in *F. tularensis* subsp. *tularensis* and subsp. *holarctica*.^{17,18} A *gyrA*⁸³ mutation leading to a T831 change was detected in both strains while additional mutations occurred for *F. tularensis* subsp. *tularensis* in *gyrA* (D87Y) and *parE* (5 bp deletion). The *gyrA*⁸³ and *gyrA*⁸⁷ mutations were associated with fluoroquinolone resistance.

However, in both studies, only one clone was analysed and evolutionary pathways towards high resistance, precise resistance levels to fluoroquinolones and cross-resistance to other antibiotic classes were not addressed.

Our study not only extends the data available for *Francisella* species, but also provides new results compared with other Gram-negative bacteria. We found mutations in type II topoisomerase-encoding genes that have been already detected in many bacteria,^{14–16,26} and we also identified mutations (Table 1) that have not previously been reported, or have only rarely been reported, to be associated with fluoroquinolone resistance phenotypes. For example, Fno3P14, Fno4P14 and Fph4P14 harboured mutations outside the QRDR of *gyrA* resulting, respectively, in the in-frame deletion of both codons 523 and 524, in the change in codon 43 and in the in-frame deletion of codon 570. Resistance mutations outside

the QRDR of *gyrA* have only rarely been reported (at codon 196 in *E. coli* and codons 119, 131, 139 and 144 in *Salmonella enterica*).¹⁵ We found a similar situation for the *gyrB* mutations affecting codons 86 and 747 in the Fph lineages and for the nonsense mutation in *parC* in the lineage Fth2 (Table 1). Moreover, other mutations, even if localized in the well-known QRDRs, resulted in unusual alleles, such as GyrA Δ T83 in Fph3P14 and ParC Δ C82 in Fth3P14. We mapped all mutations in the structure of the corresponding proteins complexed with DNA and antibiotics (Figure 2). All point mutations that occurred in the QRDR of the type II topoisomerases are likely to interfere with the carboxylate group of fluoroquinolones. Moreover, our molecular modelling analyses suggest that deletion alleles between positions 83 and 87 in the *gyrA* gene are likely to move the negatively charged residue 87 towards the carboxylate group of the fluoroquinolone, introducing an unfavourable interaction. This may explain the effect of the GyrA Δ T83 change in Fph3P14 and, by analogy, the ParC Δ C82 change in Fth3P14. Residues 464–466 in GyrB, which were altered by mutations, are located close to both the intercalated fluoroquinolone and the DNA substrate, thereby probably influencing fluoroquinolone or DNA binding.³⁰ The P747S change in GyrB is also located close to the bound fluoroquinolone and DNA. The increased flexibility resulting from the proline change may result in structural rearrangements influencing fluoroquinolone binding. Interestingly, the residues following the position corresponding to Pro747 are disordered in the ParE structure. The mutation resulting in the P43H change in GyrA also likely affects DNA binding. Moreover, the mutations producing the Δ E523–S524 and Δ T570 changes in GyrA and the D486E– Δ K487 change in GyrB rather act on the position of domains of the complexes that are absent from the crystal structure or affect additional interactions with DNA that are required for DNA gyrase activity.^{31,32} The implication of the E86K GyrB change in fluoroquinolone resistance remains uncertain as it affects a variable residue. Finally, two frame-shift mutations in ParC and ParE, one in the high-level resistant clone isolated at the final passage in lineage Fth2 and one in an intermediate clone isolated at P10 of Fth1, resulted in a truncated, thereby likely non-functional, topoisomerase IV protein. Construction and phenotypic analyses of isogenic strains with and without these mutations in the genome of the susceptible parental strains will help to measure their effect on fluoroquinolone resistance.

Striking cross-resistance profiles were detected for the fluoroquinolone-resistant mutants derived from *F. novicida* and *F. philomiragia*, including significant increases in the MICs of doxycycline and erythromycin, and more surprisingly decreases in the MIC of gentamicin. These data suggest additional resistance mechanisms, either overexpression of efflux pumps that are known to confer multidrug resistance³³ or regulatory changes. Moreover, no obvious changes in the pH of the cultures, which have been shown to affect susceptibility levels to tetracyclines and aminoglycosides,³⁴ were observed during the experiments (data not shown). Gentamicin MICs determined in parallel for the control strains were in the expected range. The evolutionary pathways of the different *Francisella* lineages also emphasize that we did not detect all mutations leading to high levels of fluoroquinolone resistance. Indeed, different MIC values were sometimes measured for genotypes identical for the type II topoisomerase-encoding genes that were sampled from the same passages within a given lineage, while increasing MIC values were sometimes measured for clones with the same genotypes for topoisomerase-encoding genes that were sampled over many passages within a

given lineage (Figure 3). Moreover, in the case of *F. novicida*, we detected a single mutation in *gyrA* in two final high-level resistant mutants that is unlikely to explain on its own the MIC increases. Only one previous study described the presence of an efflux pump in the LVS strain of *F. tularensis* subsp. *holarctica*. This efflux pump belongs to the resistance nodulation division (RND) family and is involved in virulence and multidrug resistance, including resistance to β -lactams, rifampicin and tetracyclines.³⁵ However, and to the best of our knowledge, simultaneous changes in susceptibilities to ciprofloxacin, erythromycin and gentamicin have not been reported previously for RND efflux pumps. An *in silico* study³⁶ revealed the presence of 15 putative ATP-binding cassette (ABC) efflux pumps in *F. tularensis* subsp. *tularensis* Schu S4, two of which might be involved in drug resistance. The genes encoding these two efflux systems were found in *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, and changes in their regulation or structure may be involved in some of the steps in resistance increase that we detected.

As expected, the evolutionary pathways towards high resistance levels were characterized by parallel genetic changes, with identical codons for *gyrA* or similar gene regions for *gyrB* (and to a lesser extent *parE*) being altered by mutations in independent lineages from the same and even different parental strains (Table 1). Similarities have also been detected in the order of mutation substitutions in the three independent lineages from *F. tularensis* LVS. Moreover, the evolution of MIC values followed two main trajectories, one characterized by progressive and low resistance increases, and one by the occurrence of steeper steps of MIC increase. These two types of trajectories may reflect different dynamics of mutation substitution, but also differential fitness effects of the various mutations. Determining the genome sequences of evolved clones at key evolutionary steps would provide valuable information about these dynamics. Besides this parallel evolution, the evolutionary pathways were also characterized by lineage- and/or strain-specific changes. Moreover, a high level of allelic diversity was detected, including mutations that have not been previously related to antibiotic resistance. Except for *gyrA*, not all type II topoisomerase-encoding genes were modified by mutations in the lineages that derived from all three parental strains. Although this trend may be an artefact related to the small number of independent replicate populations, it may also indicate genetic constraints during evolution in the different genetic backgrounds of the three parental strains.

The evolutionary pathways of the three *F. tularensis* LVS lineages showed a high level of within-lineage polymorphism, even with our small sampling scheme. Based on phenotypic and genetic data, up to five different types of clones were detected at a single passage (P12 in Fth3). Population dynamics was nicely related to the measured MIC values, as the clones conferring higher resistance levels in previous generations were the final winning genotypes. Therefore, these polymorphic states were not associated with stable co-existence between sub-lineages, but rather reflect clonal interference whereby several sub-lineages can transiently co-exist, each carrying different beneficial mutations until one of them out-competes the rest of the population owing to further substitution of additional fitness-enhancing mutations.³⁷

The present study highlighted the evolutionary trajectories towards high levels of fluoroquinolone resistance by target modifications in *Francisella* species. Our data reveal many different genetic solutions to the acquisition of high-level resistance to fluoroquinolones and even, sometimes, multidrug resistance. This

diversity of genetic mechanisms and evolutionary trajectories constitutes a general trend in the evolution of antibiotic resistance,³⁸ although the increase in antibiotic resistance may occur in some cases through a subset of all possible mutational pathways.^{14,39} Although the three analysed species showed differences in mutational profiles, *gyrA* mutations were pivotal in the evolution of a high resistance level. Therefore, the *gyrA* codons 83 and 87 can be predicted to be efficient targets for the detection of resistance in clinical *Francisella* isolates and, more directly, in biological samples. In addition, our experiments revealed new mutations involved in fluoroquinolone resistance in *Francisella* outside the QRDR that are likely to affect DNA and drug binding. Further investigations are therefore needed to characterize these novel resistance mechanisms. They could unveil new targets for the fast and efficient genetic detection of fluoroquinolone resistance.

Acknowledgements

We thank the Institut National de Veille Sanitaire, the Direction Générale de l'Armement, the Centre Hospitalo-Universitaire of Grenoble, the University Joseph Fourier of Grenoble and the Centre National de la Recherche Scientifique for funding.

Funding

This work was supported by the Institut National de Veille Sanitaire (InVS), the Direction Générale de l'Armement (DGA, 07CO301), the Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) of Grenoble, the University Joseph Fourier of Grenoble and the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS).

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Table S1 is available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

References

- 1 WHO Guidelines On Tularemia. <http://www.cdc.gov/tularemia/resources/whotularemiamanual.pdf> (16 January 2010, date last accessed).
- 2 Olsufjev NG, Meshcheryakova IS. Subspecific taxonomy of *Francisella tularensis* McCoy and Chapin 1912. *Int J Syst Bacteriol* 1983; **33**: 872–4.
- 3 Keim P, Johansson A, Wagner DM. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann NY Acad Sci* 2007; **1105**: 30–66.
- 4 He J, Kraft AJ, Fan J et al. Simultaneous detection of CDC category "A" DNA and RNA bioterrorism agents by use of multiplex PCR and RT-PCR enzyme hybridization assays. *Viruses* 2009; **1**: 441–59.
- 5 Bossi P, Tegnell A, Baka A et al. Bichat guidelines for the clinical management of tularemia and bioterrorism-related tularemia. *Euro Surveill* 2004; **9**: E9–10.
- 6 Dennis DT, Inglesby TV, Henderson DA et al. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA* 2002; **287**: 452–3.
- 7 Dai S, Mohapatra NP, Schlesinger LS et al. Regulation of *Francisella tularensis* virulence. *Front Microbiol* 2010; **1**: 144.
- 8 Salomonsson E, Kuoppa K, Forslund AL et al. Reintroduction of two virulence loci restores full virulence to the live vaccine strain of *Francisella tularensis*. *Infect Immun* 2009; **77**: 3424–31.
- 9 Hepburn MJ, Simpson AJ. Tularemia: current diagnosis and treatment options. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; **6**: 231–40.
- 10 Tärnvik A, Chu MC. New approaches to diagnosis and therapy of tularemia. *Ann NY Acad Sci* 2007; **1105**: 378–404.
- 11 Perez-Castrillon JL, Bachiller-Luque P, Martin-Luquero M et al. Tularemia epidemic in northwestern Spain: clinical description and therapeutic response. *Clin Infect Dis* 2001; **33**: 573–6.
- 12 Johansson A, Berglund L, Sjöstedt A et al. Ciprofloxacin for treatment of tularemia. *Clin Infect Dis* 2001; **33**: 267–8.
- 13 Urich SK, Petersen JM. *In vitro* susceptibility of isolates of *Francisella tularensis* types A and B from North America. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 2276–8.
- 14 Almahmoud I, Kay E, Schneider D et al. Mutational paths towards increased fluoroquinolone resistance in *Legionella pneumophila*. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 284–93.
- 15 Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents* 2005; **25**: 358–73.
- 16 Lee JK, Lee YS, Park YK et al. Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 2005; **25**: 290–5.
- 17 Loveless BM, Yermakova A, Christensen DR et al. Identification of ciprofloxacin resistance by SimpleProbe, high resolution melt and pyrosequencing nucleic acid analysis in biothreat agents: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* and *Francisella tularensis*. *Mol Cell Probes* 2010; **24**: 154–60.
- 18 La Scola B, Elkarkouri K, Li W et al. Rapid comparative genomic analysis for clinical microbiology: the *Francisella tularensis* paradigm. *Genome Res* 2008; **18**: 742–50.
- 19 Gestin B, Valade E, Thibault F et al. Phenotypic and genotypic characterization of macrolide resistance in *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* biovar I. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 2359–67.
- 20 Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing—Nineteenth Informational Supplement M100-S19*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2009.
- 21 Combet C, Blanchet C, Geourjon C et al. NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci* 2000; **25**: 147–50.
- 22 Schwede T, Kopp J, Guex N et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 3381–5.
- 23 Bax BD, Chan PF, Eggleston DS et al. Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. *Nature* 2010; **466**: 935–40.
- 24 Laponogov I, Sahi MK, Veselkov DA et al. Structural insight into the quinolone-DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. *Nat Struct Mol Biol* 2009; **16**: 667–9.
- 25 Johansson A, Urich SK, Chu MC et al. *In vitro* susceptibility to quinolones of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. *Scand J Infect Dis* 2002; **34**: 327–30.
- 26 Soussy CJ. Quinolones and Gram-negative bacteria. In: Courvalin P, Leclercq R, Rice LB, eds. *Antibiogram*. 1st edn. Portland, OR, USA: ESKA Publishing, 2010; 261–74.
- 27 Andriole VT. The quinolones: past, present, and future. *Clin Infect Dis* 2005; **41** Suppl 2: S113–9.
- 28 Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* 2005; **41** Suppl 2: S120–6.
- 29 Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W et al. Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and

- correlation with hypermutation. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 4062–70.
- 30 Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M et al. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; **35**: 1647–50.
- 31 Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; **61**: 377–92.
- 32 Reece J, Maxwell A. The C-terminal domain of the *Escherichia coli* DNA gyrase A subunit is a DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res* 1991; **19**: 1399–405.
- 33 Cattoir V. Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria. *Pathol Biol* 2004; **52**: 607–16.
- 34 Culebras E, Martinez JL, Baquero F et al. pH modulation of aminoglycoside resistance in *Staphylococcus epidermidis* harbouring 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase. *J Antimicrob Chemother* 1996; **37**: 881–9.
- 35 Bina XR, Lavine CL, Miller MA et al. The AcrAB RND efflux system from the live vaccine strain of *Francisella tularensis* is a multiple drug efflux system that is required for virulence in mice. *FEMS Microbiol Lett* 2008; **279**: 226–33.
- 36 Atkins HS, Dassa E, Walker NJ et al. The identification and evaluation of ATP binding cassette systems in the intracellular bacterium *Francisella tularensis*. *Res Microbiol* 2006; **157**: 593–604.
- 37 Gerrish PJ, Lenski RE. The fate of competing beneficial mutations in an asexual population. *Genetica* 1998; **102–103**: 127–44.
- 38 Baquero F, Blasquez J. Evolution of antibiotic resistance. *Trends Ecol Evol* 1997; **12**: 482–7.
- 39 Weinreich DM, Delaney NF, DePristo MA et al. Darwinian evolution can follow only very few mutational paths to fitter proteins. *Science* 2006; **312**: 111–4.

2.3 Données complémentaires

Table S1. Primers used in this work

Gene region ^a	Forward primer sequence (5' to 3')	Reverse primer sequence (5' to 3')	Fragment length (bp)	Annealing temperature (°C)
Fth/Fno <i>gyrA1</i>	AGGAAAATCTGGAGCTGGAA ^b	TGAATGGATTGCTAAAGAGTGC ^b	740	50.5
Fth/Fno <i>gyrA2</i>	CCATTCCATGATCTAGCAAGC	CGTGTGCCAACTAGAGTTCC	780	55.0
Fth/Fno <i>gyrA3</i>	TTGCAACTGGGAAGTCATAGA	GAGCGAGCGCATATTTTAGA	712	55.0
Fth/Fno <i>gyrA4</i>	GTGGTGGCGTTGGTAAATCT	GCAGAGCGTCCACATTCTC	775	50.5
Fth/Fno <i>gyrA5</i>	AGCAGGTGTTACAGGTAT	TAGGCTTAAACTCTTGAC	616	45.5
Fph <i>gyrA1</i>	TTCGGATTATTAGATACATGG ^b	CTGTAGGAAAATCAGGAG ^b	770	45.0
Fph <i>gyrA2</i>	GGACTATGGCCCTTATTG	TCAGCCTGCTCTTCTGTA	793	55.0
Fph <i>gyrA3</i>	GAATGGCTCTATGGTTAA	AACGAGGTCTAGCAAAC	761	47.0
Fph <i>gyrA4</i>	TACGGAAGGCTGGTATGT	AAC TTGGTCGGATGATGT	520	48.7
Fph <i>gyrA5</i>	ACTAAACGAGCTAGTCAA	TTTGTAAGTGTGCTTTT	507	47.0
Fth/Fno <i>gyrB1</i>	AAAAGCAACTATACCACC	AACCCTCAATGTTTATTAAC	793	45.5
Fth/Fno <i>gyrB2</i>	CACGGGCTTTACGAGCAG	CGGTATCGAGCACTATCA	755	47.0
Fth/Fno <i>gyrB3</i>	AGCTTCTCAGGATACGTT ^b	TCAGCTGTAGAGTCATTAGTTA ^b	773	47.0
Fth/Fno <i>gyrB4</i>	ACCAACTCAAAGGATTAT	ATGTTATTTCTGGTCAAG	795	43.5
Fph <i>gyrB1</i>	AAGGCTATAATACCACCA	TAAATGAAAACCCCTGA	800	47.0
Fph <i>gyrB2</i>	GTTTAGCTGAACCTCCTG	CTTCAAGCCTAGTAAAGAT	795	47.0
Fph <i>gyrB3</i>	AATCTTTCGTAAGATAATGC ^b	CTTTGGATATTGCAGGTC ^b	736	50.0
Fph <i>gyrB4</i>	TAAACATCTCGGCTAAAC	TAAAACAATGGTGGGAAA	717	47.0
Fno <i>parC1</i>	AAGAAGGCAGAAGAGTTA ^b	ACCAGGATAGTCAGGAGC ^b	781	47.0
Fth <i>parC1</i>	CGTACTAGCGCTTATGAT ^b	ACCAGGATAGTCAGGAGC ^b	741	45.0
Fth/Fno <i>parC2</i>	TTATTGTCTAAGCCTAATTC	CTTCAATCTTTGCTAACTT	709	47.0

Fth/Fno <i>parC3</i>	AAATCCAGGCTGAAGCAA	TCGCAAAATCACGAATAA	732	48.7
Fth/Fno <i>parC4</i>	TTGATGCTGATGATGTCT	CTTCAAATCTTGTAGCC	605	47.0
Fph <i>parC1</i>	TGCTGGTAAGAGTTTTGG ^b	TTTTAGTTGGTGGTGAGG ^b	574	50.0
Fph <i>parC2</i>	GTAATCTTCTGCGTAGTGT	GATGGGCAGGGTAACTGG	733	47.0
Fph <i>parC3</i>	TACCAGAGGTTGCCAAAT	TCAGCATCGACAAAGAAA	723	47.0
Fph <i>parC4</i>	TATTGGCTGGATTCTAT	AAGATGTGCTAAAGGTGA	726	47.0
Fth/Fno <i>parE1</i>	TTACCTTATAGTTGCTATTTCC	AAGTATCGCTTTTGCTTC	701	47.0
Fth/Fno <i>parE2</i>	GATAATGTAGGCAAGAAA	ATGAAAAGCTCAGTAGAA	791	45.5
Fth/Fno <i>parE3</i>	CGTAAACGCATAATGAAC ^o	TTATCTGGTAGAAATTCTAATT ^o	784	47.0
Fph <i>parE1</i>	AGGCTCAAGCGGAAGAGT	ATGCCTTAGGTTTACGAATT	787	47.0
Fph <i>parE2</i>	ATAGTATCTGCATCAAGCTC	TGAAACAGGATTAAGG	723	47.0
Fph <i>parE3</i>	TACAAGCCAGCCCAATC ^b	GCTCCGCTAAACAAGCAC ^b	733	55.0

^aThe four genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* were divided in five, four, four and three regions, respectively, for PCR amplification and sequencing. Identical primer pairs have been used to PCR-amplify *gyrA*, *gyrB*, *parE* and part of *parC* from both *F. tularensis* subsp. *holarctica* and *F. novicida* (Fth/Fno) owing to sequence identities in the corresponding DNA regions, while specific primer pairs were used for all four genes of *F. philomiragia* (Fph) and for the QRDR of *parC* in all three strains. ^bThese primer pairs allowed the amplification of the QRDR of type II topoisomerase genes.

3 Recherche de *F. tularensis* résistantes aux fluoroquinolones chez des patients atteints de tularémie en échec thérapeutique

3.1 Résumé

3.1.1 Objectifs

Comme nous l'avons précédemment décrit, la tularémie est une zoonose causée par *F. tularensis*, une bactérie à Gram négatif intracellulaire facultative. Les tableaux cliniques associés à cette maladie sont variés et dépendent notamment de la sous espèce impliquée, de la voie de contamination et du statut immunitaire de la personne infectée. Les formes ganglionnaires sont les plus fréquentes dans les cas d'infections par *F. tularensis* subsp. *holarctica*, présentent dans tout l'hémisphère Nord. Elles se présentent sous la forme d'adénopathies associées ou non à un ulcère au point d'inoculation de la bactérie (forme ulcéro-ganglionnaire). Le traitement de ces formes de sévérité moyenne à modérée est basé sur une

antibiothérapie utilisant les tétracyclines ou les fluoroquinolones. Bien que l'efficacité de ces traitements ait été attestée par de nombreuses études, un nombre important de rechutes et d'échecs thérapeutiques sont observés. Une des hypothèses pouvant expliquer la fréquence de ces échecs est l'émergence de bactéries résistantes aux antibiotiques.

A ce jour, aucune résistance n'a été détectée chez *F. tularensis*. Cependant, plusieurs modèles *in vitro* ont mis en évidence la capacité de la bactérie à évoluer vers un haut niveau de résistance, particulièrement vis-à-vis des fluoroquinolones. Nous avons montré, ainsi que d'autres équipes, que la résistance à cette classe d'antibiotiques est notamment associée à l'accumulation de mutations dans les gènes codant pour les topoisomérases de type II. Les mutations du gène *gyrA* codant pour la sous-unité A de l'ADN gyrase et affectant les acides aminés 83 et 87 présentent un intérêt particulier, de par leur apparition précoce dans le processus évolutif et leur association à un niveau de résistance cliniquement significatif.

La présente étude a pour buts : 1/ la confirmation de l'importance des mutations du gène *gyrA* dans l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones chez *F. tularensis* subsp. *holarctica*, 2/ la détection de la présence de souches résistantes dans l'environnement et chez les patients atteints de tularémie, et plus spécifiquement ceux présentant un tableau d'échec thérapeutique.

3.1.2 Méthode

Les méthodes d'étude des souches bactériennes précédemment décrites (cf. section **Travaux scientifiques** paragraphe 2.1.2) ont été utilisées pour l'analyse phénotypique (détermination des CMI) et génétique (séquençages des QRDR des gènes codant pour l'ADN gyrase) des souches.

Ces techniques n'étant pas adaptées à l'étude des prélèvements cliniques, nous avons développé des outils moléculaires spécifiques.

D'une part, nous avons mis au point une PCR en temps réel (qPCR-FtgyrA) ciblant une portion de 219-pb de *gyrA* incluant le QRDR. L'utilisation d'une sonde en tandem, dont la sonde de détection est complémentaire des nucléotides 235 à 265 permet par l'analyse des courbes de fusion la détection de mutations impactant les acides aminés 79 à 88. Afin d'augmenter la sensibilité du test, cette technique a été utilisée en PCR nichée, après une première amplification d'un fragment de 740-pb.

D'autre part, une technique de séquençage sur PCR nichée a été développée

afin de déterminer les séquences de QRDR des gènes *gyrA* et *gyrB*. La première PCR est réalisée à l'aide d'une polymérase haute-fidélité pour permettre une amplification spécifique de la cible dans une matrice complexe contenant de forte proportion d'ADN humain.

Afin de réaffirmer l'importance des mutations du gène *gyrA* dans le processus évolutif d'acquisition de la résistance de *F. tularensis* subsp. *holarctica*, nous avons propagé 18 lignées indépendantes à partir de la souche vaccinale LVS. L'expérimentation d'évolution a été réalisée dans les conditions précédemment décrites (cf. section **Travaux scientifiques** paragraphe 2.1.2), avec seulement 2 étapes de sélection réalisées. Au terme de cette procédure, les suspensions finalement sélectionnées ont été testées avec la qPCR-FtgyrA afin d'évaluer la proportion de lignées ayant acquis une mutation.

Concernant les recherches de mutants résistants chez les patients atteints de tularémie, nous avons étudié 104 cas confirmés dont 32 en situation de rechute ou d'échec thérapeutique. Nous disposons de 82 échantillons biologiques positifs pour la présence d'ADN de *F. tularensis* et de 42 souches de *F. tularensis* subsp. *holarctica* isolées dans le cadre du diagnostic de ces cas cliniques. Les CMI vis-à-vis des classes d'antibiotiques utilisées en thérapeutique et à l'érythromycine ont été déterminées ainsi que les séquences de QRDR de *gyrA* et *gyrB*. Les 82 échantillons cliniques ont été étudiés grâce à la qPCR-FtgyrA nichée. Les 16 échantillons issus des patients ayant reçu des fluoroquinolones avant leur prélèvement ont en plus été analysés à l'aide du protocole de séquençage après amplification nichée des gènes *gyrA* et *gyrB*.

3.1.3 Résultats

La technique qPCR-FtgyrA développée a montré après optimisation une limite de détection à 250 unités génomiques (GU)/test et une limite de distinction des différents génotypes à 26000 GU/test. La profondeur du test permettant de distinguer deux génotypes a été évaluée à 1/10. Pour les souches non mutées, une courbe de fusion bimodale a été observée en dessous de la limite de différenciation des génotypes. Nous avons pu retrouver un profil classique sur ces échantillons faiblement concentrés en ADN bactérien en utilisant le protocole de PCR nichée. Nous avons pu établir des limites d'interprétation pour les températures de fusion

(T_m) permettant la distinction d'une souche non mutée (66,50°C<T_m<68,38°C), d'une souche portant une mutation *gyrA83* (62,03°C<T_m<63,72°C), d'une souche portant une mutation *gyrA87* (64,54°C<T_m<66,22°C) et d'une souche portant à la fois une mutation *gyrA83* et *gyrA87* (57,67°C<T_m<59,40°C).

L'étude des lignées d'évolution courte *in vitro* en présence de ciprofloxacine a confirmé l'intérêt des mutations *gyrA83* et *gyrA87* dans le processus évolutif. En effet, sur les 18 lignées propagées à partir de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, 15 présentent une augmentation significative de la CMI de la population sélectionnée (4 à 64 fois la CMI de la souche de départ). Les résultats obtenus avec la qPCR-FtgyrA laissent supposer la présence majoritaire de clones portant une mutation *gyrA83* ou *gyrA87* dans 10 lignées. Ces résultats confirment l'importance de ce marqueur dans la détection de la résistance aux fluoroquinolones chez *F. tularensis*.

Forts de ces constatations préliminaires, nous avons débuté l'étude des souches bactériennes isolées de patients atteints de tularémie. L'étude phénotypique n'a montré aucun profil de résistance aux antibiotiques testés. Les CMI pour les fluoroquinolones testées (ciprofloxacine, lévofloxacine et moxifloxacine) présentent des valeurs concordantes avec la sensibilité : (0,016-0,25mg/L). Ces résultats sont corrélés avec ceux du séquençage de *gyrA* et *gyrB*, montrant des séquences identiques aux *F. tularensis* sauvages pour les 42 souches testées. Notons l'absence de résistance pour les autres antibiotiques d'intérêt clinique, doxycycline (0,25-1,0mg/L) et gentamicine (0,13-0,5mg/L) ; et des valeurs de CMI pour l'érythromycine (2,0-16mg/L) correspondant à des souches de biovar I (Ery S).

L'analyse des 82 échantillons patients avec la qPCR-FtgyrA a permis la détection de 72 prélèvements positifs à *F. tularensis*, dont l'analyse des courbes de fusion montrait pour 68 échantillons un pic avec un T_m compris entre 66,6°C et 67,6°C, concordant avec un profil sensible. Les 4 autres échantillons présentaient un profil de courbe de fusion bimodal malgré l'utilisation de la PCR nichée, lié à la faible quantité d'ADN bactérien dans le prélèvement. Remarquons que la différence de sensibilité observée entre la PCR en temps réel utilisée en routine au laboratoire et la qPCR-FtgyrA trouve certainement son explication dans la différence du nombre de copie génomique des cibles utilisées (environ 40 pour *ISftu2* et 1 pour *gyrA*) et de la nature des sondes de détection (Sonde d'hydrolyse et sonde en tandem).

Pour compléter cette étude le séquençage des QRDR de *gyrA* et *gyrB* a été réalisé

sur 16 échantillons issus de 14 patients ayant reçu des fluoroquinolones avant leur prélèvement. Aucune mutation n'a été détectée par ce biais.

3.1.4 Conclusion

En conclusion, cette étude a confirmé l'importance des mutations *gyrA* en particulier sur les acides aminés 83 et 87 dans l'acquisition de la résistance aux fluoroquinolones dans les modèles *in vitro*. Cependant, elle a également mis en évidence l'absence de l'émergence de cette résistance dans le réservoir environnemental de *F. tularensis* et chez les patients en échec thérapeutique après un traitement par les fluoroquinolones. Le phénomène d'acquisition de la résistance ne peut donc pas expliquer les fréquents échecs thérapeutiques observés dans les cas de tularémie.

Plusieurs hypothèses restent en suspens quant à la fréquence de ces échecs thérapeutiques, et notamment les difficultés d'accès au site infectieux des antibiotiques, leur inactivation dans les tissus nécrotiques, ou l'entrée des bactéries en état viable mais non cultivable (VBNC) consécutivement au stress induit par la réponse immunitaire de l'hôte ou l'action de substances bactéricides.

3.2 *Manuscript soumis*

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

OXFORD
UNIVERSITY PRESS

Journal of Antimicrobial Chemotherapy

Absence of fluoroquinolone resistance mutations in *Francisella tularensis* in tularaemia patients with treatment failure or relapse.

Journal:	<i>Journal of Antimicrobial Chemotherapy</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Sutera, Vivien; CHU Grenoble, Bacteriology; LAPM, UJF-Grenoble 1, CNRS, UMR 5163, Hoarau, Gautier; CHU Grenoble Alpes, Bacteriology Caspar, Yvan; Laboratoire de bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble, ; Université Grenoble Alpes, LAPM, MAURIN, Max; CHU de Grenoble, Microbiology
Keywords:	<i>Francisella tularensis</i> , Tularaemia, Fluoroquinolones, Antibiotic resistance, DNA gyrase

SCHOLARONE™
Manuscripts

Journal of Antimicrobial Chemotherapy: under review

1 **Absence of fluoroquinolone resistance mutations in *Francisella tularensis***
2 **in tularaemia patients with treatment failure or relapse.**

3

4 **V. Sutura,^{†1-3} G. Hoarau,^{†1-3} Y. Caspar¹⁻³, M. Maurin^{1-3*}**

5

6 ¹Laboratoire de Bactériologie-Hygiène Hospitalière, Département des agents infectieux,
7 Institut de Biologie et de Pathologie, Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, CS
8 10217, 38043 Grenoble Cedex 9, France.

9 ²Laboratoire Techniques de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité - Informatique,
10 Mathématiques et Applications (TIMC-IMAG), Université Grenoble Alpes, CS 10170, 38042
11 Grenoble cedex 9, France.

12 ³Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5525, 38042
13 Grenoble cedex 9, France

14 † These authors contributed equally to this work

15

16 * Corresponding author: Max Maurin, Laboratoire de Bactériologie, Département des agents
17 infectieux, Institut de Biologie et de Pathologie, Centre Hospitalier Universitaire Grenoble
18 Alpes, CS 10217, 38043 Grenoble Cedex 9, France;

19 Phone: +33 4 76 76 54 79; Fax: +33 4 76 76 52 28; E-mail: mmaurin@chu-grenoble.fr

20

21 **Running title:** Absence of *in vivo* resistance to fluoroquinolones in *Francisella tularensis*.

22

23 **Key words:** *Francisella tularensis*, tularaemia, fluoroquinolones, antibiotic resistance, DNA
24 gyrase

25

26 **SYNOPSIS**27 **Objectives**

28 The fluoroquinolones are widely used for treatment of tularaemia, a zoonosis caused by
29 *Francisella tularensis*, although failures and relapses occur in 5–30% of patients.

30 Fluoroquinolone-resistant strains of *F. tularensis* have been selected *in vitro*, but not in the
31 clinical situation. Fluoroquinolone resistance has been associated with mutations in the *gyrA*
32 gene encoding the subunit A of DNA gyrase. The aim of this study was to reassess the
33 possibility of detecting fluoroquinolone-resistant strains of *F. tularensis* *in vivo*.

34 **Patients and methods**

35 We studied 104 tularaemia cases, including 32 (30.7%) who experienced failure or relapse
36 after fluoroquinolone treatment. For diagnostic purposes, we isolated a *F. tularensis* strain in
37 42 patients (40 before and two after fluoroquinolone treatment) and collected 82 tissue
38 samples in 70 patients (55 before and 15 after fluoroquinolone treatment). Fluoroquinolone
39 resistance in the infecting *F. tularensis* strains was tested by MIC determination for isolated
40 strains, using a real-time PCR assay detecting *gyrA* mutations in this pathogen for clinical
41 samples.

42 **Results**

43 All clinical strains of *F. tularensis* displayed fluoroquinolone MICs within the same range as
44 fluoroquinolone-susceptible controls. Using the qPCR_{F_{gyrA}} assay, we found similar melting
45 peaks for the 42 clinical strains of *F. tularensis*, the 82 tissue samples and fluoroquinolone-
46 susceptible control strains, confirming that there was no *gyrA* mutation.

47 **Conclusions**

48 Failures and relapses observed after fluoroquinolone treatment were not related to infection
49 with a fluoroquinolone-resistant strain of *F. tularensis*, nor *in vivo* selection of
50 fluoroquinolone-resistant *gyrA* mutants of this pathogen in our tularaemia case series.

51

52 **INTRODUCTION**

53 *Francisella tularensis* is a Gram-negative, facultative intracellular bacterium causing the
54 zoonosis tularaemia.¹ It is a class A bioterrorism agent.² Two *F. tularensis* subspecies are
55 responsible for human infections: subsp. *tularensis* (type A) in North America and subsp.
56 *holarctica* (type B) throughout the northern hemisphere.³ The clinical symptoms of
57 tularaemia are classically grouped into six clinical forms:³⁻⁵ the ulceroglandular and glandular
58 forms, a regional lymphadenopathy with a skin inoculation lesion only detectable in the
59 former presentation; the oculoglandular and oropharyngeal forms, respectively conjunctivitis
60 or pharyngitis with a regional lymphadenopathy; the pneumonic form, pneumonia occurring
61 after inhalation of contaminated aerosols or haematogenous spread of bacteria from other
62 infection sites; and the typhoidal form, a systemic disease mimicking typhoid. Complications
63 include lymph node suppuration in approximately 30% of patients with lymphadenopathy^{3,6,7}
64 and *F. tularensis* bacteraemia with possible secondary infectious locations and severe
65 sepsis.³⁻⁵ Mortality rates vary from less than 1% to up to 30% for type A pneumonia cases.⁸
66 The fluoroquinolones (e.g. ciprofloxacin) and the tetracyclines (e.g. doxycycline) are
67 considered first-line treatment of mild to moderate severity cases, while the aminoglycosides
68 (streptomycin or gentamicin) are advocated for severe infections.^{1,4,5} Although the
69 fluoroquinolones are bactericidal against *F. tularensis* in axenic media,⁹⁻¹² cell systems^{13,14}
70 and animal models,¹⁵⁻¹⁷ treatment failures and relapses are observed in 5-30% of patients
71 treated with these antibiotics, especially in case of delayed treatment, suppuration
72 lymphadenopathy and/or altered immune status.^{18,19} Among possible explanations, patients
73 with poor outcome might be infected with a fluoroquinolone-resistant *F. tularensis* strain or
74 experience *in vivo* selection for resistance during antibiotic therapy. *In vitro*, it has been
75 possible to select *F. tularensis* strains resistant to fluoroquinolones owing to mutations in the
76 topoisomerases II encoding genes.²⁰⁻²² However, no fluoroquinolone resistance has been

77 detected so far in natural strains of *F. tularensis*.^{9-12,19,23-25} In the present study, we reassessed
78 the possibility of detecting fluoroquinolone-resistant *F. tularensis* strains in humans.

79

80 MATERIAL AND METHODS

81 *Patients and clinical specimens*

82 We studied 104 confirmed tularaemia cases, according to the WHO classification,¹ including
83 32 (30.7%) patients who experienced failure or relapse after fluoroquinolone treatment (Table
84 1). For diagnostic purposes, we collected 42 *F. tularensis* strains and 82 tissue samples. For
85 all patients, *F. tularensis* subsp. *holartica* infection was confirmed by PCR amplification and
86 sequencing of the 16S-23S rRNA region from isolated strains or tissue samples.⁷

87 Group A included 42 cases (nine females, 33 males), mainly occurring as sporadic infections
88 (39/42) between 2004 and 2014, for which a *F. tularensis* strain was isolated before any
89 antibiotic treatment (except two patients already under fluoroquinolone treatment) (Table 1).

90 The clinical forms were ulceroglandular (12 cases), glandular (three), oropharyngeal (seven,
91 including three family cases), oculoglandular (two), pneumonic (eight) and typhoidal (ten).

92 Group B included 70 cases for which 82 clinical samples tested positive for *F. tularensis*
93 DNA using a qPCR-*ISFtu2* assay (Table 1).⁷ The clinical forms were ulceroglandular (22
94 cases), glandular (24), oropharyngeal (16), oculoglandular (four), pneumonic (three) and
95 typhoidal (one). Group B patients were split into subgroups B1 and B2, respectively, for
96 patients who had received or not received a fluoroquinolone (mostly ciprofloxacin) before
97 clinical sample collection (Table 1). One group B1 patient and seven group B2 patients also
98 belonged to group A.

99

100 *Bacterial strains*

101 We used five *Francisella* sp. strains with low virulence in humans (Table 2): *F. tularensis*
102 subsp. *holarctica* Live Vaccine strain (FthLVS, NCTC 10857, provided by the Institut de
103 recherche biomédicale des armées, Grenoble, France); *F. novicida* strain CIP56.12 (Centre de
104 Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur, Paris, France); and three fluoroquinolone-
105 resistant mutants, derived from either FthLVS (Fth1P14 and Fth2P14) or *F. novicida*
106 CIP56.12 (Fno1P14).²⁰ These clones harboured mutations in the *gyrA* quinolone-resistance
107 determining region (QRDR): T83I (C248T) for Fth1P14, T83K (C248A) and D87Y (G259T)
108 for Fth2P14, and D87Y (G259T) for Fno1P14.²⁰ The specificity of the qPCR_{FgyrA} assay
109 was evaluated using 34 strains not belonging to the *Francisella* genus (Table 3). All cultures
110 were performed in a biosafety level 3 (BSL3) laboratory.

111

112 *In vitro selection for fluoroquinolone resistance in F. tularensis subsp. holarctica LVS*

113 Earlier studies demonstrated that DNA gyrase was the primary target of fluoroquinolones in
114 *F. tularensis*.^{20–22} To confirm these data, 18 independent lineages were newly founded after
115 only two passages of the FthLVS strain in increasing concentrations of ciprofloxacin
116 (Panpharma, Fougères, France), as previously described.²⁰ Briefly, a bacterial suspension of
117 FthLVS (10^7 CFU/mL) was grown in Mueller-Hinton broth supplemented with 2%
118 Polyvitex® (MHPV, BioMérieux, Lyon, France), containing twofold serial concentrations of
119 ciprofloxacin (0.008–0.5mg/L). After 5 days incubation at 37°C in 5% CO₂-enriched
120 atmosphere, the bacterial growth obtained at the highest ciprofloxacin concentration was
121 diluted 1:10 in MHPV and dispensed in a second microtiter plate. Then the highest
122 ciprofloxacin concentration allowing bacterial growth was recorded as the MIC_p, and the
123 corresponding bacterial suspension was frozen at –80°C for further analysis.

124

125 *MIC determination*

126 The minimum inhibitory concentrations (MICs) of several antibiotics for clinical strains of *F.*
127 *tularensis* were determined in duplicate, using a previously described procedure,²⁰ according
128 to Clinical and Laboratory Standards Institute recommendations.²⁶ We tested three
129 fluoroquinolone compounds, including ciprofloxacin (Panpharma, Fougères, France),
130 levofloxacin (Fresenius Kabi, Sèvres, France) and moxifloxacin (Bayer, Puteaux, France);
131 gentamicin (Panpharma); doxycycline (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France); and
132 erythromycin (Fluka, Lausanne, Switzerland) for biovar identification.^{27,28} Antibiotic
133 solutions in MHPV medium (0.03–64 mg/L) were dispensed (75 µL per well) in 96-well
134 microtitre plates (Becton Dickinson, Pont-de-Claix, France). A bacterial inoculum (10⁶ CFU,
135 75 µL per well) in MHPV was added to each well. MICs were determined after 48 h
136 incubation of the plates, at 37°C, in 5% CO₂-enriched atmosphere. A negative control (no
137 bacteria), a growth control (no antibiotics) and the three control strains (*Escherichia coli*
138 ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC29213, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC
139 27853) were also tested.

140

141 ***Real-time PCR assay for detection of F. tularensis gyrA mutations (qPCR_FgyrA)***

142 DNA was extracted from heat-inactivated bacterial suspensions (0.5 McFarland turbidity,
143 95°C for 30 min) using the QIAmp DNA mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). The clinical
144 samples were first homogenized using a MagNA Lyser instrument (Roche Diagnostics,
145 Meylan, France), and DNA was extracted as above.
146 Primers and dual-labelled hybridization probes were designed using the Roche LightCycler
147 Probe Design software (Roche Diagnostics, Meylan, France) to allow amplification of a 219-
148 bp portion of the *gyrA* QRDR (nucleic acids 235–265, amino acids 79–88) in *F. tularensis*
149 and *F. novicida* (Table 4). The qPCR_FgyrA assay was performed using a LightCycler 2.0
150 apparatus (Roche Diagnostics) and the LightCycler FastStart DNA Master HybProbe reaction

151 mix (Roche Diagnostics). The amplification reaction mix (20 μ L) contained Mg^{2+} (4 mM),
152 the forward (0.25 μ M) and reverse (0.4 μ M) primers, the anchor (0.3 μ M) and sensor (0.1
153 μ M) probes, Uracil-DNA Glycosylase (Eurogentec S.A., Ougree, Belgium, 0.5 U), 5 μ L of
154 DNA extract and PCR-grade water (Roche Diagnostics). The thermal cycling conditions
155 were: the initial DNA denaturation step (95°C, 10 min); followed by 45 cycles of DNA
156 denaturation (95°C, 10 s), primer annealing (60°C, 10 s) and DNA elongation (72°C, 15 s);
157 and a final melting curve step corresponding to DNA denaturation at 95°C followed by rapid
158 cooling at 50°C and slow heating (0.1°C/s) with continuous recording of the fluorescent
159 signal. DNA amplification and melting curve analyses were performed using the LightCycler
160 4.1 software (Roche Diagnostics). Each run included a negative control (PCR-grade water),
161 and four positive controls (the FthLVS strain and the fluoroquinolone-resistant clones
162 Fth1P14, Fth2P14 and Fno1P14).

163 For clinical specimens with a low signal in the qPCR F_{gyrA} assay, we performed a first PCR
164 amplification run with primers used for *gyrA* sequencing (see below). The amplified products
165 were purified on MNSU 030 plates (Merck Millipore, Billerica, MA, USA), concentrated 2.5
166 times and retested with the qPCR F_{gyrA} assay.

167

168 ***PCR amplification and sequencing of the *gyrA* and *gyrB* QRDRs.***

169 For human *F. tularensis* isolates, the *gyrA* and *gyrB* QRDR were sequenced as previously
170 described.²⁰ Briefly, the PCR reactions were performed using the Pwo Master kit (Roche
171 Applied Science, Meylan, France). Primers were designed to amplify a 740-bp fragment of
172 *gyrA* or a 773-bp fragment of *gyrB* (Table 4). The PCR reactions contained 0.4 μ M of each
173 primer and 2 ng/ μ L of genomic DNA. PCR products were sequenced using the same primers
174 and the Dye terminator method, with the DTCS Quick Start kit (Beckman Coulter, Villepinte,
175 France) and a Ceq 8000 apparatus (Beckman Coulter).

176 For patients with fluoroquinolone treatment failure or relapse, we evaluated the presence of *F.*
177 *tularensis gyrA* or *gyrB* QRDR mutations directly in clinical samples. To increase PCR
178 sensitivity, we performed two consecutive amplification runs. For *gyrA* QRDR, PCR
179 amplification and sequencing were performed using the same primers as for qPCR_{FtgyrA}
180 (Table 4). For *gyrB* QRDR, PCR amplification and sequencing were performed using primers
181 designed to amplify a 267-bp fragment of *gyrB* (FthgyrB-Fw1330 and FthgyrB-Rv1596,
182 Table 4). The first PCR reaction was performed using Q5®High-Fidelity DNA Polymerase
183 (New England Biolabs, Evry, France), 0.5 µM of each primer and 10 ng/µL of genomic DNA
184 extracted from the tested patient's sample. The annealing temperature was 60°C for PCR
185 *gyrA*QRDR and 63°C for PCR *gyrB*QRDR. The second PCR run was performed using
186 TAKARA Premix Ex Taq HS Version (TAKRR030A, Ozyme, St Quentin-en-Yvelines,
187 France), with 0.5 µM of each primer, 4 µL of DNA template from the first PCR run and the
188 same annealing temperatures as for the first PCR run. PCR sequencing was performed at
189 Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany).

190

191 ***Correlation between treatment failures and relapses, and gyrA QRDR mutations.***

192 For each group of patients, we evaluated the number of treatment failures and relapses as well
193 as their occurrence with respect to any fluoroquinolone treatment. Treatment failures and
194 relapses were recorded in patients who had received an appropriate treatment according to the
195 WHO recommendations,¹ with the occurrence of any of the following conditions: 1/ no
196 improvement, worsening or recurrence of clinical symptoms, 2/ a positive culture after
197 completion of at least 7 days of antibiotic treatment; 3/ lymph node suppuration needing
198 surgical resection; 4/ a cutaneous or subcutaneous abscess needing surgical resection and 5/
199 other complications (including pleurisy and meningitis). A fluoroquinolone treatment failure

200 or relapse was recorded when the above conditions occurred when the patient had already
201 received a fluoroquinolone treatment (ofloxacin, levofloxacin, ciprofloxacin or moxifloxacin).

202

203 RESULTS

204 *Evaluation of the sensitivity and specificity of the qPCR_FtyrA assay*

205 The performance of the qPCR_FtyrA assay was evaluated according to two criteria: *gyrA*
206 amplification and detection, and *gyrA* mutation detection and differentiation.

207 The limit of detection of qPCR_FtyrA for FthLVS was 250 genome units (GU) per reaction.

208 Crossing points (C_p) and bacterial loads (log₁₀ GU per test) showed a linear relationship over
209 5 log₁₀ units, between 250 GU/test and 2.5×10⁷ GU/test. This detection limit was not altered
210 in the presence of 300–350 ng of human DNA extracted from sterile vascular tissue.

211 The qPCR_FtyrA allowed specific detection of *gyrA* DNA from *F. tularensis* subsp.

212 *holartctica* and *F. novicida* strains, but not from the 34 strains belonging to other genera.

213 Testing control strains in each run allowed us to establish the intra- and inter-assay variability
214 of the qPCR_FtyrA assay. For each *gyrA* QRDR genotype, we calculated the mean ± 3 SD of
215 the T_m obtained for 12 replicates (Table 5). No overlap was observed between the T_m

216 intervals of the different wild-type and mutated *gyrA* QRDR alleles. The target T_m and their
217 confidence intervals were then used as interpretative criteria of qPCR_FtyrA tests (Table 5).

218 We also determined that a mixed population of FthLVS and Fth1P14 strains could be

219 differentiated by their T_m in a relative quantitative ratio of 1:10 and at minimum

220 concentrations of 1300 GU/test for each strain. Surprisingly, for fluoroquinolone-susceptible

221 strains of *F. tularensis*, a low DNA load (< 26,000 GU/test for FthLVS) was associated with a

222 bimodal melting curve, with a second melting peak between 61.2 and 63.1°C. To overcome

223 this problem, we performed a nested PCR protocol, which allowed reversion of the bimodal

224 melting curves to a single peak with the expected T_m value.

225

226 *In vitro selection for fluoroquinolone resistance in F. tularensis subsp. holarctica LVS*

227 Of the 18 FthLVS-derived lineages, 15 (83.3%) developed higher resistance to ciprofloxacin
228 after only two passages, with MICs ranging from 0.064 to 1 mg/L (Figure 1). Ten (55.6%)
229 showed a significant T_m decrease with the qPCR_{FtyrA} assay. A *gyrA83* mutation was found
230 for five strains (T_m, 62–62.7°C) and a *gyrA87* mutation for the other five (T_m, 64.8–65.2°C)
231 (Table 2). Thus, a *gyrA* QRDR mutation was involved in the early step to fluoroquinolone
232 resistance selection in ten (55.5%) of the 18 lineages.

233

234 *Phenotypic and genetic traits of the 42 clinical isolates of F. tularensis subsp. holarctica*

235 The 42 clinical isolates of *F. tularensis* were susceptible to fluoroquinolones (Table 2), with
236 MIC₉₀ values of 0.064 mg/L, 0.064 mg/L and 0.125 mg/L for ciprofloxacin, levofloxacin and
237 moxifloxacin, respectively. MIC₉₀ values were 0.5 mg/L (range, 0.125–0.5 mg/L) for
238 gentamicin, 1 mg/L (0.25–1 mg/L) for doxycycline and 8 mg/L (2–16 mg/L) for erythromycin
239 compatible with biovar 1 of *F. tularensis* subsp. *holarctica*. The 42 strains displayed a single
240 qPCR_{FtyrA} melting peak (66.8–67.7°C) in favour of a wild-type *gyrA* QRDR allele. Their
241 *gyrA* and *gyrB* QRDR sequences did not reveal any mutation compared to the FthLVS wild-
242 type sequences.

243

244 *qPCR_{FtyrA}, and gyrA and gyrB QRDR testing for clinical samples.*

245 A *F. tularensis gyrA* QRDR was detected by qPCR_{FtyrA} in 62 (75.6%) of the 82 samples
246 tested, with a single melting peak (T_m, 66.6–67.4°C) for eight samples compatible with a
247 wild-type *gyrA* QRDR allele. A bimodal melting curve suggesting low *F. tularensis* DNA
248 loads was observed for the remaining 54 specimens. Hence, the mean C_p for the single and
249 bimodal melting curves were 25.7 and 33.2 cycles, respectively ($p=0.001$).

250 To increase the sensitivity of *gyrA* QRDR detection in clinical samples, we retested 74
251 clinical samples using a nested-PCR protocol, including the 20 negative-qPCR *gyrA*
252 samples and the 54 specimens with a bimodal melting curve. A *gyrA* QRDR was detected for
253 64 (86.5%) of these 74 specimens, and a single melting peak (66.8–67.6°C) compatible with a
254 wild-type *gyrA* QRDR was obtained for 60 (93.7%).
255 Direct PCR amplification and sequencing of the *gyrA* and *gyrB* QRDRs was obtained for 16
256 clinical samples from 14 group B1 patients, but no mutation was identified.

257

258 ***Correlation between treatment failures and relapses, and *gyrA* QRDR mutations.***

259 Treatment failures or relapses were recorded in 11 (26.2%) of the 42 group A patients.
260 Treatment failure corresponded to persistent *F. tularensis* bacteraemia after 8 days of
261 ofloxacin treatment for one patient and lymph node suppuration after 2 weeks of
262 ciprofloxacin treatment in another patient. All group B1 patients were considered
263 fluoroquinolone treatment failures or relapses, since clinical samples were collected following
264 fluoroquinolone therapy because of lymph node suppuration (14/15) or persistent fever (one
265 case). Among group B2 patients, 40 out of 55 (72.7%) experienced treatment failures or
266 relapses with lymph node suppuration (39/40), psoas abscess (one case) or pleurisy (one
267 case). However, only 16 out of 40 patients had received a fluoroquinolone treatment (15 cases
268 of lymph node suppurations and one of psoas abscess). Given that fluoroquinolone-resistant
269 mutants of *F. tularensis* were not detected in our cohort of tularaemia patients, no correlation
270 could be established between fluoroquinolone resistance and treatment failures or relapses.

271

272 **DISCUSSION**

273 Treatment failures and relapses are still frequently observed in tularaemia patients after
274 administration of a tetracycline or a fluoroquinolone.^{4,5} No acquired resistance to these

275 antibiotics has been characterized so far in natural strains of *F. tularensis*,^{9–12,24,25} although a
276 human isolate with a subtle increase in levofloxacin MIC has recently been reported.²⁹
277 However, since *F. tularensis* culture is fastidious, isolation of this bacterium from clinical
278 samples is rare, especially when antibiotics have been administered.^{4,5} In France, we
279 collected 42 *F. tularensis* subsp. *holartica* strains over a 9-year period, while more than 400
280 tularaemia cases were reported to the Institut de Veille Sanitaire (InVS) during the same
281 period.³⁰ Therefore, detection of antibiotic resistance emergence in this pathogen is
282 challenging.
283
284 In the present study, we reassessed the presence of fluoroquinolone-resistant mutants of *F.*
285 *tularensis* in infected patients by testing two hypotheses: 1/ human infection with a
286 fluoroquinolone-resistant strain of *F. tularensis* from animal or environmental sources and 2/
287 *in vivo* selection of fluoroquinolone-resistant mutants of *F. tularensis* during antibiotic
288 therapy. We used phenotypic and genetic tests to evaluate the presence of such mutants
289 among our collection of human strains of *F. tularensis*, but also directly in clinical samples
290 collected from tularaemia patients before or after fluoroquinolone therapy. Since previous *in*
291 *vitro* experiments had revealed that *F. tularensis* could develop fluoroquinolone resistance
292 owing to mutations in DNA gyrase-encoding genes (*gyrA* and *gyrB*),^{20–22} as for many other
293 Gram-negative bacteria,³¹ our strategy was focused on detection of such mutants. Moreover,
294 we developed a qPCR_FgyrA assay targeting mutations at the “hot spot” amino acids 83 and
295 87 of the *F. tularensis* *gyrA* QRDR, because these mutations occurred early during the
296 selection process to fluoroquinolone resistance and were associated with high-level resistance
297 to these antibiotics.^{20–22} These findings were further confirmed in the present study by
298 founding 18 new fluoroquinolones resistant lineages. Mutations at either *gyrA*83 or *gyrA*87
299 codon positions were found in 15 mutants after only two passages in the presence of

300 ciprofloxacin. The qPCR_FgyrA assay developed was able to detect and differentiate the
301 *gyrA83* and *gyrA87* mutations, and even their combination, including in clinical samples with
302 low *F. tularensis* DNA load. It is a valuable tool for early detection of such resistance,
303 especially in the context of bioterrorism.

304

305 To explore the hypothesis of human infection with fluoroquinolone-resistant strains of *F.*
306 *tularensis*, we tested 42 clinical isolates collected in 42 tularaemia patients at the early stage
307 of their disease, and before any antibiotic treatment in 40 cases. Treatment failures and
308 relapses were recorded in 11 (26.2%) out of the 42 patients during the course of the disease.
309 All the 42 *F. tularensis* strains were susceptible to fluoroquinolones, with MICs within the
310 range of those previously reported.⁹⁻¹² All of them displayed a wild-type *gyrA* QRDR melting
311 curve profile with the qPCR_FgyrA assay, and wild-type *gyrA* and *gyrB* QRDR sequences.
312 These results clearly show that the occurrence of complications and the clinical response to
313 antibiotic treatment could not be predicted by antibiotic resistance in the infecting *F.*
314 *tularensis* strains. The reservoir of *F. tularensis* tularaemia mainly comprises wild fauna,
315 including hares, small rodents and ticks.³ This reservoir is usually not in contact with
316 antibiotics, especially synthetic ones such as the fluoroquinolones. This step also allowed us
317 to validate the qPCR_FgyrA assay by comparing the results of melting curves with *gyrA*
318 QRDR sequences.

319

320 The second hypothesis of *in vivo* selection of fluoroquinolone-resistant mutants of *F.*
321 *tularensis* was evaluated by testing 82 clinical samples collected from 70 tularaemia cases for
322 diagnostic confirmation and/or because of the need for surgical removal of suppurated tissues.
323 Detection of *F. tularensis gyrA83* or *gyrA87* mutations was more likely in clinical samples
324 from group B1 compared to group B2 patients, because only the former had received a

325 fluoroquinolone treatment before sampling. All these samples contained *F. tularensis* subsp.
326 *holarctica* DNA, as evidenced by a positive qPCR targeting the *ISFtu2* and amplification and
327 sequencing of the 16S-23S rRNA intergenic region.⁷ Fluoroquinolone treatment failures or
328 relapses were recorded in 15 group B1 patients and 16 group B2 patients. The qPCR_{FgyrA}
329 melting profile corresponded to a wild-type *gyrA* QRDR for 72 (87.8%) of the 82 clinical
330 samples, including 32 samples from patients experiencing fluoroquinolone treatment failure
331 or relapse. We found bimodal melting curves for samples containing small amounts of *F.*
332 *tularensis* DNA, but a nested-PCR protocol allowed us to obtain single-peak profiles
333 suggestive of wild-type *gyrA* QRDR alleles. Given that the qPCR_{FgyrA} assay could detect
334 fewer than 10% *gyrA* QRDR mutants in a mixed *F. tularensis* wild-type mutant population,
335 the presence of *gyrA* mutants in tissue samples at a clinically significant level was unlikely.
336 We further evaluated the presence of *gyrA* or *gyrB* QRDR mutations in 16 clinical samples
337 from 14 group B1 patients, but only wild-type genotypes were detected.

338
339 In conclusion, this study demonstrates that mutational events resulting in high-level resistance
340 to fluoroquinolones in *F. tularensis* are unlikely to occur in the natural animal and
341 environmental reservoirs of *F. tularensis*, and in infected humans treated with these
342 antibiotics. We found no *gyrA* or *gyrB* QRDR mutations in *F. tularensis* strains infecting
343 humans either at the early stage of infection or after *in vivo* antibiotic pressure, although these
344 mutations are the most frequent and clinically significant fluoroquinolone resistance
345 mechanisms. Therefore, acquired resistance to fluoroquinolones is unlikely to explain the
346 frequent treatment failures and relapses observed in tularaemia patients treated with these
347 antibiotics.

348

349

350 **ACKNOWLEDGEMENTS**

351 The authors acknowledge the Institut National de Veille Sanitaire, the Direction Générale de
352 l'Armement, the Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, the University Grenoble
353 Alpes for funding. They also thank Linda Northrup for editing the manuscript.

354

355 **FUNDING**

356 This work was supported by the Institut National de Veille Sanitaire (InVS), the Direction
357 Générale de l'Armement (DGA, grant number 07CO301), the Centre Hospitalier
358 Universitaire Grenoble Alpes, and the University Grenoble Alpes.

359

360 **TRANSPARENCY DECLARATIONS**

361 None to declare.

362

363 **AUTHORS' CONTRIBUTION**

364 MM and VS designed the experiments and wrote the manuscript; VS founded the bacterial
365 lineages from the LVS strain; VS and GH developed the qPCR_{F_{tyrA}} assay and tested the
366 clinical strains and human samples; VS and YC performed antibiotic susceptibility testing;
367 VS and YC performed PCR amplification and DNA sequencing experiments.

368

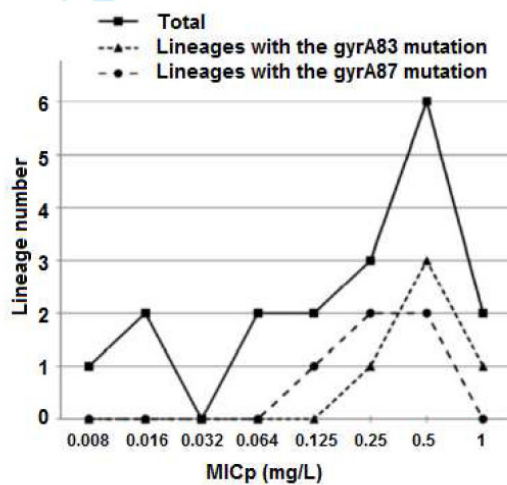
369 REFERENCES

- 370 1. World Health Organization. *WHO guidelines on tularaemia*. WHO Press, Geneva,
371 Switzerland; 2007.
- 372 2. Oyston PCF, Sjøstedt A, Titball RW. Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in
373 *Francisella tularensis*. *Nat Rev Microbiol* 2004; **2**: 967–78.
- 374 3. Sjøstedt A. Tularemia: history, epidemiology, pathogen physiology, and clinical
375 manifestations. *Ann N Y Acad Sci* 2007; **1105**: 1–29.
- 376 4. Hepburn MJ, Simpson AJH. Tularemia: current diagnosis and treatment options. *Expert
377 Rev Anti Infect Ther* 2008; **6**: 231–40.
- 378 5. Tärnvik A, Chu MC. New approaches to diagnosis and therapy of tularemia. *Ann N Y Acad
379 Sci* 2007; **1105**: 378–404.
- 380 6. Evans ME, Gregory DW, Schaffner W, McGee ZA. Tularemia: a 30-year experience with
381 88 cases. *Medicine (Baltimore)* 1985; **64**: 251–69.
- 382 7. Maurin M, Pelloux I, Brion JP, Del Bando J-N, Picard A. Human tularemia in France, 2006-
383 2010. *Clin Infect Dis* 2011; **53**: e133–41.
- 384 8. Feldman KA, Ensore RE, Lathrop SL, *et al*. An outbreak of primary pneumonic tularemia
385 on Martha's Vineyard. *N Engl J Med* 2001; **345**: 1601–6.
- 386 9. Johansson A, Urich SK, Chu MC, Sjøstedt A, Tärnvik A. *In vitro* susceptibility to
387 quinolones of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *Scand J Infect Dis* 2002; **34**: 327–
388 30.
- 389 10. Urich SK, Petersen JM. *In vitro* susceptibility of isolates of *Francisella tularensis* types A
390 and B from North America. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 2276–8.
- 391 11. Yesilyurt M, Kiliç S, Celebi B, *et al*. Antimicrobial susceptibilities of *Francisella
392 tularensis* subsp. *holarctica* strains isolated from humans in the Central Anatolia region of
393 Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 2588–92.
- 394 12. Origi FC, Frey J, Pilo P. Characterisation of a new group of *Francisella tularensis* subsp.
395 *holarctica* in Switzerland with altered antimicrobial susceptibilities, 1996 to 2013. *Euro
396 Surveill* 2014; **19**. pii : 20858.
- 397 13. Maurin M, Mersali NF, Raoult D. Bactericidal activities of antibiotics against intracellular
398 *Francisella tularensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 3428–31.
- 399 14. Sutura V, Caspar Y, Boisset S, Maurin M. A new dye uptake assay to test the activity of
400 antibiotics against intracellular *Francisella tularensis*. *Front Cell Infect Microbiol* 2014; **4**:
401 36.
- 402 15. Nelson M, Lever MS, Dean RE, Pearce PC, Stevens DJ, Simpson AJH. Bioavailability
403 and efficacy of levofloxacin against *Francisella tularensis* in the common marmoset
404 (*Callithrix jacchus*). *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 3922–6.

- 405 16. Piercy T, Steward J, Lever MS, Brooks TJG. In vivo efficacy of fluoroquinolones against
406 systemic tularemia infection in mice. *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**: 1069–73.
- 407 17. Rotem S, Bar-Haim E, Cohen H, *et al*. Consequences of Delayed Ciprofloxacin and
408 Doxycycline Treatment Regimens against *Francisella tularensis* Airway Infection.
409 *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 5406–8.
- 410 18. Pérez-Castrillón JL, Bachiller-Luque P, Martín-Luquero M, Mena-Martín FJ, Herreros V.
411 Tularemia epidemic in northwestern Spain: clinical description and therapeutic response. *Clin*
412 *Infect Dis* 2001; **33**: 573–6.
- 413 19. Meric M, Willke A, Finke E-J, *et al*. Evaluation of clinical, laboratory, and therapeutic
414 features of 145 tularemia cases: the role of quinolones in oropharyngeal tularemia. *APMIS*
415 2008; **116**: 66–73.
- 416 20. Sutura V, Levert M, Burmeister WP, Schneider D, Maurin M. Evolution toward high-
417 level fluoroquinolone resistance in *Francisella* species. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**:
418 101–10.
- 419 21. Loveless BM, Yernakova A, Christensen DR, *et al*. Identification of ciprofloxacin
420 resistance by SimpleProbe, High Resolution Melt and Pyrosequencing nucleic acid analysis in
421 bioterror agents: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* and *Francisella tularensis*. *Mol Cell*
422 *Probes* 2010; **24**: 154–60.
- 423 22. La Scola B, Elkarkouri K, Li W, *et al*. Rapid comparative genomic analysis for clinical
424 microbiology: the *Francisella tularensis* paradigm. *Genome Res* 2008; **18**: 742–50.
- 425 23. Hotta A, Fujita O, Uda A, *et al*. In vitro antibiotic susceptibility of *Francisella tularensis*
426 isolates from Japan. *Jpn J Infect Dis* 2013; **66**: 534–6.
- 427 24. Georgi E, Schacht E, Scholz HC, Splettstoesser WD. Standardized broth microdilution
428 antimicrobial susceptibility testing of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strains from
429 Europe and rare *Francisella* species. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 2429–33.
- 430 25. Kreizinger Z, Makrai L, Helyes G, Magyar T, Erdélyi K, Gyuranecz M. Antimicrobial
431 susceptibility of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strains from Hungary, Central
432 Europe. *J Antimicrob Chemother* 2013; **68**: 370–3.
- 433 26. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial*
434 *Suceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement M100-S19*. CLSI, Wayne, PA,
435 USA, 2009.
- 436 27. Tomaso H, Dahouk S Al, Hofer E, *et al*. Antimicrobial susceptibilities of Austrian
437 *Francisella tularensis holarctica* biovar II strains. *Int J Antimicrob Agents* 2005; **26**: 279–84.
- 438 28. Gestin B, Valade E, Thibault F, Schneider D, Maurin M. Phenotypic and genetic
439 characterization of macrolide resistance in *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* biovar I. *J*
440 *Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 2359–67.
- 441 29. Weile J, Seibold E, Knabbe C, Kaufmann M, Splettstoesser W. Treatment of tularemia in
442 patient with chronic graft-versus-host disease. *Emerg Infect Dis* 2013; **19**: 771–3.

- 443 30. Mailles A, Vaillant V. 10 years of surveillance of human tularaemia in France. *Euro*
444 *Surveill* 2014; **19**: 20956.
- 445 31. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased
446 accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 2003; **51**: 1109–17.
- 447 32. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* 2005; **41 Suppl 2**:
448 S120–6.
- 449 33. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated
450 quinolone resistance. *Lancet Infect Dis* 2006; **6**: 629–40.
- 451 34. Almahmoud I, Kay E, Schneider D, Maurin M. Mutational paths towards increased
452 fluoroquinolone resistance in *Legionella pneumophila*. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**:
453 284–93.
- 454 35. Lee JK, Lee YS, Park YK, Kim BS. Alterations in the GyrA and GyrB subunits of
455 topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-
456 resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 2005; **25**: 290–
457 5.
- 458 36. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in
459 *Escherichia coli* and *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents* 2005; **25**:
460 358–73.
- 461 37. LeBlanc JJ, Campbell S, Pettipas J, Hachette TF, Davidson RJ. Herpes simplex virus
462 type 2 displays atypical melting-temperature profiles at low viral titers. *J Clin Microbiol*
463 2008; **46**: 2786–9.
- 464 38. Champion MD, Zeng Q, Nix EB, *et al*. Comparative genomic characterization of
465 *Francisella tularensis* strains belonging to low and high virulence subspecies. *PLoS Pathog*
466 2009; **5**: e1000459.
- 467 39. Oliver JD. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria.
468 *FEMS Microbiol Rev* 2010; **34**: 415–25.
- 469 40. Forsman M, Henningson EW, Larsson E, Johansson T, Sandström G. *Francisella*
470 *tularensis* does not manifest virulence in viable but non-culturable state. *FEMS Microbiol*
471 *Ecol* 2000; **31**: 217–24.
- 472 41. Sarathy J, Dartois V, Dick T, Gengenbacher M. Reduced drug uptake in phenotypically
473 resistant nutrient-starved nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents*
474 *Chemother* 2013; **57**: 1648–53.
- 475
- 476

477 **Figure 1:** Distribution of 18 independent lineages (filled squares) derived from *F. tularensis*
478 subsp. *holartctica* LVS after two passages in the presence of ciprofloxacin, according to the
479 MIC of the bacterial population (MICp) and the presence of *gyrA83* (filled triangles) or
480 *gyrA87* (filled circles) mutations.
481



482

483

484

485

486 **Table 1.** Distribution of tularaemia patients from groups A, B1 and B2, according to sex, age,
487 clinical forms and collected samples.

488

Patient groups		A	B1	B2
Number, sex ratio		42, 3.7	15, 1.1	55, 1.1
Mean age, SD (years)		60.6, 18.5	48.3, 17.8	52.7, 18.2
Clinical form	Ulceroglandular	12	6	16
	Glandular	3	5	19
	Oropharyngeal	7	1	15
	Oculoglandular	2	1	3
	Pneumonic	8	1	2
	Typhoidal	10	1	0
Clinical sample for isolation or DNA detection of <i>F. tularensis</i>	Lymph node tissue	6	9	39
	Lymph node suppuration	0	9	13
	Skin ulcer exudate	4	0	1
	Subcutaneous abscess	5	0	0
	Psoas abscess	0	1	0
	Pharyngeal exudate	3	0	5
	Ear exudate	2	0	0
	Conjunctival exudate	2	0	1
	Pleural fluid	2	0	1
	Cerebrospinal fluid	1	0	0
	Blood	17	0	0
	Serum	0	1	2
Fluoroquinolone treatment before sampling		2/42	15/15	0/55
Fluoroquinolone treatment failure or relapse		2/42	15/15	16/55

489

490

491 **Table 2: Fluoroquinolone MICs (mg/L) for *F. tularensis* strains tested in this study.**

492

Strains	Ciprofloxacin	Levofloxacin	Moxifloxacin
<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> live vaccine strain (FthLVS)	0.016	0.016	0.032
<i>Francisella novicida</i> strain CIP 56.12	0.064	0.064	0.125
Fth1P14 (<i>gyrA83</i> mutation, T83I amino acid change)	32	32	32
Fth2P14 (<i>gyrA83</i> and <i>gyrA87</i> mutations, T83K and D87Y amino acid changes)	32	32	64
Fno1P14 (<i>gyrA87</i> mutations, D87Y amino acid change)	32	32	64
5 LVS-derived lineages with <i>gyrA83</i> mutation (MICp)	0.25–1		
5 LVS-derived lineages with <i>gyrA87</i> mutation (MICp)	0.125–0.5		
42 Clinical strains of <i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i>	0.016–0.062	0.032–0.062	0.125–0.25

493

494

495 **Table 3. Strains belonging to genera other than *Francisella* used in this study for**
 496 **qPCR*F*gyrA specificity testing.**

497

Groups (n)	Species
<i>Staphylococcus</i> (13)	<i>S. aureus</i> , <i>S. warneri</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. caprae</i> , <i>S. lugdunensis</i> , <i>S. capitis</i> , <i>S. auricularis</i> , <i>S. schleiferi</i> , <i>S. hominis</i> , <i>S. haemolyticus</i> , <i>S. colmii</i> and <i>S. intermedius</i>
<i>Streptococcus</i> (3)	<i>S. pneumoniae</i> , <i>S. pyogenes</i> and <i>S. mitis</i>
<i>Enterobacteriaceae</i> (4)	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> and <i>Serratia marcescens</i>
<i>Mycobacterium</i> (6)	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. avium</i> , <i>M. intracellulare</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. goodii</i> and <i>M. xenopi</i>
Others (8)	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Corynebacterium striatum</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , and <i>Bartonella henselae</i>

498

499

500

501

502

503

504

505 **Table 4: Primers and probes for DNA sequencing and real-time PCR assay**

Name	DNA sequence (5' to 3')	Target gene, amplicon size	Annealing temperature
Fth/Fno gyrA1-Fw*	aggaaaatctggagctggaa	gyrA, 740 bp	50.5°C
Fth/Fno gyrA1-Rv*	tgaatggattgctaaagagtc		
Fth/Fno gyrB3-Fw	agcttctcaggatacgtt	gyrB, 773 bp	49°C
Fth/Fno gyrB3-Rv	tcagctgtagagtcattagta		
qPCRfgyrA-Fw	ccatcgtcgtacttttgc	gyrA, 219 bp	60°C
qPCRfgyrA-Rv	ggagaatcaccatcaacagaacc		
qPCRfgyrA Anchor probe	gggttgctcggatgtaatcgtaaatc-Fluorescein		
qPCRfgyrA Sensor probe	LC640-cctcatggagatacagctgtttacgatacta-P		
Fth gyrB-Fw1330	aggtagctacgctcattaaagc	gyrB, 267 bp	63°C
Fth gyrB-Rv1596	attctgccaagcatcttcatctt		

506 *: Fw and Rv, forward and reverse primers, respectively.

507

508

509

510 **Table 5: Inter-assay variability for RT-PCR-FtgyrA in 12 independent replicates and**
511 **interpretative boundaries**

	FthLVS	Fth1P14	Fth2P14	Fno1P14
Mean Tm (°C)	67.4	62.9	58.5	65.4
Standard deviation	0.3	0.3	0.3	0.3
Lower interpretative Tm*	66.5	62	57.7	64.5
Higher interpretative Tm*	68.4	63.7	59.4	66.2

512 * Lower and higher interpretative Tm correspond to mean Tm \pm 3 SD.

513
514
515
516

4 Recherche et évaluation des impacts phénotypiques des cibles génétiques secondaires dans l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones chez *F. tularensis* subsp. *holarctica*

4.1 Résumé

4.1.1 Objectifs

F. tularensis est l'agent causal de la tularémie. Cette zoonose endémique de l'hémisphère Nord se présente sous diverses formes cliniques. Les plus fréquentes dites « ganglionnaires » se manifestent souvent par les symptômes suivants : un syndrome pseudo-grippal, une forte asthénie, et une adénopathie associée ou non à des lésions au point d'inoculation de la bactérie. Il est recommandé de traiter ces formes de sévérité moyenne à modérée par l'administration de fluoroquinolones ou de tetracyclines. Cependant, un taux important de rechute et d'échecs thérapeutiques est observé malgré un traitement antibiotique adapté. Nous avons avec d'autres équipes, étudié la possibilité de l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones chez *F. tularensis* pour expliquer ce phénomène.

A ce jour, nous avons pu mettre en évidence la capacité de la bactérie à évoluer *in vitro* vers un haut niveau de résistance aux fluoroquinolones. L'augmentation du niveau de résistance est corrélée dans ces lignées à l'accumulation de mutations dans les gènes codant pour les topoïsomérase de type II. Ces travaux ont montré l'importance de la mutation du gène *gyrA* codant pour la sous-unité A de l'ADN gyrase, les modifications impactant les acides aminés en position 83 et 87 étant d'apparition précoce dans le processus évolutif et présentes chez l'ensemble des mutants présentant un niveau de résistance cliniquement significatif. La recherche de mutants résistants sur des souches et des échantillons provenant de patients atteints de tularémie (pré- et post-traitement antibiotique) s'est avérée infructueuse.

Le but de la présente étude est de tirer parti des lignées d'évolution précédemment propagée à partir de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (*cf.* section **TRAVAUX SCIENTIFIQUES**, paragraphe 2.1.2 pour 1/ mettre en évidence les gènes modifiés lors de l'évolution vers un haut niveau de résistance aux

fluoroquinolones hors topoïsomérasés de type II ; et 2/ mesurer leur impact phénotypique sur le niveau de résistance antibiotique et la capacité de multiplication intra-macrophagique de *F. tularensis*.

4.1.2 Méthode

Afin d'identifier un maximum de mutations apparues au cours du processus évolutif dans l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones chez *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, nous avons sélectionné 114 clones au cours de l'évolution des 3 lignées propagées sur 14 étapes (64 pour la lignée Fth1, et 25 pour les lignées Fth2 et Fth3). La CMI de la ciprofloxacine a été déterminée pour l'ensemble des clones sélectionnés. Nous avons ensuite réalisé le séquençage du génome complet d'un clone par lignée, isolé à l'étape finale du processus évolutif, ainsi que celui de la souche initiatrice des lignées. Les mutations d'intérêts (non présentes sur la souche de départ) alors identifiées ont été recherchées par séquençage sur l'ensemble des clones de la lignée. Les données de l'étape d'isolement, de CMI et de séquençage ont ainsi permis l'élaboration d'arbres phylogéniques. Nous avons alors sélectionné un clone en fin de branche, présentant une CMI supérieure d'au moins quatre fois au nœud précédant non corrélé à l'apparition d'une mutation complémentaire, et réalisé le séquençage de son génome complet. Les mutations ainsi identifiées ont ensuite été recherchées sur l'ensemble des souches précédant ce clone final dans le processus évolutif.

Cette procédure a permis *in fine* l'établissement d'arbres phylogénétiques regroupant les clones par groupes homogènes de niveau de résistance à la ciprofloxacine et de génotypes pour les mutations recherchées. L'analyse de ces arbres couplée à une étude bibliographique et bioinformatique des gènes mutés a permis le classement en trois catégories des mutations d'intérêts identifiées : gènes potentiellement directement impliqués dans la résistance, gènes potentiellement impliqués de manière indirecte dans la résistance, gènes dont l'implication dans la résistance est peu probable.

Nous avons de plus déterminé la capacité de multiplication intracellulaire pour un clone de chaque groupe phylogénique identifié dans la lignée Fth1. Pour cela, nous avons utilisé comme modèle la lignée immortalisée de macrophage-like murins J774-A1 et mesuré la capacité de multiplication intracellulaire en comparant la numération à 1 heure et 24 heures post-infection sur un essai d'infection avec

protection par la gentamicine.

Enfin, le séquençage de la souche initiatrice des différentes lignées et de la population de départ a mis en évidence un polymorphisme génétique de la population stock de la souche *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS sur le locus *FTL_0057*. Nous avons dans un premier temps sélectionné 19 clones issus de la solution stock et déterminé la séquence pour le locus incriminé. Nous avons également initié 36 lignées d'évolution courte (2 étapes), 18 en présence et 18 en absence de ciprofloxacine pour évaluer l'impact de ce polymorphisme sur le processus de sélection. Un clone a été isolé à chaque étape finale et séquencé sur la région mutée du locus *FTL_0057*.

4.1.3 Résultats

La comparaison des séquences obtenues par whole-genome sequencing (WGS) pour les mutants finaux et la souche de départ (FthLVS-PS), initiatrice des lignées d'évolution avec le génome de référence de *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS (NC_007880.1) a montré des différences génétiques sur 5 loci : 3 incriminés dans l'atténuation de la virulence de la souche vaccinale (*FTL_0057*, *FTL_0133* et *FTL_1773*), un dans une séquence d'insertion *Isftu2* et un dans une région inter-génique. Le séquençage de ces loci sur la population stock est identique pour 4 d'entre eux avec FthLVS-PS. Pour le 5^{ème} Locus (*FTL_0057*) le séquençage de la solution stock présente un double pic sur le nucléotide 476 (476G>K) alors que FthLVS-PS présente une mutation en position 544G>T, comparé au génome de référence. La sélection de 19 clones issus de la solution stock a permis la mise en évidence de 6 génotypes pour ce locus, un majoritaire représentant 47,3% de la population avec une mutation 476G>T, et 5 mineurs (entre 5,3 et 15,8%) dont un correspondant au génotype de FthLVS-PS. L'évolution en milieu liquide avec et sans ciprofloxacine ne modifie pas la proportion de clones isolés pour le génotype majeur. En revanche, le génotype mineur de FthLVS-PS semble plus fréquent dans le modèle de sélection en milieu liquide avec antibiotique que sans (33,3 et 16,7% respectivement). Notons que ces différents génotypes ne sont pas corrélés à des variations du niveau de résistance aux fluoroquinolones.

Les mutations d'intérêt détectées sur l'ensemble des mutants séquencés sont au nombre de 28. La moitié impacte les gènes codant pour les topoisomérases de type II. Les résultats obtenus confirment les résultats observés précédemment à

savoir : les mutations sur *gyrA83* apparaissent précocement dans le processus évolutif et sont associés à des niveaux de résistance importants (augmentation moyenne de 64 fois la CMI pour la ciprofloxacine). Les autres mutations sur les gènes codant pour l'ADN gyrase (*gyrA87* et *gyrB*), et la topoisomérase IV (*parC* et *parE*) sont associées à de faibles augmentations de CMI des fluoroquinolones, consolidant la résistance en fin de processus évolutif. Nous avons cependant observé l'apparition précoce d'une mutation *gyrB*, initiatrice de l'émergence de la résistance dans une lignée.

Huit mutations d'intérêt impactent le locus *FTL_0439*. Ce locus code pour une protéine chimère baptisée FupA/B, impliquée dans le transport du fer. Elle est issue de la fusion de deux gènes adjacents résultant d'une délétion de 1480pb, spécifique à la souche vaccinale (RD18). Ces modifications génétiques, entraînant majoritairement des modifications du cadre de lecture, sont associées à une augmentation modérée de la résistance à la ciprofloxacine (2 à 16mg/L).

Les 7 derniers gènes d'intérêt ont été identifiés une seule fois dans les 3 lignées. Trois sont potentiellement impliqués directement dans la résistance aux fluoroquinolones. Ces trois loci *FTL_0624*, *FTL_0024* et *FTL_1936* participent au transport transmembranaire. Ils codent respectivement pour la partie transmembranaire d'un système d'efflux de type ABC, une sérine perméase et la protéine de fixation du substrat d'un système importateur de type ABC. L'apparition de la mutation sur le locus *FTL_0624* est associée à une augmentation de 8 fois la CMI pour la ciprofloxacine. Présente dès la première étape de sélection dans la lignée Fth2, elle est associée à une mutation *gyrA83* dans la même étape de sélection. Les mutations sur les loci *FTL_0024* et *FTL_1936* émergent simultanément avec une troisième mutation. L'apparition de ces trois modifications sur un mutant portant déjà une mutation *gyrA83* est corrélée avec une augmentation de 4 fois la CMI pour la ciprofloxacine.

Les modifications des deux loci *FTL_0594* et *FTL_0917* sont potentiellement impliquées indirectement dans l'émergence de la résistance. Le premier locus code pour une enzyme ayant une activité de glycosylation au niveau du périplasme. Elle est notamment impliquée dans la glycosylation de DsbA qui joue un rôle majeur dans l'établissement de la structure secondaire des protéines par l'établissement de ponts di-sulfures. Cette activité prenant place au niveau périplasmique, elle a été

associée à une altération de l'établissement de systèmes transmembranaires sécréteurs. Le second locus code pour un « Transcription repair coupling factor ». Emergeant dans la lignée Fth1, son apparition est associée à une augmentation de la variabilité des clones descendant de cet ancêtre (5), comparé aux autres clones de niveau équivalent de résistance pour la même lignée (0 à 1 descendant par ancêtre détecté). Ce profil « hypermutateur » déjà observé chez *E. coli*, pourrait favoriser la sélection de clones résistants.

Enfin, l'implication des mutations sur les deux derniers locus *FTL_0024* et *FTL_0402* dans la résistance aux fluoroquinolones est peu probable. Ils codent respectivement pour la protéine ribosomale S6 et un facteur de cloisonnement intracellulaire. Ces deux cibles n'ont pas été associées à la résistance aux fluoroquinolones.

Pour finir, l'étude de la capacité de multiplication intracellulaire sur les clones issus de la lignée Fth1a a montré que les mutations apparues sur les gènes codant pour les topoisomérases de type II ne modifient pas cette capacité. Seules les mutations entraînant une modification du cadre de lecture proche de l'extrémité N-terminale de la protéine ParE sont associées à une diminution significative de la capacité de multiplication intracellulaire (-0,26 à -0,45Log).

Concernant les mutations hors topoisomérases de type II, l'apparition de la mutation sur le locus *FTL_0917* n'est pas associée à une diminution de la capacité de multiplication intra-macrophagique. En revanche, les mutations introduites dans le locus *FTL_0439* sont toutes associées à une forte diminution de la capacité de multiplication intracellulaire (-0,98 à -2,31Log). FupA/B est liée au métabolisme du fer, essentiel pour la survie de la bactérie dans le compartiment intracellulaire. L'inactivation de ce gène par introduction de mutations entraînant une modification du cadre de lecture pourrait expliquer ce résultat.

4.1.4 Conclusion

Cette étude a permis de réaffirmer la place centrale des mutations impactant les topoisomérases de type II dans le processus d'évolution de *F. tularensis* vers un haut niveau de résistance aux fluoroquinolones. Elle a également confirmé l'importance des mutations entraînant la modification de l'acide aminé en position 83 dans l'acquisition d'un niveau de résistance cliniquement significatif.

Nous avons également mis en évidence dans ces travaux de nouveaux gènes cibles dont la mutation entraîne potentiellement une augmentation du niveau de résistance

aux fluoroquinolones. Ces gènes codent pour des protéines impliquées dans des systèmes de transport transmembranaire exportateurs ou importateurs.

Enfin, ces travaux ont révélé un nouveau gène cible majeur, *FTL_0439*, impliqué dans l'évolution du phénotype de résistance aux fluoroquinolones et la capacité de multiplication intracellulaire. *F. tularensis* a montré sa capacité à spontanément inverser ce phénotype par introduction d'une seconde mutation compensatrice dans ce même locus. Ces travaux ouvrent donc de nouvelles perspectives concernant l'étude de la cause des échecs thérapeutiques des patients atteints de tularémie.

4.2 Manuscrit en cours de finalisation, format JAC

1 **Further evaluation of genetic and phenotypic changes in fluoroquinolones**

2 **resistant mutants of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica***

3

4 **Sutera V.¹⁻³, Lopez F.⁴⁻⁶, Fernandez N.⁴⁻⁶, Schneider D.^{2,3} and Maurin M.¹⁻³**

5 ¹Centre National de Référence des Francisella, Laboratoire de Bactériologie, Institut de
6 Biologie et de Pathologie, CHU Grenoble Alpes, CS 10217, 38043 Grenoble, France;

7 ²Laboratoire TIMC-IMAG, Université Grenoble Alpes, 38042 Grenoble Cedex 9, France;

8 ³CNRS, UMR 5525, Grenoble, France.

9 ⁴Inserm U1090, Technological Advances for Genomics and Clinics (TAGC), Marseille, F-
10 13009, France.

11 ⁵Aix-Marseille University UMR-S 1090, TAGC, Marseille, F-13009, France. ⁶TGML, IBiSA
12 platform, 13288, Marseille France.

13

14

15 **Corresponding author:**

16 Pr Max Maurin, Laboratoire de Bactériologie, Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble,
17 Université Joseph Fourier, CS 10217, 38043 Grenoble Cedex 9, France; Phone: +33 4 76 76
18 54 79; Fax: +33 4 76 76 52 28; E-mail: mmaurin@chu-grenoble.fr

19

20 **INTRODUCTION**

21 *Francisella tularensis* is a Gram-negative, facultative intracellular bacterium causing the
22 zoonosis tularaemia.¹ Because it is highly infectious in humans, it belongs to the class A
23 bioterrorism agent as defined by the CDC (Centers for Diseases Control and Prevention,
24 Atlanta, USA).² Two subspecies are responsible for most human tularaemia cases: *F.*
25 *tularensis* subsp. *tularensis* (type A strains) in North America, and *F. tularensis* subsp.
26 *holartctica* (type B strains) in the whole northern hemisphere.³ The clinical symptoms of
27 tularaemia are classically grouped into six clinical forms^{4,5} The ulceroglandular, and glandular
28 forms correspond to a regional lymphadenopathy with or without a detectable skin ulcer. The
29 oculoglandular and oropharyngeal forms correspond to a regional lymphadenopathy
30 associated with conjunctivitis or pharyngitis, respectively. In patients suffering from
31 lymphadenopathy, lymph node suppuration occurs in approximately 30% of cases. The
32 pneumonic form of tularaemia corresponds to primary lung infection by *F. tularensis* after
33 inhalation of a contaminated aerosol or to secondary lung involvement after haematogenous
34 spread of bacteria. The typhoidal form is a systemic disease with high fever and neurological
35 symptoms, but without overt portal of entry of bacteria and no lymphadenopathy. Severe and
36 fatal tularaemia cases are more frequently observed in patients infected with type A strains, in
37 immunocompromised patients, and in case of treatment delay.⁶

38 The antibiotic treatment of tularaemia is based on a few drugs, including the fluoroquinolones
39 (e.g., ciprofloxacin and levofloxacin), the tetracyclines (e.g., doxycycline) and the
40 aminoglycosides (only streptomycin and gentamicin).^{1,4-6} The fluoroquinolones are
41 considered the most appropriate treatment in patients with diseases of mild to moderate
42 severity, while the use of an aminoglycoside is restricted to severe forms of tularaemia
43 because of potential severe renal and cochlear toxicity.⁴⁻⁶ The fluoroquinolones are highly
44 active against *F. tularensis in vitro*,⁷⁻¹² including in cell systems,^{13,14} and in animal models.¹⁵⁻

45 ¹⁸ Their clinical usefulness in tularaemia patients has been extensively reported, but relapse
46 rates vary from 5% to more than 30% in patients with delayed treatment and/or altered
47 immune status.^{4,5,19,20}

48 The fluoroquinolones inhibit the type II topoisomerases, which are heterologous tetramers
49 composed of two subunits encoded by *gyrA* and *gyrB* genes for DNA gyrase, and *parC* and
50 *parE* genes for topoisomerase IV.²¹ These enzymes are involved in modifications of the
51 bacterial chromosome topology. The fluoroquinolones target the quinolone resistance
52 determining regions (QRDR) of the topoisomerases where interactions with DNA take
53 place.²¹ Mutations in the QRDR of topoisomerases genes are most frequently involved in
54 bacterial resistance to fluoroquinolones, and DNA gyrase is considered the primary target in
55 most Gram negative bacteria.²²⁻²⁵ Other mechanisms of fluoroquinolone resistance include
56 overexpression of efflux pumps, type II topoisomerases protection, and enzymatic
57 inactivation of these molecules²⁶.

58 No fluoroquinolone resistance has been characterized so far in natural strains of *F. tularensis*.
59 ⁷⁻¹² In contrast, fluoroquinolone resistant mutants of this species have been selected *in vitro*
60 ²⁷⁻²⁹. We previously reported the *in vitro* selection of three independent lineages of
61 fluoroquinolones resistant mutants from the attenuated Live Vaccine strain (LVS) of *F.*
62 *tularensis* subsp. *holarctica*²⁸. Fluoroquinolone resistance was mainly associated with
63 mutations in the topoisomerases encoding genes *gyrA*, *gyrB* and *parC*.²⁸ However, whole
64 genome sequencing of these mutants also revealed many other gene mutations. The purpose
65 of the present study was to extensively characterize all the genetic alterations that emerged in
66 *F. tularensis* during the selection process to fluoroquinolone resistance, and evaluate the
67 impact of these mutations on antibiotic resistance and intracellular multiplication capacity of
68 this pathogen. This could help us better understand the mechanisms underlying therapeutic
69 failure and relapses observed in tularaemia patients treated with these antibiotics.

70

71 **MATERIALS AND METHODS**

72 **Bacterial strains.**

73 We used fluoroquinolones resistant mutants derived from the LVS strain of *F. tularensis*
74 subsp. *holarctica*, as previously reported.²⁸ Briefly, we previously selected a single bacterial
75 clone (referred here as the FthLVS-PS for parental strain) from our FthLVS stock solution for
76 *in vitro* propagation in progressively increasing concentrations of ciprofloxacin. Three
77 independent lineages (Fth1, Fth2 and Fth3) were established after 14 passages.²⁸ For this
78 study, bacterial populations collected at different passages of the selection process (and kept
79 frozen at -80°C) were grown on antibiotic-free PolyViteX-enriched chocolate agar plates
80 (PVX-CHA, bioMérieux), incubated for 2–5 days at 37°C in a 5% CO₂ enriched atmosphere.
81 Then, 114 clones were selected at different passages for further characterization, including 64
82 clones for lineage Fth1, and 25 clones each for lineages Fth2 and Fth3. These clones were
83 named according to their lineage, passage number and sampling number. For example, the
84 clone Fth1P14V2 was the second clone sampled from lineage Fth1 at passage 14.
85 Additionally, we used four reference strains as controls for MICs determination: *Escherichia*
86 *coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC
87 27853, and *Staphylococcus aureus* ATCC29213 (Centre de Ressources Biologiques de
88 l'Institut Pasteur, Institut Pasteur, Paris, France). They were grown on Columbia agar
89 supplemented with 5% sheep blood (COS, bioMérieux) incubated at 37°C, for 24h.

90

91 **Characterization of the genetic alterations selected in fluoroquinolones resistant** 92 **mutants derived from FthLVS-PS.**

93 To characterize the genetic alterations that occurred during the fluoroquinolone resistance
94 selection process, we first determined the whole genome sequences of FthLVS-PS and

95 derived clones (Fth1P14V1, Fth2P14V1 and Fth3P14V1) obtained at the last (14th) passage of
96 the evolutionary experiments for lineages Fth1 to Fth3, respectively. For each lineage, we
97 then evaluated the presence of the characterized mutations in clones cultured from the
98 intermediate populations previously frozen during the selection process. Furthermore, when a
99 twofold or higher increase in ciprofloxacin MIC was observed during a passage but without
100 detection of any additional mutation in topoisomerases genes, a clone was selected from the
101 more resistant population for genome sequencing. The presence of the newly identified
102 mutations was then checked in the corresponding ancestor populations. In total, we tested 114
103 clones sub-cultured from the intermediate populations collected at different passages.
104 This strategy was designed to allow extensive characterization of fluoroquinolone resistance
105 mutations occurring during the selection process, including those that might not have been
106 fixed in the genomes of mutants obtained at passage 14. It also allowed us to assess the time
107 and order of appearance of the characterized gene mutations. Finally, we checked the
108 presence of all characterized mutations in the FthLVS stock solution.

109

110 ***F. tularensis* whole-genome and dye-terminator sequencing.**

111 The whole genome sequences of *F. tularensis* clones were determined using two platforms:
112 the the LifeTech SOLiD HQ5500XL platform and the LifeTech Ion torrent PGM platform.
113 Three genomes (clones Fth1P14V1, Fth2P14V1 and Fth3P14V1) were determined using
114 LifeTech SOLiD HQ5500XL sequencer, in single-end mode, with a length of 75bp. The
115 number of reads was 4,698,838 for Fth1P14V1, 6,219,012 for Fth2P14V1 and 9,497,380 for
116 Fth3P14V1. They were analyzed with the Lifescope software suite (v2.5.1) for mapping to the
117 *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* LVS NC_007880 genome sequence, downloaded
118 from the NCBI FTP site (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Bacteria/Francisella_tularensis_

119 holarctica_LVS_uid58595/NC_007880.fna). Detected variants were provided in a tabulated
120 text file. Non-synonymous mutations with coverages of at least 25 and ratios New/Ref above
121 33% were considered as significant.

122 Nine other genomes (clones FthLVS-PS, Fth1P14V3, Fth1P14V7, Fth1P14V12, Fth2P14V1,
123 Fth3P5V1, Fth3P12V1, Fth3P12V3, and Fth3P14V1) were determined on the LifeTech Ion
124 torrent PGM platform, using the Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit sample preparation
125 (Life Technologies), according to manufacturer's instructions. Ion Shear™ DNA
126 fragmentation incubation was 5 min to obtain 400 bp fragments purified using Agencourt
127 AMPure XP (Beckman Coulter, Inc.) beads-based size selection according to manufacturer's
128 instructions. Each library was barcoded using the Ion Xpress™ Barcode Adapters 1–16 Kit
129 (Life Technologies), according to manufacturer's instructions. After preparation, the libraries
130 were size selected from 300bp up to 500bp with Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter,
131 Inc.) according to manufacturer's instructions. The libraries were normalized at the same
132 concentration and then mixed. The emulsion PCR were performed with 25 µL of pooled
133 libraries (10pM) using the Ion PGMTM Template OT2 400 kit and the ONE TOUCH 2
134 system (Life Technologies). The libraries were sequenced on ION 318 Chip v2 (Life
135 Technologies) using the Ion PGM Sequencing 400 kit (Life Technologies).

136 We obtained a total of 4,187,040 reads with a mean length of 212 bp. They were analyzed
137 with Ion Torrent Data Processing Pipeline version 4.2.18-1, including adapter trimming, read
138 quality filtering (cutoff 15), read mapping to the *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* LVS
139 NC_007880 genome, and variant calling (SNVs and small insertions and deletions).

140 Mutations found in the mutant strains compared to FthLVS-PS genome, with a quality index
141 above 60 and a frequency above 33.3, were considered significant. For each specific locus,
142 when SNP heterogeneity was detected in both the mutated and parental strains, the mutation
143 was considered non-significant.

144 All mutations identified by whole genome sequencing were further confirmed by PCR
145 amplification and sequencing of the corresponding DNA regions, using a dye terminator
146 sequencing approach. Genomic DNA was extracted from bacterial suspensions (0.5 Mc
147 Farland standard) using the QiaAmp DNA Minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France). PCR
148 reactions were performed using the Pwo Master kit (Roche Applied Science, Meylan, France).
149 Primers (Table S1) were designed based on the available genome sequence of *F. tularensis*
150 subsp. *holarctica* LVS (NC_007880). The PCR reactions contained 0.4 μM of each primer
151 and 20ng/mL of genomic DNA. They were optimized for annealing temperatures. All PCR
152 products were then purified by filtration (MNSU030 plates, Merck Millipore, Fontenay-Sous-
153 Bois, France), and sequenced using a dye terminator method (Ceq 8000 instrument, Beckman
154 Coulter, Villepinte, France) with the same primers and the DTCS Quick Start Kit (Beckman
155 Coulter). Sequence alignments were performed using the Ceq 8000 software (Beckman
156 Coulter).

157

158 **MIC determination**

159 We determined the ciprofloxacin MIC for all studied *F. tularensis* clones using a previously
160 described technique,¹⁴ in accordance with CLSI recommendations³⁰. Briefly, 2-fold serial
161 dilutions of ciprofloxacin were prepared in 96-wells flat-bottom microtiter plates (Becton-
162 Dickinson, Pont de Claix, France), with MHPV medium (75μL per well). An equal volume of
163 a 10⁶ CFU/mL bacterial suspension in MHPV medium was added to each well. The lowest
164 ciprofloxacin concentration visually inhibiting bacterial growth after an incubation of 48
165 hours (37°C, in 5% CO₂ atmosphere) was recorded as the MIC. Each experiment was run in
166 duplicate and included a negative control (MHPV medium without bacteria) and a positive
167 control (drug-free bacterial suspension).

168

169 **Determination of intracellular growth of *F. tularensis* clones**

170 Intracellular multiplication of *F. tularensis* clones was evaluated in J774-A1 cells by
171 determining intracellular viable bacterial counts at 1h and 24h post-infection. J774-A1 cells
172 were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM, Gibco, Life technologies,
173 Saint Aubin, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS, Gibco, Life
174 technologies), at 37°C, in a 5% CO₂-enriched atmosphere. Two flat-bottom 96-well microtiter
175 plates (T1 and T24) were seeded (200µL per well) with a 1.8×10^5 cells/ml suspension of
176 J774-A1 cells in D-MEM-10% FCS, and incubated 17h at 37°C in a 5% CO₂-enriched
177 atmosphere to allow the formation of cell monolayers. In parallel, a 1.0-McF standard
178 suspension of each *F. tularensis* strain tested was grown for 24h in brain-heart infusion broth
179 (BHI, bioMérieux) supplemented with 2% PVX, at 37°C, in 5% CO₂. The turbidity of the
180 bacterial suspensions was then measured to confirm bacterial growth, and adjusted at 0.5McF
181 standard by adding BHI-2%PVX, and further diluted in D-MEM-10% FCS to achieve a
182 bacterial inoculum of 4×10^7 CFU/mL. The cell monolayers were washed once in pH 7.2
183 sterile phosphate buffer saline (PBS, Gibco), then infected by addition of 50µL (2.0×10^6
184 CFU), of the previously prepared bacterial suspensions, corresponding to a 10:1 multiplicity
185 of infection (MOI). The plates were incubated at 37°C, in 5% CO₂ for 3h to allow
186 internalization of bacteria into J774-A1 cells. Cell monolayers were then washed with PBS
187 and re-incubated for 1h (37°C, 5% CO₂) in D-MEM-10% FCS medium containing 50µg/mL
188 of gentamicin in order to eliminate extracellular bacteria. Infected cell monolayers were then
189 washed twice in PBS. CFU-counts in wells of the T1 plate were determined as described
190 below. The T24 plate was reincubated for 23h after adding 200µL of D-MEM-10% FCS in
191 each well. CFU-counts in wells of the T24 plate were determined after this incubation period.
192 For intracellular CFU-counts determination, infected-cells monolayers were lysed using 1%
193 saponin solution (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA; 200 µL per well), as previously

194 described.¹⁴ Ten-fold serial dilutions of cell supernatants were performed in 200 µL of PBS,
195 and 100µL of each dilution was plated onto PVX-CHA agar. CFUs were enumerated after
196 72h incubation of the plates at 37°C in 5% CO₂-enriched atmosphere.

197

198 ***FTL_RS00300* (previously *FTL_0057*) locus heterogeneity in *F. tularensis* subsp.
199 *holartica* LVS stock solution**

200 Unexpectedly, sequencing data (see above) for the *F. tularensis* subsp. *holartica* LVS stock
201 solution revealed allelic heterogeneity at locus *FTL_RS00300*, a gene encoding a hypothetical
202 protein. To further explore such heterogeneity, we first selected 19 individual clones (referred
203 as FthLVS-V1 to FthLVS-V19) from a chocolate agar culture of the FthLVS stock
204 suspension. We PCR-amplified and sequenced a 658 bp fragment (Table S1) of the
205 *FTL_RS00300* (nucleotides 210 to 693) and *FTL_RS00305* (previously *FTL_0058*, 174
206 nucleotides) loci from DNA extracts of these clones.

207 Because fluoroquinolone resistance selection was previously performed with one of these
208 clones (FthLVS-PS),²⁸ we assessed the potential influence of *FTL_RS00300* allele on the
209 selection process to fluoroquinolone resistance. We founded 36 new independent lineages
210 from the FthLVS stock solution after two passages in Mueller-Hinton broth supplemented
211 with 2% Polyvitex ® (MHPV, bioMérieux, Marcy L'Etoile, France), in the presence (18
212 lineages) or absence (18 lineages) of increasing concentrations of ciprofloxacin. For each
213 lineage, an individual clone was isolated from the second passage and the *FTL_RS00300*
214 locus was PCR amplified and sequenced.

215

216 **RESULTS**

217 **Genetic characterization of FthLVS-PS and FthLVS stock solution.**

218 The results of our mutation detection strategy are summarized in Table 1.

219 When compared to the reference genome NC 007880.1, The FthLVS-PS strain and its derived
220 fluoroquinolones resistant mutants displayed the same single nucleotide polymorphism (SNP)
221 in five DNA regions: *FTL_RS00300* locus coding for a hypothetical protein, *FTL_RS00685*
222 (previously *FTL_0133*) coding for a ferrous iron transport protein (FeoB), *FTL_07755*
223 (previously *FTL_1516*) coding the insertion sequence *Isfu2* transposase, *FTL_09065*
224 (previously *FTL_1773*) coding a hypothetical protein, and the intergenic region between loci
225 *FTL_03795* (previously *FTL_0727*, a 2-octaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinol
226 hydroxylase) and *FTL_03800* (previously *FTL_0728*, a hypothetical protein).

227 As compared to the reference sequence NC_007880.1, the FthLVS genome displayed an
228 allelic heterogeneity (*476G>K*, R159T or R159M) at locus *FTL_RS00300*. This heterogeneity
229 was further confirmed by studying this locus in 19 individual clones selected after subculture
230 of the FthLVS stock solution on antibiotic-free chocolate agar. Six different genetic variants
231 for the *FTL_RS00300* locus were identified: *476G>T* in nine (47.3%) clones (referred as the
232 major genotype), and *468G>T*, *523insT*, *527C>A*, *530G>T* and *544G>T* in 5.3% to 15.8% of
233 the clones (minor genotypes, see Figure 1). The FthLVS-PS clone corresponded to the
234 *544G>T* allele.

235 Among the 36 clones derived from the FthLVS stock solution after two passages in the
236 presence or absence of ciprofloxacin, approximately half corresponded to the major genotype
237 (*476G>T* at locus *FTL_RS00300*) in both experimental conditions (Figure 1), intermediate
238 and external circles). Minor genotypes represented 0 to 16.7% of the selected population in
239 the absence of ciprofloxacin, but 0 to 33.3% in the presence of this antibiotic. A major
240 difference between the two experimental conditions was a more drastic selection of the clonal
241 population harboring the *544G>T* mutation in the presence of ciprofloxacin (Figure 1,
242 intermediate and external circles). Interestingly, however, none of the *FTL_RS00300*
243 mutations were associated with fluoroquinolone resistance.

244

245 **Gene mutations selected during evolution to fluoroquinolone resistance in FthLVS-PS.**

246 As compared to FthLVS-PS, 28 mutations were identified in derived fluoroquinolone
247 resistant mutants of lineages FTh1 to Fth3, including 17 insertions or deletions (with 14
248 inducing frameshifts), and 11 SNPs with nine transversions and two transitions. As for the
249 topoisomerases II encoding genes, we confirmed previously described mutations in *gyrA*
250 (T83I, T83K, and D87Y), *gyrB* (E467D and S465Y), *parC* (S457* and 85delC), and *parE*
251 (L488I). However, the study of intermediate populations of mutants allowed us to
252 characterized further mutations, including a new substitution in *gyrA* (L22I), a new deletion in
253 *parC* (L444fs), several deletions or insertions in *parE* (M579fs, M456*, G220fs, and G276fs).
254 Other gene mutations involved the locus *FTL_RS02265* (previously *FTL_0439*) in all
255 lineages, and loci *FTL_RS04695* (previously *FTL_0917*) in lineage Fth1, *FTL_RS03260*
256 (previously *FTL_0624*) in Fth2, and *FTL_RS00130* (previously *FTL_0024*), *FTL_RS05225*
257 (previously *FTL_1024*), *FTL_RS09845* (previously *FTL_1936*), *FTL_RS03100* (previously
258 *FTL_0594*), and *FTL_RS02080* (previously *FTL_0402*) in Fth3. Three loci coded for proteins
259 implicated in transport activities, including an ABC transporter (*FTL_RS03260*), a
260 periplasmic solute-binding protein (*FTL_RS09845*) and a serine/threonine transporter
261 (*FTL_RS00130*). The remaining loci coded for a transcription-repair coupling factor
262 (*FTL_RS04695*), a ribosomal protein (*FTL_RS05225*), an intracellular septation factor
263 (*FTL_RS02080*), an UDP-glucose-4-epimerase (*FTL_RS03100*), or a hypothetical protein
264 (*FTL_RS02265*).

265

266 **Order of appearance of mutations and correlation with fluoroquinolone resistance.**

267 The order of appearance of mutations varied according to the FthLVS lineage studied (Figure
268 2). The *gyrB* E467D mutation was first detected in Fth1, followed by *gyrA* T83I, and then

269 *parC* L444fs or various *parE* mutations. A mutation in *FTL_RS03260* (ABC transporter)
270 preceded the *gyrA* T83K mutation in Fth2, which was followed by mutations *gyrA* D87Y and
271 *parC* S457*. The same *gyrA* mutation (T83K) first occurred in Fth3, followed by complex
272 combinations of mutations, including *parC* 85delC, *gyrB* S465Y and/or mutations in various
273 other loci.

274 We previously reported that fluoroquinolone resistance in our FthLVS-PS derived mutants
275 was primarily associated with mutations occurring in genes encoding type II topoisomerases,
276 especially at codon positions *gyrA*83 and *gyrA*87.²⁸ By studying intermediate populations, we
277 could confirm that mutations *gyrA* T83I and T83K were associated with a 24 to 64-fold
278 increase in ciprofloxacin MICs depending on the genetic background in which they occurred
279 (Figure 2). The *gyrA* L22I mutation did not change ciprofloxacin MIC. The *gyrB* E467D
280 mutation alone was associated with a fourfold increase in ciprofloxacin MIC. The
281 combination of *gyrA* T83I and *gyrB* E467D mutations induced a 256-folds increase in
282 ciprofloxacin MIC. The combination of these two mutations with either *parC* L444fs, *parE*
283 M579fs, *parE* M456*, *parE* 220fs, or *parE* G276fs further increased ciprofloxacin MIC by
284 two- to fourfold. We could not establish if the order of appearance of mutations in
285 topoisomerases encoding genes had any influence on the fluoroquinolone resistance level of
286 the corresponding mutant.

287

288 Increased resistance to fluoroquinolones was also associated with mutations in genes
289 encoding proteins other than topoisomerases II, either alone or combined with mutations in
290 topoisomerases genes. A single mutation *FTL_RS03260* G153A was associated with an
291 fourfold increase in ciprofloxacin MIC. Single mutations in *FTL_RS02265* (P36fs, L37fs,
292 V344fs, Q33fs, A495fs, or G537V) induced a 2-16 times increase in ciprofloxacin MIC
293 according to the mutation considered. A fourfold increase in ciprofloxacin MIC was observed

294 in a mutant harboring the following three mutations: *FTL_RS00130* L359fs, *FTL_RS05225*
295 45delR, and *FTL_RS09845* V182fs. Three other combinations were associated with a
296 ciprofloxacin MIC increase: *parC* 85delC and *FTL_RS02265* L37fs (8-16 times increase),
297 *gyrB* S465Y and *FTL_RS02080* F142fs (4-8 times increase), and *parE* L488I and
298 *FTL_RS04695* A763V (fourfold increase). In these three cases, the impact of each mutation
299 alone on ciprofloxacin MIC could not be evaluated.

300

301 ***Impact of gene mutations on intracellular multiplication of FthLVS.***

302 We evaluated the multiplication capacity within J774 murine macrophages of various Fth1
303 clones because this lineage showed the broader panel of mutations in type II topoisomerases
304 and *FTL_RS02265* encoding genes (Figure 3, Table 2).

305 Figure 3 shows for each tested strain the bacterial load increases during a 23h incubation
306 period (T24 UFC count/T1 UFC count). The evolutionary links between tested strains are
307 materialized by dotted lines. We observed that the occurrence of a *gyrB* E467D mutation
308 (Fth1P1V1 clone) and its combination with a *gyrA* T83I mutation (Fth1P4V1) did not affect
309 intracellular growth of the corresponding mutants. As for mutations affecting topoisomerase
310 IV encoding genes, we observed two different patterns. The Fth1P8V11, Fth1P8V7 and
311 Fth1P8V3 clones harboring mutations in the C-terminal end of ParC or ParE (Table 2) had no
312 alteration in their intracellular multiplication capacity (Figure 3). Conversely, the Fth1P10V1,
313 Fth1P8V9 and Fth1P8V1 clones with a stop codon closer to the N-terminal end of ParE
314 (Table 2) displayed reduced capacity of intracellular growth (Figure 3). Finally, all clones
315 harboring a mutation at locus *FTL_RS02265* (Fth1P10V8, Fth1P14V12, Fth1P14V7,
316 Fth1P14V3, Fth1P14V2, Fth1P14V5, and Fth1P14V1) displayed a reduced or no capacity of
317 multiplication in murine macrophages (i.e., 0.98 to 2.53 log reduction in T24/T1 CFU ratios
318 compared to their direct ancestor).

319

320 **DISCUSSION**

321 In this study, we took advantage of the lineages we previously founded from the FthLVS
322 strain after exposure to progressively increasing concentrations of ciprofloxacin,²⁸ to further
323 determine: 1/ all genetic alterations occurring during fluoroquinolone resistance selection, in
324 addition to previously characterized mutations in type II topoisomerases encoding genes; 2/
325 the order of appearance of such mutations and their impact on fluoroquinolone resistance; and
326 3/ the potential impact of these mutations on bacterial fitness as measured by the
327 multiplication capacity of the corresponding mutants in J774 murine macrophage-like cells.

328

329 The present study further confirms previous reports establishing a correlation between
330 mutations in type II topoisomerases genes and fluoroquinolone resistance in *F. tularensis*.²⁷⁻²⁹
331 Moreover, in all FthLVS-derived mutants, such mutations first occurred in genes encoding
332 DNA gyrase, which is considered the primary fluoroquinolone target in Gram negative
333 bacteria, including *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*,²⁵ *Pseudomonas aeruginosa*,²⁴ and
334 *Legionella pneumophila*.²² The well-known “hot spot” mutation *gyrA*⁸³ (amino acid position
335 83 of *gyrA*) is confirmed to be pivotal in the acquisition of high-level resistance to
336 fluoroquinolones in *F. tularensis*. It occurred during the first four steps of selection in all
337 FthLVS mutants, and was associated with a 24 to 64-fold increase in ciprofloxacin MICs
338 depending on the genetic background in which it occurred. A *gyrB*⁴⁶⁷ mutation occurred
339 before the *gyrA*⁸³ mutation in FthI lineage, inducing a fourfold increase in ciprofloxacin MIC,
340 while the combination of *gyrA*⁸³ and *gyrB*⁴⁶⁷ had an additive effect (256 times increase in
341 ciprofloxacin MIC). The combination of *gyrA*⁸³ plus *gyrB*⁴⁶⁷ mutations with variables
342 mutations in *parC* and *parE* genes encoding topoisomerase IV (*parC* L444fs, *parE* M579fs,
343 *parE* M456*, *parE* 220fs, or *parE* G276fs) further increased ciprofloxacin MICs by two to

344 four times. Among mutations detected in topoisomerases II genes, some were similar to
345 mutations previously characterized in other fluoroquinolones resistant Gram negative bacteria
346 (i.e., *gyrA*⁸³, *gyrA*⁸⁷, *gyrB*⁴⁶⁵, *gyrB*⁴⁶⁷, and *parC*⁸⁵) while others were not (i.e., *parC*⁴⁴⁴ and all
347 *parE* mutations). The implication of these later mutations should be further characterized by
348 constructing isogenic strains with such mutations from the FthLVS strain.

349

350 Increased resistance to fluoroquinolones was also associated with mutations in genes
351 encoding proteins other than topoisomerases II, either alone or combined with mutations in
352 topoisomerases genes. Other well-known mechanisms of bacterial resistance to
353 fluoroquinolones are either greater efflux of these antibiotics or a reduced penetration across
354 the cell wall due to changes in porins. This study allowed us pointing out three
355 transmembrane transport systems potentially involved in fluoroquinolone resistance in *F.*
356 *tularensis*. An early mutation in lineage Fth2 occurred in *FTL_RS03260*, a locus homologous
357 to *FTT_1434c* encoding a transmembrane protein belonging to ATP binding cassette (ABC)
358 export system.³¹ An amino acid substitution at codon position 153 did not change the
359 predicted 4th transmembrane helix in the final portion of the protein (using the TMHMM
360 server 2.0). Although this mutation may not inactivate this efflux system, previously
361 described as potentially involved in the efflux of complex lipophilic drugs,³¹ we observed an
362 eightfold increase in ciprofloxacin MIC. The two other mutated loci encode putative
363 transmembrane import systems. *FTL_RS09845* is homologous to the *F. tularensis* subsp.
364 *tularensis* SCHU S4 *FTT_0209c* locus, identified as the substrate binding protein of an ABC
365 importer system by bioinformatic analysis.³¹ This transport system is considered to be
366 involved in metal cation uptake, and essential for lung infection in mice.³² *FTL_RS00130*
367 encodes an amino acid permease, predicted to exhibit 11 transmembrane helices (TMHMM
368 server 2.0 analysis). Both loci present frame-shift mutations, amputating half of the protein

369 encoded by *FTL_RS09845* and the two last transmembrane domains of the protein encoded by
370 *FTL_RS00130*. As these two mutations emerged simultaneously with a third one, we were not
371 able to correlate ciprofloxacin MIC changes to any of them, even if we note that globally the
372 occurrence of these modifications was correlated with a fourfold ciprofloxacin MIC increase
373 (Figure 2).

374

375 Single mutations in *FTL_RS02265* (P36fs, L37fs, V344fs, Q33fs, A495fs, or G537V) induced
376 a 2-16 times increase in ciprofloxacin MIC according to the mutation considered.

377 *FTL_RS02265* is an hybrid gene found specifically in laboratory strains, resulting from a
378 1480pb deletion identified as the region of differentiation 18 (RD18).³³ It encodes a chimeric
379 protein, FupA/B, predicted to be located in the outer membrane. It is considered implicated in
380 iron transport, although molecular mechanisms have still to be characterized.^{34,35} Considering
381 these predicted location and function, reduction of fluoroquinolone uptake due to an import
382 system alteration is the more likely hypothesis to explain the underlying mechanism behind
383 this resistance. In the present evolutionary model, ten of eleven highly resistant clones studied
384 (i.e., with a ciprofloxacin MIC \geq 32mg/L) displayed a mutation in *FTL_RS02265*; and six
385 mutational events in this gene could be correlated with a ciprofloxacin increase, although
386 occurring after the *gyrA83* mutation (Figure 2). This correlation was reinforced by detection
387 of a strain in lineage Fth3 exhibiting a spontaneous reversion of the *FTL_RS02265* mutation
388 and its associated phenotype.

389

390 The emergence of mutations in four other loci might not be directly linked to ciprofloxacin
391 resistance: *FTL_RS05225* encode the 30S ribosomal protein S6; *FTL_RS02080* encoding the
392 intracellular septation protein A; *FTL_RS03100* homologous to *FTT_1492c* tagged as *wbrC*
393 gene encoding an UDP- glucose-4-epimerase; and *FTL_RS04695* encoding a transcription

394 repair coupling factor. However, for the two later genes, we can hypothesize that mutations
395 had an indirect impact on fluoroquinolone resistance evolutionary pathway. The UDP-
396 glucose-4-epimerase (*FTL_RS03100*) is involved in the glycosylation of two proteins: PilA
397 and a DsbA analogue.³⁶ It has been shown in *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHUS4 that
398 *wbtC* deletion resulted in a partial defect of DsbA glycosylation and alteration of O-antigen
399 synthesis, correlated with a reduced virulence in mice.³⁷ DsbA is playing a major role in
400 periplasmic protein folding, via disulfide bonds creation including in type III secretion
401 systems in *S.thyphii*.³⁸ We therefor can formulate the hypothesis that, the reduced
402 glycosylation of DsbA induced by *wbtC* mutation will negatively affect the periplasmic
403 assembly of polymeric import systems, though reducing fluoroquinolone import. In *E. coli*, a
404 *FTL_RS04695* null mutant induced a threefold increase in mutation rate and no reduction in
405 mutation frequency after UV and alkylating agent exposure.³⁹ In fact, we can observe in
406 lineage Fth1 that five high level resistant clones are issued from the clone with the
407 *FTL_RS04695* mutation when only one could be detected for other clones (Figure 2). Hence
408 mutation in *FTL_RS04695* could result in the emergence of a hypermutable *Francisella* strain,
409 amplifying the mutation rate initially induced by fluoroquinolone exposure, triggering the
410 SOS response.⁴⁰

411

412 Acquired antibiotic resistance may be occasionally associated with reduction in fitness and/or
413 virulence of the corresponding mutants.⁴¹ We evaluated the fitness of FthLVS-derived
414 mutants by comparing their ability to grow in murine macrophages, compared to the parental
415 strain FthLVS-PS. *F. tularensis* virulence is also highly correlated with the ability of this
416 bacterium to grow in eukaryotic cells, especially in macrophages.⁴²

417 As for DNA gyrase, the successive introduction of SNPs in *gyrB*⁴⁶⁷ and *gyrA*⁸³ did not alter
418 intra-macrophage growth of the corresponding mutant compared to FthLVS-PS (Figure 3).

419 This mutant corresponded to an evolutionary node, since we detected seven different derived
420 clones, including six with an additional mutation in one of the topoisomerase IV encoding
421 genes. Significant intra-cellular replication defect was observed for three out of these six
422 mutant strains, owing to the introduction of a stop codon before or into the Toprim domain of
423 ParE (Fth1P8V1, Fth1P8V9 and Fth1P10V1). This domain is considered the active site of this
424 enzyme subunit, with an essential role in DNA strand cleavage and rejoining.⁴³ Although this
425 defect could be lethal for the corresponding mutants, a partial compensation for unlinking
426 activity in the final stage of replication might occur from over-expression of DNA gyrase
427 which has a weak decatenation activity.⁴⁴ The three other strains with additional
428 topoisomerase IV mutation had replication ability comparable to FthLVS-PS. Two of them
429 exhibited mutations resulting in a stop codon located in the late portion of the C-terminal end
430 of ParC (Fth1P8V7) and ParE (Fth1P8V11), after any annotated active domain. The last one,
431 Fth1P8V3, displayed a leucine to isoleucine substitution at codon position 488 located in the
432 Toprim domain of ParE. The lack of replication alteration in this clone could be explained by
433 alteration of the interaction of the topoisomerase IV with fluoroquinolones, without reduction
434 of its activity. Alternatively, the concomitant occurrence of the mutation at *FTL_RS04695*
435 locus could compensate the deleterious effects of the *parE* mutation.

436 In addition, our study confirmed the importance of *FTL_RS02265* in intra-macrophage
437 replication of *F. tularensis*. The reduced capacity of intracellular replication of our
438 *FTL_RS02265* mutants in J774-A1 cells correlated with previous observations of reduced
439 virulence of *FTL_RS02265* null mutants in cell systems and in mice.³⁴

440

441 Whole-genome sequencing of the FthLVS-PS clone revealed SNPs in five loci compared to
442 the NC_007880.1 reference sequence (Table 1), including 3 loci previously associated with *F.*
443 *tularensis* virulence. *FTL_RS00685* was first targeted by signature-tagged mutagenesis (STM)

444 as essential for lung infection in mice.³² This locus encodes FeoB, a transmembrane protein
445 involved in extracellular iron uptake,⁴⁵ independently of siderophore production or
446 siderophore-mediated iron uptake.⁴⁶ *FTL_RS09065* displays a 90bp deletion in the
447 NC_007880.1 genome sequence compared to other *F. tularensis* strains.^{29,47} This locus is
448 predicted to encode a conserved hypothetical protein homologous to multiple peroxidases
449 (Dyp-perox domain). The 90 bp deletion was considered to alter the protein function, and
450 therefore could explain virulence attenuation in FthLVS.⁴⁷ However, complementation of
451 such a strain with the wild-type *FTL_RS09065* sequence did not restore virulence in mice.⁴⁸
452 Our FthLVS and FthLVS-PS strains did not display the 90bp deletion. Finally, *FTL_RS00300*
453 displayed a single nucleotide polymorphism at position 544 in FthLVS-PS strain, compared
454 to NC_007880.1 genome sequence. Mahawar *et al.* established that FthLVS mutant strain for
455 this locus showed highly attenuated virulence in mice, but immunization of these animals
456 with this strain induced protection against a *F. tularensis* subsp. *tularensis* SchuS4
457 challenge.⁴⁹

458

459 From the beginning, the Live vaccine strain was described as an heterogeneous bacterial
460 population, containing two types of colonies with different cultural, virulence and
461 immunogenic properties.⁵⁰ This study allowed us to characterize a previously unrecognized
462 genetic heterogeneity within our FthLVS stock solution. Six different genetic variants were
463 identified for the *FTL_RS00300* locus. All lineages previously selected in the presence of
464 ciprofloxacin were issued from a single clone (FthLVS-PS). Further *in vitro* selection
465 experiments in the presence of ciprofloxacin revealed that among *FTL_RS00300* variants of
466 the FthLVS stock solution, the FthLVS-PS genotype had a selective advantage in the presence
467 of ciprofloxacin, with a threefold increase in the proportion of this clone compared to the
468 whole population after only two passages. The *FTL-0057* locus encodes a hypothetical protein

469 whose function has not been characterized. Our results re-emphasize the need to check
470 clonality of reference strains used for *in vitro* experiments. Subcultures of these laboratory
471 strains may lead to genetic alterations and significant variations in their phenotypic traits.
472
473 In conclusion, in the present study, we further characterized the mutational pathways
474 developed by *F. tularensis* LVS strain during selection to high-level fluoroquinolone
475 resistance. We reassessed the pivotal position of type II topoisomerases mutations in
476 fluoroquinolone resistance acquisition, especially *gyrA*⁸³ mutation.^{27,28} Our data also revealed
477 a large subset of potential new fluoroquinolone resistance mechanisms, including one export
478 and three import systems hypothetically implicated in reduction of intracellular concentration
479 of fluoroquinolones in *F. tularensis*. Moreover, mutations at locus *FTL_RS02265* were found
480 in almost all selected high-level fluoroquinolones resistant clones, and were associated with
481 reduction in intra-macrophage multiplication capacity of *F. tularensis*. These findings should
482 be further investigated *in vitro* but also *in vivo* in tularaemia patients suffering from
483 fluoroquinolone treatment failures.

484

485 **Acknowledgements**

486 We thank the Institut National de Veille Sanitaire, the Direction Générale de l'Armement, the
487 Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, the University Grenoble Alpes, and the
488 Centre National de la Recherche Scientifique for funding. Highthroughput sequencing was
489 performed at the TGML Platform, supported by grants from Inserm, GIS IBiSA, Aix-
490 Marseille Université, and ANR-10-INBS-0009-10.

491

492 **Funding**

493 This work was supported by the Institut National de Veille Sanitaire (InVS), the Direction
494 Générale de l'Armement (DGA, 07CO301), the Centre Hospitalier Universitaire Grenoble
495 Alpes, the University Grenoble Alpes, and the Centre National de la Recherche Scientifique.
496 Highthroughput sequencing was performed at the TGML Platform, supported by grants from
497 Inserm, GIS IBiSA, Aix-Marseille Université, and ANR-10-INBS-0009-10.

498

499 **References**

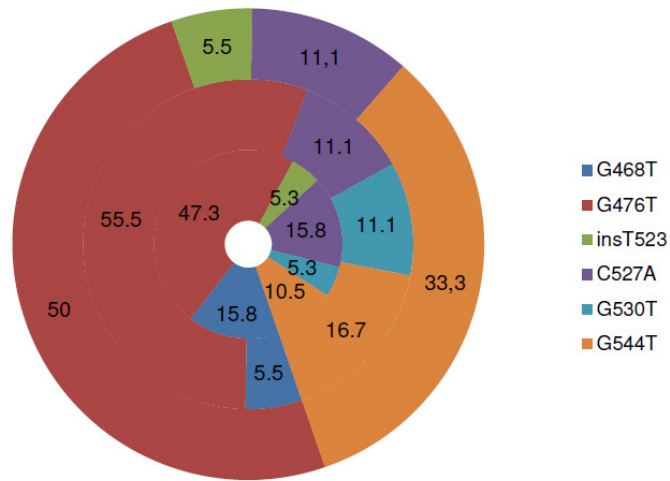
- 500 1. Organization WH. WHO Guidelines on tularaemia. 2007. Available at:
501 <http://apps.who.int/iris/handle/10665/43793?locale=fr>. Accessed February 27, 2014.
- 502 2. Maurin M. Francisella tularensis as a potential agent of bioterrorism? *Expert Rev Anti Infect Ther*
503 2015; **13**: 141–4.
- 504 3. Keim P, Johansson A, Wagner DM. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of Francisella.
505 *Ann N Y Acad Sci* 2007; **1105**: 30–66.
- 506 4. Hepburn MJ, Simpson AJH. Tularemia: current diagnosis and treatment options. *Expert Rev Anti*
507 *Infect Ther* 2008; **6**: 231–40.
- 508 5. Tärnvik A, Chu MC. New approaches to diagnosis and therapy of tularemia. *Ann N Y Acad Sci* 2007;
509 **1105**: 378–404.
- 510 6. Bossi P, Tegnell A, Baka A, *et al*. Bichat guidelines for the clinical management of tularaemia and
511 bioterrorism-related tularaemia. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull* 2004; **9**:
512 E9–10.
- 513 7. Georgi E, Schacht E, Scholz HC, Splettstoesser WD. Standardized broth microdilution antimicrobial
514 susceptibility testing of Francisella tularensis subsp. holarctica strains from Europe and rare
515 Francisella species. *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 2429–33.
- 516 8. Hotta A, Fujita O, Uda A, *et al*. In vitro antibiotic susceptibility of Francisella tularensis isolates from
517 Japan. *Jpn J Infect Dis* 2013; **66**: 534–6.
- 518 9. Johansson A, Urich SK, Chu MC, Sjöstedt A, Tärnvik A. In vitro susceptibility to quinolones of
519 Francisella tularensis subspecies tularensis. *Scand J Infect Dis* 2002; **34**: 327–30.
- 520 10. Kiliç S, Celebi B, Acar B, Ataş M. In vitro susceptibility of isolates of Francisella tularensis from
521 Turkey. *Scand J Infect Dis* 2013; **45**: 337–41.
- 522 11. Urich SK, Petersen JM. In vitro susceptibility of isolates of Francisella tularensis types A and B
523 from North America. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 2276–8.
- 524 12. Tomaso H, Dahouk S Al, Hofer E, *et al*. Antimicrobial susceptibilities of Austrian Francisella
525 tularensis holarctica biovar II strains. *Int J Antimicrob Agents* 2005; **26**: 279–84.

- 526 13. Maurin M, Mersali NF, Raoult D. Bactericidal activities of antibiotics against intracellular
527 *Francisella tularensis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 3428–31.
- 528 14. Sutera V, Caspar Y, Boisset S, Maurin M. A new dye uptake assay to test the activity of antibiotics
529 against intracellular *Francisella tularensis*. *Front Cell Infect Microbiol* 2014; **4**: 36.
- 530 15. Peterson JW, Moen ST, Healy D, *et al*. Protection Afforded by Fluoroquinolones in Animal Models
531 of Respiratory Infections with *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, and *Francisella tularensis*. *Open*
532 *Microbiol J* 2010; **4**: 34–46.
- 533 16. Nelson M, Lever MS, Dean RE, Pearce PC, Stevens DJ, Simpson AJH. Bioavailability and efficacy of
534 levofloxacin against *Francisella tularensis* in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Antimicrob*
535 *Agents Chemother* 2010; **54**: 3922–6.
- 536 17. Piercy T, Steward J, Lever MS, Brooks TJG. In vivo efficacy of fluoroquinolones against systemic
537 tularemia infection in mice. *J Antimicrob Chemother* 2005; **56**: 1069–73.
- 538 18. Steward J, Piercy T, Lever MS, Simpson AJH, Brooks TJG. Treatment of murine pneumonic
539 *Francisella tularensis* infection with gatifloxacin, moxifloxacin or ciprofloxacin. *Int J Antimicrob Agents*
540 2006; **27**: 439–43.
- 541 19. Pérez-Castrillón JL, Bachiller-Luque P, Martín-Luquero M, Mena-Martín FJ, Herreros V. Tularemia
542 epidemic in northwestern Spain: clinical description and therapeutic response. *Clin Infect Dis Off Publ*
543 *Infect Dis Soc Am* 2001; **33**: 573–6.
- 544 20. Johansson A, Berglund L, Gothefors L, Sjöstedt A, Tärnvik A. Ciprofloxacin for treatment of
545 tularemia in children. *Pediatr Infect Dis J* 2000; **19**: 449–53.
- 546 21. Fàbrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J. Mechanism of action of and resistance to quinolones.
547 *Microb Biotechnol* 2009; **2**: 40–61.
- 548 22. Almahmoud I, Kay E, Schneider D, Maurin M. Mutational paths towards increased
549 fluoroquinolone resistance in *Legionella pneumophila*. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 284–93.
- 550 23. Jonas D, Engels I, Hartung D, Beyersmann J, Frank U, Daschner FD. Development and mechanism
551 of fluoroquinolone resistance in *Legionella pneumophila*. *J Antimicrob Chemother* 2003; **51**: 275–80.
- 552 24. Lee JK, Lee YS, Park YK, Kim BS. Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and
553 the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of
554 *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 2005; **25**: 290–5.
- 555 25. Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and
556 *Salmonella*: recent developments. *Int J Antimicrob Agents* 2005; **25**: 358–73.
- 557 26. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone
558 resistance. *Lancet Infect Dis* 2006; **6**: 629–40.
- 559 27. Loveless BM, Yermakova A, Christensen DR, *et al*. Identification of ciprofloxacin resistance by
560 SimpleProbe, High Resolution Melt and Pyrosequencing nucleic acid analysis in biothreat agents:
561 *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* and *Francisella tularensis*. *Mol Cell Probes* 2010; **24**: 154–60.
- 562 28. Sutera V, Levert M, Burmeister WP, Schneider D, Maurin M. Evolution toward high-level
563 fluoroquinolone resistance in *Francisella* species. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 101–10.

- 564 29. La Scola B, Elkarkouri K, Li W, *et al.* Rapid comparative genomic analysis for clinical microbiology:
565 the *Francisella tularensis* paradigm. *Genome Res* 2008; **18**: 742–50.
- 566 30. Anon. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial
567 Suceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement M100-S19.
- 568 31. Atkins HS, Dassa E, Walker NJ, *et al.* The identification and evaluation of ATP binding cassette
569 systems in the intracellular bacterium *Francisella tularensis*. *Res Microbiol* 2006; **157**: 593–604.
- 570 32. Su J, Yang J, Zhao D, Kawula TH, Banas JA, Zhang J-R. Genome-Wide Identification of *Francisella*
571 *tularensis* Virulence Determinants. *Infect Immun* 2007; **75**: 3089–101.
- 572 33. Svensson K, Larsson P, Johansson D, Byström M, Forsman M, Johansson A. Evolution of
573 subspecies of *Francisella tularensis*. *J Bacteriol* 2005; **187**: 3903–8.
- 574 34. Sen B, Meeker A, Ramakrishnan G. The fslE homolog, FTL_0439 (fupA/B), mediates siderophore-
575 dependent iron uptake in *Francisella tularensis* LVS. *Infect Immun* 2010; **78**: 4276–85.
- 576 35. Ramakrishnan G, Sen B. The FupA/B protein uniquely facilitates transport of ferrous iron and
577 siderophore-associated ferric iron across the outer membrane of *Francisella tularensis* live vaccine
578 strain. *Microbiol Read Engl* 2014; **160**: 446–57.
- 579 36. Thomas RM, Twine SM, Fulton KM, *et al.* Glycosylation of DsbA in *Francisella tularensis* subsp.
580 *tularensis*[∇]. *J Bacteriol* 2011; **193**: 5498–509.
- 581 37. Twine SM, Vinogradov E, Lindgren H, Sjostedt A, Conlan JW. Roles for wbtC, wbtI, and kdtA Genes
582 in Lipopolysaccharide Biosynthesis, Protein Glycosylation, Virulence, and Immunogenicity in
583 *Francisella tularensis* Strain SCHU S4. *Pathogens* 2012; **1**: 12–29.
- 584 38. Miki T, Okada N, Danbara H. Two Periplasmic Disulfide Oxidoreductases, DsbA and SrgA, Target
585 Outer Membrane Protein SpiA, a Component of the *Salmonella* Pathogenicity Island 2 Type III
586 Secretion System. *J Biol Chem* 2004; **279**: 34631–42.
- 587 39. Selby CP, Sancar A. Structure and Function of Transcription-Repair Coupling Factor I. STRUCTURAL
588 DOMAINS AND BINDING PROPERTIES. *J Biol Chem* 1995; **270**: 4882–9.
- 589 40. Ysern P, Clerch B, Castaño M, Gibert I, Barbé J, Llagostera M. Induction of SOS genes in
590 *Escherichia coli* and mutagenesis in *Salmonella typhimurium* by fluoroquinolones. *Mutagenesis* 1990;
591 **5**: 63–6.
- 592 41. Melnyk AH, Wong A, Kassen R. The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evol Appl*
593 2015; **8**: 273–83.
- 594 42. Jones CL, Napier BA, Sampson TR, Llewellyn AC, Schroeder MR, Weiss DS. Subversion of host
595 recognition and defense systems by *Francisella* spp. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 2012; **76**: 383–
596 404.
- 597 43. Aravind L, Leipe DD, Koonin EV. Toprim—a conserved catalytic domain in type IA and II
598 topoisomerases, DnaG-type primases, OLD family nucleases and RecR proteins. *Nucleic Acids Res*
599 1998; **26**: 4205–13.
- 600 44. Zechiedrich EL, Cozzarelli NR. Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during
601 replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 1995; **9**: 2859–69.

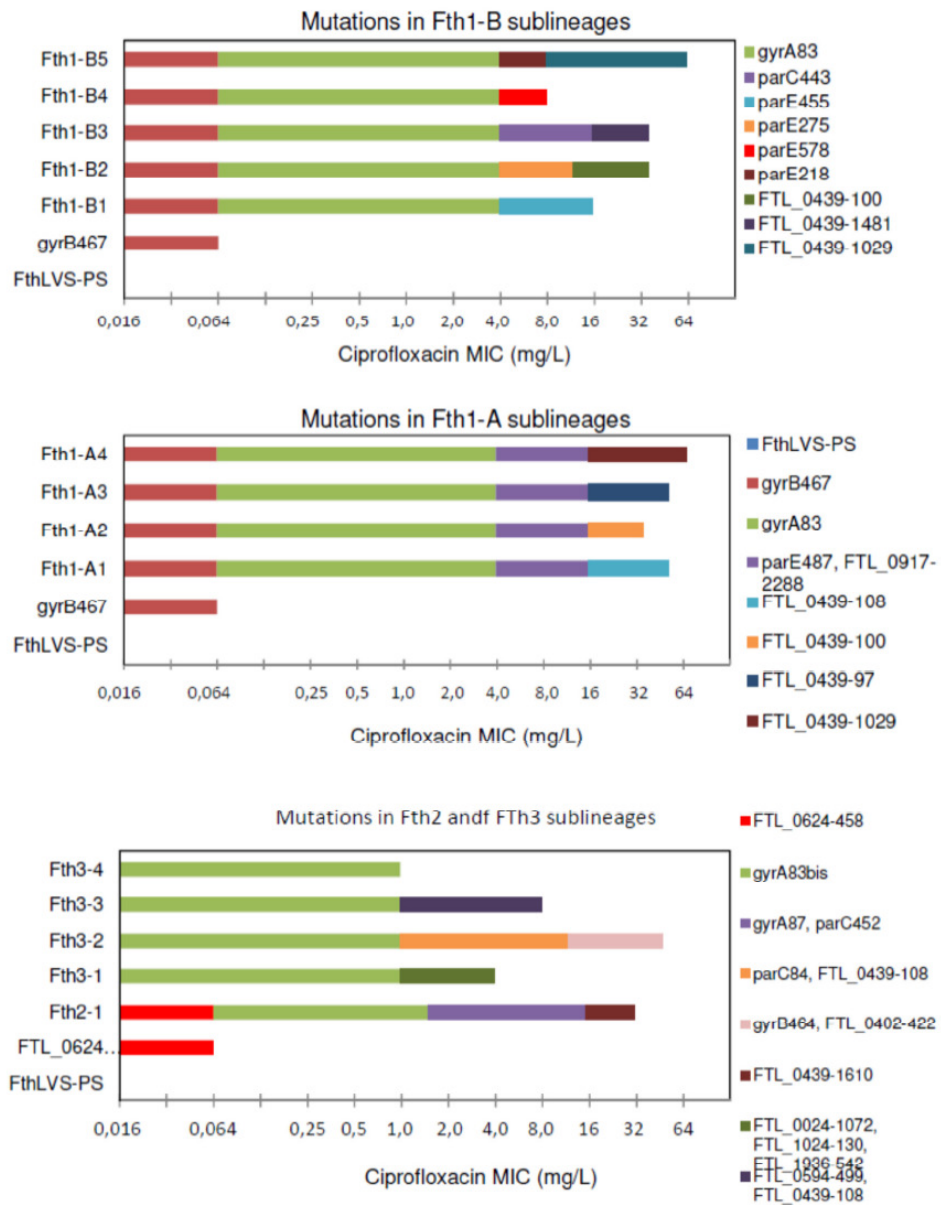
- 602 45. Thomas-Charles CA, Zheng H, Palmer LE, Mena P, Thanassi DG, Furie MB. FeoB-mediated uptake
603 of iron by *Francisella tularensis*. *Infect Immun* 2013; **81**: 2828–37.
- 604 46. Perez NM, Ramakrishnan G. The Reduced Genome of the *Francisella tularensis* Live Vaccine Strain
605 (LVS) Encodes Two Iron Acquisition Systems Essential for Optimal Growth and Virulence. *PLoS ONE*
606 2014; **9**. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3973589/>. Accessed April 19,
607 2014.
- 608 47. Rohmer L, Brittnacher M, Svensson K, *et al.* Potential source of *Francisella tularensis* live vaccine
609 strain attenuation determined by genome comparison. *Infect Immun* 2006; **74**: 6895–906.
- 610 48. Salomonsson E, Kuoppa K, Forslund A-L, *et al.* Reintroduction of Two Deleted Virulence Loci
611 Restores Full Virulence to the Live Vaccine Strain of *Francisella tularensis*. *Infect Immun* 2009; **77**:
612 3424–31.
- 613 49. Mahawar M, Rabadi SM, Banik S, *et al.* Identification of a live attenuated vaccine candidate for
614 tularemia prophylaxis. *PloS One* 2013; **8**: e61539.
- 615 50. Tigertt WD. SOVIET VIABLE PASTEURELLA TULARENSIS VACCINES A REVIEW OF SELECTED
616 ARTICLES. *Bacteriol Rev* 1962; **26**: 354–73.
- 617
- 618
- 619
- 620
- 621
- 622

623 **Figure 1.** Distribution (%) of *FTL_RS00300* mutations in the FthLVS-PS stock suspension,
 624 and after short term evolution in MHPV medium in the presence or absence of ciprofloxacin.
 625
 626



627
 628 Inner circle: 19 selected clones from FthLVS-PS stock solution; intermediate circle: 18 clones
 629 evolved (two passages) in antibiotic-free MHPV medium; external circle: 18 clones selected
 630 (two passages) in ciprofloxacin-containing MHPV medium. For the three populations, the
 631 percentage of each clone is indicated.
 632
 633

634 **Figure 2.** Order of appearance of gene mutations in FthLVS-derived mutants and
 635 corresponding ciprofloxacin MICs.

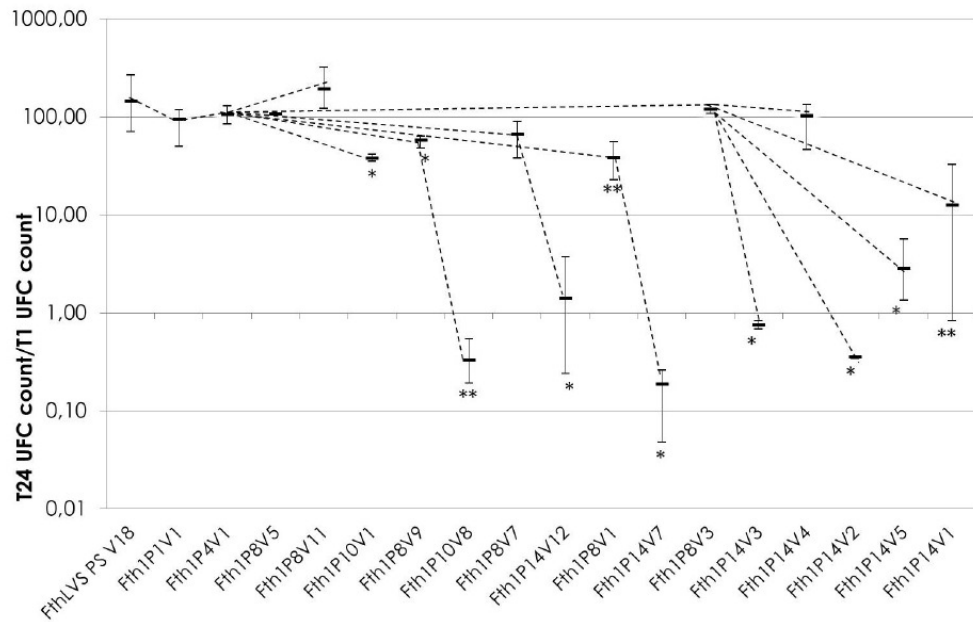


636

637

638

639 **Figure 3.** Intracellular multiplication capacity of Fth1 lineage clones in murine macrophages
 640 J774 over a 23h period.



641

642 The statistical comparison of data was run with an unpaired t-test. The intracellular
 643 multiplication capacity of each clone was compared to its direct ancestor. NS: $p > 0.05$, *:
 644 $0.05 \geq p > 0.01$, **: $p \leq 0.01$. Dotted lines: evolutionary links between strains. Error bars
 645 represent the maximum and minimum value of triplicate experiments.

646

647 **Table 1.** Mutations identified in *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS stock solution (FthLVS-
648 PS), lineages parental strain (FthLVS-PSV18) and clones isolated along the fluoroquinolone
649 resistance acquisition process; compared to NC_007880.1 genome sequence
650

	Locus	Gene Product	Mutations	AA changes	
FthLVS-PS¹	<i>FTL_RS00300</i>	Hypothetical protein	544G>T	V182L	
	<i>FTL_RS00685</i>	Ferrous iron transport protein	1139C>A	S378Y	
	<i>Intergenic</i> <i>FTL_RS03795</i> <i>FTL_RS03800</i>	Mono-oxygenase family protein	13 nucl. after FTL_0727 T>G		
	<i>FTL_RS09065</i>	Hypothetical protein	93 nucleotides insertion ⁴		
	<i>FTL_RS07755</i>	ISFtu2 Transposase	590_591delAA ⁵	Q197L	
Fth1 lineage³	<i>FTL_RS02795</i>	DNA gyrase subunit A (GyrA)	248C>T	T83I	
	<i>FTL_RS07915</i>	DNA gyrase subunit B (GyrB)	1401G>T	E467D	
	<i>FTL_RS02425</i>	DNA topoisomerase IV subunit A (ParC)	1331_1380del ⁵	L444fs	
	<i>FTL_RS08800</i>	DNA topoisomerase IV subunit B (ParE)	1462C>A	L488I	
			1734_1735insCAGC ⁵	M579fs	
			1366delA ⁵	M456*	
			655_656insA ⁵	G220fs	
			827delG ⁵	G276fs	
		<i>FTL_RS04695</i>	Transcription-repair coupling factor	2288C>T	A763V
		<i>FTL_RS02265</i>	Hypothetical protein	100delG ⁵	P36fs
			108_109insC ⁵	L37fs	
			1029_1030insG ⁵	V344fs	
			97delC ⁵	Q33fs	
			1481_1482insC ⁵	A495fs	
Fth2 lineage³	<i>FTL_RS02795</i>	DNA gyrase subunit A (GyrA)	64C>A	L22I	
			248C>A	T83K	
			259C>T	D87Y	
	<i>FTL_RS02425</i>	DNA topoisomerase IV subunit A (ParC)	1368_1369insT ⁵	S457*	
	<i>FTL_RS03260</i>	ABC transporter membrane protein	458G>C	G153A	
	<i>FTL_RS02265</i>	Hypothetical protein	1610G>T	G537V	

Fth3 lineage ³	<i>FTL_RS02795</i>	DNA gyrase subunit A (GyrA)	248C>A	T83K
	<i>FTL_RS07915</i>	DNA gyrase subunit B (GyrB)	1394C>A	S465Y
	<i>FTL_RS02425</i>	DNA topoisomerase IV subunit A (ParC)	254_256delGTT ⁴	85delC
	<i>FTL_RS00130</i>	Serine transporter	1072_1073insG ⁵	L359fs
	<i>FTL_RS05225</i>	30S ribosomal protein S6	130_132delCGT ⁴	45delR
	<i>FTL_RS09845</i>	Periplasmic solute binding protein	542_543insGG ⁵	V182fs
	<i>FTL_RS03100</i>	UDP-glucose-4-epimerase	499_510del AAACTT GCAAAG ⁴	167_170delKLAK
	<i>FTL_RS02080</i>	Intracellular septation protein A family protein	422_423insTC ⁵	F142fs
	<i>FTL_RS02265</i>	Hypothetical protein	108_109insC ⁵	L37fs
			105G>C	G35G

651 ¹: mutations found in the parental strain previously used to found lineages Fth1 to Fth3,²⁸
652 compared to NC_007880.1 reference genome; ²: mutation found in FthLVS stock solution
653 compared to FthLVS-PS; ³: mutations found in at least one clone of the lineages Fth1, Fth2 or
654 Fth3, compared to FthLVS-PS; ⁴: in-frame deletion or insertion, ⁵: frameshift insertion or
655 deletion.

656

657

658 **Table 2.** Ciprofloxacin MIC and genotype of Fth1 lineage strains tested for intracellular
 659 multiplication capacity

Strains designation	Mutations	Ciprofloxacin MIC (mg/L)
FthLVS-PSV18		0.016
Fth1P1V1	<i>gyrB1401</i>	0.064
Fth1P4V1	<i>gyrB1401</i> + <i>gyrA248</i>	4.0
Fth1P8V11	<i>gyrB1401</i> + <i>gyrA248</i> + <i>parE1734</i>	8.0
Fth1P10V1	<i>gyrB1401</i> + <i>gyrA248</i> + <i>parE1366</i>	16
Fth1P8V9	<i>gyrB1401</i> + <i>gyrA248</i> + <i>parE827</i>	8.0
Fth1P10V8	<i>gyrB1401</i> + <i>gyrA248</i> + <i>parE827</i> + <i>FTL_RS02265-100</i>	32
Fth1P8V7	<i>gyrB1401</i> + <i>gyrA248</i> + <i>parC1331</i>	16
Fth1P14V12	<i>gyrB1401</i> + <i>gyrA248</i> + <i>parC1331</i> + <i>FTL_RS02265-1481</i>	32
Fth1P8V1	<i>gyrB1401</i> + <i>gyrA248</i> + <i>parE655</i>	8.0
Fth1P14V7	<i>gyrB1401</i> + <i>gyrA248</i> + <i>parE655</i> + <i>FTL_RS02265-1029</i>	64
Fth1P8V3	<i>gyrB1401</i> + <i>gyrA248</i> + <i>parE1462</i> + <i>FTL_RS04695-2288</i>	8.0
Fth1P14V3	<i>gyrB1401</i> + <i>gyrA248</i> + <i>parE1462</i> + <i>FTL_RS04695-2288</i> + <i>FTL_RS02265-108</i>	64
Fth1P14V4	<i>gyrB1401</i> + <i>gyrA248</i> + <i>parE1462</i> + <i>FTL_RS04695-2288</i>	32
Fth1P14V2	<i>gyrB1401</i> + <i>gyrA248</i> + <i>parE1462</i> + <i>FTL_RS04695-2288</i> + <i>FTL_RS02265-100</i>	32
Fth1P14V5	<i>gyrB1401</i> + <i>gyrA248</i> + <i>parE1462</i> + <i>FTL_RS04695-2288</i> + <i>FTL_RS02265-97</i>	32
Fth1P14V1	<i>gyrB1401</i> + <i>gyrA248</i> + <i>parE1462</i> + <i>FTL_RS04695-2288</i> + <i>FTL_RS02265-1029</i>	32

660

661

662

663

664

665 **Table S1.** Primers used in control sequencing dye terminator assays.

Primer pairs designation	Forward Primer Sequence (5' to 3')	Reverse Primer Sequence (5' to 3')	Fragment length (bp) ¹	Annealing temperature (°C)
Fth/Fno <i>gyrA1</i>	AGGAAAATCTGGAGCTGGAA	TGAATGGATTGCTAAAGAGTGC	740	50.5
Fth/Fno <i>gyrB3</i>	AGCTTCTCAGGATACGTT	TCAGCTGTAGAGTCATTAGTTA	773	47.0
Fth <i>parC1</i>	CGTACTAGCGCTTATGAT	ACCAGGATAGTCAGGAGC	741	45.0
Fth/Fno <i>parC3</i>	AAATCCAGGCTGAAGCAA	TCGCAAAATCACGAATAA	732	48.7
Fth/Fno <i>parE2</i>	GATAATGTAGGCAAGAAA	ATGAAAAGCTCAGTAGAA	791	45.5
Fth/Fno <i>parE3</i>	CGTAAACGCATAATGAAC	TTATCTGGTAGAAATTCTAATT	784	47.0
FTL_0024-1	GGTTCAAAAGAAGGTATAGATGGTC	ACATAAAATGCCGATGATAGTGC	302	55.0
FTL_0057-1	TGGTGCTGCGATAAATGGT	ATTCGTTGCTATACTTCAGGTTG	658	55.0
FTL_0133-1	CCAAAGCACTCGATGCAC	CCCGTAATTATAGCTCCAAATATACC	598	55.0
FTL_0402	CAATGAAAGAAACACCAATGCAA	TGTCAATATTTAGAATTTCTTCGCTCA	346	55.0
FTL_0439-2	TCTAGAGGGTGTTCATGGTGT	TGTAATTGTCCTGAAGTTGCT	558	55.0
FTL_0439-1	CTTGTTTTGGTAGTGCTGTAC	ATGTAAGTGATTCATGCGTTGTC	915	55.0
FTL_0439-4	TGGTAGTGGTCAGAATATTAAC	ACTGAAAGATCTAATGTAAGTGT	237	50.0
FTL_0594-1	TGATAGTGCGCCAATAGGTC	TATAAACTGTGAAGTGCAAAAATATTC	358	55.0
FTL_0624-1	TAGGCAGTATGGGAGATGGA	TGCTACAAATGCAAAGTATGGA	554	55.0
FTL_0727-1	TGAGCTAATAGAGCGTCATGCTA	GGATAATTTGATCAGCAAGCAAC	575	55.0
FTL_0917-1	CAACAATCTTAGCTCAACAGCAT	TACGTAAGCGTGAAACAAC	540	55.0
FTL_1024	CAGATCAATTAGATGCAATGCTTG	ATTACTTCTTTCTCATTGATCCATC	289	55.0
FTL_1211	CAGTGACTAAATGTTGTGTCCA	GCTCAACAATTCTGGCAATCTAA	547	55.0
FTL_1773-1	GAATAAGGAAGACGCGTAACA	TTTGAGGACGGTATTGAGAATC	619	55.0
FTL_1936	CATAATTTACAGGCATAGTTTCGGT	GCCGAAATCATTAAAGGTACAAGA	517	55.0
isFtu2-1446542	CACAATTACAAGCAATGCAAATGAC ²	TGGGTGGTGATGATAAGCTAGA	1344	55.0
	ATCCATGCTATGACTGATGCTTT ³		615	

666 ¹: Predicted fragment length based on reference genome NC_077881.1, ²: Forward primer
667 used for primary amplification reaction, ³: Forward primer used for sequencing reaction.

668

5 Développement d'un test pour l'évaluation de l'activité des antibiotiques contre *F. tularensis* intracellulaire

5.1 Résumé

5.1.1 Objectifs

La tularémie est une zoonose causée par la bactérie *F. tularensis*. Habituellement, six formes cliniques sont décrites pour cette maladie. Les formes ganglionnaires se présentent comme des adénopathies localisées. Elles sont associées à une lésion cutanée au point d'inoculation ou à une conjonctivite dans les formes ulcéro-ganglionnaires et oculo-ganglionnaires, respectivement. Les formes oro-pharyngées qui surviennent après ingestion de la bactérie correspondent à une adénopathie cervicale associée ou non à des lésions buccales. Les formes pneumoniques quant à elles prennent la forme d'infections pulmonaires, survenant après une contamination par voie aérienne ou comme foyer d'infection secondaire après dissémination par voie sanguine de l'agent infectieux. Enfin, les formes typhoïdiques se présentent comme des septicémies sans point d'appel apparent. Le traitement de ces différentes formes, basé sur l'administration d'un antibiotique, varie en fonction de la sévérité de l'infection. Les formes ganglionnaires de sévérité moyenne à modérée sont prises en charge par l'administration d'une fluoroquinolone (ciprofloxacine, levofloxacine) ou d'une tétracycline (doxycycline). L'utilisation des aminosides (streptomycine, gentamicine) est réservée aux formes systémiques plus sévères.

F. tularensis se présente sous la forme d'un petit bacille à Gram négatif intracellulaire facultatif. Son pouvoir pathogène réside principalement dans sa capacité à se multiplier *in vivo* dans de nombreux types cellulaires. L'action des antibiotiques dans ce compartiment n'est pas nécessairement équivalente à celle évaluée en milieu liquide (CMI). Cette évaluation passe par la mise en contact de l'antibiotique dans le milieu de culture cellulaire incubé avec une culture de cellules eucaryotes infectées par la bactérie, permettant l'évaluation de la concentration extracellulaire minimale inhibitrice (CEMI). Diverses techniques ont été décrites, évaluant la survie et la prolifération bactérienne intracellulaire (PCR en temps réel, immunofluorescence directe), la référence reste la numération des bactéries viables

(NBV). La stratégie inverse est également applicable, à savoir déduire la prolifération bactérienne par la lyse cellulaire induite. Cette dernière est mise en évidence par l'utilisation d'une coloration dite « vivante », les cellules vivantes internalisant activement les colorants comme le cristal violet ou le rouge neutre.

Cette étude a pour objectif l'adaptation d'une technique « dye uptake » (DUA) que nous avons dans un premier temps confronté à la NBV. Cette technique par sa simplicité de mise en œuvre a permis l'évaluation de l'activité de plusieurs molécules antibiotiques contre deux souches de *F. tularensis* subsp. *holarctica* intracellulaires. Elle permettrait également l'évaluation de l'activité de nouvelles molécules, et de la résistance des souches cliniques sur un modèle intracellulaire.

5.1.2 Méthode

Pour cette étude, deux souches cliniques de *F. tularensis* subsp. *holarctica* Biovar I. Ces souches, dénommées Ft6 et Ft24, ont été isolées en France d'une hémoculture et d'une adénopathie, respectivement. Les déterminations de CMI ont été réalisées comme décrit précédemment (*cf.* section **TRAVAUX SCIENTIFIQUES**, paragraphe 2.2). La détermination des CEMI a été réalisée sur un modèle d'infection de cellules issues d'une lignée humaine de fibroblastes pulmonaires (MRC-5). Elles sont strictement adhérentes et arrêtent leur multiplication quand arrivées à confluence. Ces propriétés permettent le contrôle de la quantité de cellules dans les essais. Les tapis cellulaires à confluence ont été infectés par $1,2 \times 10^5$ bactéries (MOI=10 :1) suivant un protocole d'essai protégé par la gentamicine. Les cellules infectées ont été incubées dans un milieu de culture adapté contenant des concentrations d'antibiotiques croissantes de raison 2. La NBV a été réalisée à partir des lysats cellulaires 1 heure (T1) et 24 heures (T24) post-infection. Pour le DUA, le protocole de coloration des cellules vivantes par le rouge neutre a été appliqué à 5 jours post-infection. La coloration des tapis cellulaires a alors été évaluée de manière visuelle.

Nous avons dans un premier temps validé notre DUA au test de référence par NBV. Pour cela, les deux essais ont été réalisés en parallèle et en double avec la souche Ft6 pour la ciprofloxacine et la doxycycline.

Les CMI et CEMI par DUA ont ensuite été déterminées pour 11 antibiotiques : gentamicine, ciprofloxacine, levofloxacine, moxifloxacine, doxycycline, erythromycine, imipénème, méropénème, rifampicine, linézolide et daptomycine.

5.1.3 Résultats

Les tests menés pour la validation du DUA permettent tout d'abord de confirmer la capacité de multiplication des souches cliniques de *F. tularensis* subsp. *holarctica* dans le modèle cellulaire utilisé. La comparaison des résultats de CEMI obtenus par le DUA et la méthode de NBV sont de 0,125mg/L pour la ciprofloxacine et respectivement de 0,25 et 0,5mg/L pour la doxycycline, validant son utilisation. De plus, la NBV pour les concentrations d'antibiotiques supérieures à la CEMI montre une diminution plus importante de la charge bactérienne intracellulaire pour la ciprofloxacine (environ 2log en comparant les numérations à T1 et T24) que pour la doxycycline (environ 1log). Pour finir, le DUA montre pour des concentrations de doxycycline supérieures à 1,0mg/L une diminution progressive de l'intensité de coloration des tapis cellulaires suggérant une cytotoxicité de l'antibiotique à fortes concentrations pour les cellules MRC-5.

La détermination des CMI pour les souches cliniques Ft6 et Ft24 montre des valeurs équivalentes pour l'ensemble des antibiotiques testés, à l'exception de l'érythromycine (4,0 et 16mg/L, respectivement). Elles sont également conformes aux CMI précédemment observées pour les souches de biovar I. Concernant les valeurs de CEMI, elles sont comparables pour les deux souches testées.

La comparaison des CMI et des CEMI permet de dégager quatre tendances. 1/ les valeurs de CMI et de CEMI sont équivalentes et montrent une activité de l'antibiotique vis-à-vis des souches testées. C'est le cas pour les fluoroquinolones testées (ciprofloxacine, levofloxacine et moxifloxacine), la doxycycline (sensible) et la rifampicine (sensibilité intermédiaire). 2/ les valeurs de CMI et de CEMI sont équivalentes et ne montrent aucune activité contre *F. tularensis* en intra et extracellulaire (carbapénèmes et daptomycine). 3/ Les valeurs de CMI sont inférieures à celles des CEMI, correspondant à une activité limitée dans le compartiment cellulaire. Le seul antibiotique correspondant à ce profil est la gentamicine. Cette différence est probablement liée aux difficultés d'internalisation de cet antibiotique dans les cellules eucaryotes, ayant pour effet le retard de l'activité intracellulaire de celui-ci. Dans notre modèle, ce délai se manifeste sous la forme d'une lyse accrue des tapis cellulaires dans les premiers jours d'incubation, élevant la valeur de la CEMI. 4/ Les valeurs de CMI sont supérieures à celles des CEMI, correspondant à une activité accrue dans le compartiment cellulaire. Ce profil est observé pour deux antibiotiques : l'érythromycine et le linézolide. Pour le premier, le

phénomène de concentration dans les compartiments intracellulaires présentant un pH acide (lysosomes) est connu et pourrait expliquer ce regain d'activité. Pour le second, les résultats observés dans cette étude sont surprenants, la concentration intracellulaire n'ayant pas été observées à ce jour.

5.1.4 Conclusion

En conclusion, cette étude décrit une méthode permettant l'évaluation rapide de l'activité de nouveaux composés contre *F. tularensis*; et de l'activité des antibiotiques actuellement utilisés en thérapeutique contre les souches cliniques isolées. De plus, cette méthode étant plus facile à mettre en œuvre que les méthodes précédemment décrites. Elle peut être largement utilisée, permettant ainsi une comparaison inter-étude plus aisée. Enfin, nous avons confirmé l'activité des antibiotiques actuellement recommandés pour le traitement de la tularémie et mis en lumière l'intérêt que pourrait présenter le linézolide, dont l'utilisation est aujourd'hui restreinte au traitement des cocci à Gram positif.



A new dye uptake assay to test the activity of antibiotics against intracellular *Francisella tularensis*

Vivien Sutera^{1,2,3*}, Yvan Caspar^{1,2,3}, Sandrine Boisset^{1,2,3} and Max Maurin^{1,2,3}

¹ Laboratoire de Bactériologie, Département des Agents Infectieux, Institut de Biologie et de Pathologie, Centre Hospitalier Universitaire Grenoble, Grenoble, France

² Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Micro-Organismes, Université Joseph Fourier-Grenoble 1, Grenoble Cedex 9, France

³ CNRS, UMR 5163, Grenoble, France

Edited by:

Didier Raoult, Université de la Méditerranée, France

Reviewed by:

Lee-Ann H. Allen, University of Iowa, USA

Michael F. Minnick, The University of Montana, USA

*Correspondence:

Vivien Sutera, Laboratoire de Bactériologie, Département des Agents Infectieux, Institut de Biologie et de Pathologie, Centre Hospitalier Universitaire Grenoble, CS10217 38043 Grenoble Cedex 9, France
e-mail: vsutera@chu-grenoble.fr

Francisella tularensis, a facultative intracellular bacterium, is the aetiological agent of tularaemia. Antibiotic treatment of this zoonosis is based on the administration of a fluoroquinolone or a tetracycline for cases with mild to moderate severity, whereas an aminoglycoside (streptomycin or gentamicin) is advocated for severe cases. However, treatment failures and relapses remain frequent, especially in patients suffering from chronic lymph node suppuration. Therefore, new treatment alternatives are needed. We have developed a dye uptake assay for determination of minimal inhibitory extracellular concentrations (MIECs) of antibiotics against intracellular *F. tularensis*, and validated the method by comparing the results obtained using a CFU-enumerating method. We also compared MIECs with MICs of the same compounds determined using a CLSI broth microdilution method. We tested the activity of 11 antibiotics against two clinical strains of *F. tularensis* subsp. *holarctica* isolated in France. Both strains displayed low MICs ($\leq 1 \mu\text{g/mL}$) to fluoroquinolones (ciprofloxacin, levofloxacin and moxifloxacin), gentamicin, doxycycline and rifampicin. Higher MICs ($\geq 8 \mu\text{g/mL}$) were found for carbapenems (imipenem and meropenem), daptomycin and linezolid. Erythromycin MICs were 4.0 and 16.0 $\mu\text{g/mL}$, respectively, for the two clinical strains. MIECs were almost the same with the two methods used. They were concordant with MICs, except for erythromycin and linezolid (respectively, four and eight times more active against intracellular *F. tularensis*) and gentamicin (four to eight times less active against intracellular *F. tularensis*). This study validated the dye uptake assay as a new tool for determination of the activity of a large panel of antibiotics against intracellular *F. tularensis*. This test confirmed the intracellular activity of first-line antibiotics used for tularaemia treatment, but also revealed significant activity of linezolid against intracellular *F. tularensis*.

Keywords: tularaemia, *Francisella tularensis*, dye uptake assay, antibiotic activity, intracellular infection

INTRODUCTION

Tularaemia is a zoonotic disease caused by the Gram-negative bacterium *Francisella tularensis*. Two subspecies are responsible for the majority of human infections, including *F. tularensis* subsp. *tularensis* in North America and *F. tularensis* subsp. *holarctica* throughout the Northern hemisphere. The latter subspecies is split into two biovars. Biovar I, naturally susceptible to erythromycin, is found in North America and Western Europe. Biovar II, naturally resistant to erythromycin, is found in Eastern Europe and Asia (Keim et al., 2007). *F. tularensis* is highly infectious for humans and has been classified as a category A bioterrorism agent by the CDC (Bossi et al., 2004).

Only a few antibiotic classes are effective to treat tularaemia patients. The aminoglycosides (streptomycin and gentamicin) are considered the reference treatment for severe forms of the disease (Hepburn and Simon, 2008). For mild to moderate tularaemia cases, fluoroquinolones (ciprofloxacin, levofloxacin) and tetracyclines (doxycycline) are advocated as first-line drugs (Tärnvik and Chu, 2007). All these antibiotics have side effects and their

use should be restricted especially in pregnant women (Dentan et al., 2013). Moreover, antibiotic treatments using a tetracycline or a fluoroquinolone are associated with high rates of failure and relapse (Johansson et al., 2001; Perez-Castrillon et al., 2001). Finally, high-level resistance to macrolides, tetracyclines and fluoroquinolones was easily selected *in vitro* in *F. tularensis* (La Scola et al., 2008; Gestin et al., 2010; Loveless et al., 2010; Sutera et al., 2014), which raises some concern about the misuse of resistant strains in the bioterrorism context or the possibility of *in vivo* selection of such resistance in tularaemia patients.

F. tularensis is a slow growing, facultative intracellular bacterium. It replicates in the cytoplasm of macrophages (Anthony et al., 1991; Chong and Celli, 2010) and non-phagocytic cells (Hall et al., 2007). Both cell types are involved in tularaemia patients, especially in the lower airways in patients suffering from pneumonia (Horzempa et al., 2010). A number of techniques have been developed to test the activity of antibiotics against intracellular pathogens. In most studies, the intracellular activity of the tested antibiotic is evaluated by measuring the viable

bacterial counts (VBCs) after antibiotic exposure compared to an untreated control. VBCs are usually determined using the colony forming unit (CFU)-enumeration methodology (Segreti et al., 1996; Wright Valderas and Barrow, 2008). Because this technique is fastidious and time consuming and not adapted for microorganisms growing exclusively in eukaryotic cells, methods based on DNA quantification using quantitative real-time PCR technology (Boulos et al., 2004) or immunofluorescent-antibody testing (Ives et al., 1997) have been proposed. The intracellular growth of bacteria can also be deduced from their cytotoxic effect in eukaryotic cell culture systems (Edouard and Raoult, 2013), especially using a simple dye uptake assay, as previously described for strict intracellular bacteria such as *Rickettsia* species (Rolain et al., 1998). This technique is based on the capacity for live cells to internalize a vital dye such as neutral red (Borenfreund and Puermer, 1985). In this system, the activity of an antibiotic is deduced from its potential to prevent cytotoxic effects by inhibiting bacterial multiplication.

In this study, we adapted the dye uptake assay to evaluate the activity of several antibiotics against two clinical strains of *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Our first goal was to demonstrate that this simple technique gives equivalent results compared to the VBCs method. Because the dye uptake assay is much easier to perform, it allowed us to screen the intracellular activity of a large number of antibiotic compounds against several strains of *F. tularensis*. This work could facilitate the search for new treatment alternatives for tularaemia, as well as the detection of acquired resistances to available antibiotics.

MATERIALS AND METHODS

BACTERIAL STRAINS AND CELL LINE

Two clinical strains of *F. tularensis* subsp. *holarctica* were used: Ft6 isolated in 2007 from a blood culture and Ft24 isolated in 2009 from an axillary lymphadenopathy. Both strains were identified to the subspecies level by sequencing the intergenic region located between 16S and 23S RNA encoding genes (Maurin et al., 2011). They were kept frozen in cryotubes (MastDiagnostic, Amiens, France) at -80°C . They were grown in a biosafety level 3 laboratory, using chocolate agar supplemented with Polyvitex® (CHA-PVX medium, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) incubated at 37°C in a 5% CO_2 -enriched atmosphere.

We used three control strains for MIC determination: *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC29213. They were grown on Columbia medium supplemented with 5% sheep blood (COS medium, bioMérieux) incubated 24 h at 37°C with 5% CO_2 .

For the cell system, we used the human pulmonary diploid fibroblastic cells MRC-5 (RD Biotech, Besançon, France). Cell monolayers were grown in Minimum Essential Medium (MEM, Gibco®, Life Technologies, Saint Aubin, France) supplemented with 10% de complemented foetal calf serum (FCS, Gibco), at 37°C , in a 5% CO_2 -enriched atmosphere. These fibroblastic cells are strictly adhesive and stop their multiplication when at confluence, which enables cells proliferation control. Moreover, this model has already been used for susceptibility testing of other pathogens such as *Legionella pneumophila* (Segreti et al., 1996) or *Tropheryma whippelii* (Boulos et al., 2004). Finally, *F. tularensis*

subsp. *holarctica* strains were able to efficiently infect and proliferate in this model (cf. Result section).

ANTIBIOTICS

We used ciprofloxacin (Panpharma, Fougères, France), levofloxacin (Fresenius kabi, Sèvres, France), moxifloxacin (Bayer, Puteaux, France), imipenem (Panpharma), meropenem (Panpharma), daptomycin (Novartis, Rueil-Malmaison, France), doxycycline (Sigma-Aldrich, Lyon, France), rifampicin (Sanofi-Aventis, Paris, France), gentamicin (Panpharma), linezolid (Pfizer, Paris, France) and erythromycin (Fluka, Lausanne, Switzerland). Stock solutions of these 11 antibiotics were prepared in sterile distilled water for gentamicin, ciprofloxacin and erythromycin, and in 0.45% sodium chloride solution for the other antibiotics, and kept frozen at -80°C until used.

MIC DETERMINATION

MICs were determined using a microdilution method in Mueller-Hinton (MH) broth (bioMérieux) supplemented with 2% PolyViteX®, using a CLSI methodology (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009).

Briefly, each antibiotic was diluted in MH-2%PVX to obtain twofold serial concentrations (Table 1), and $75\ \mu\text{L}$ of each suspension was dispensed in one well of 96-well microtiter plates. An equal volume of a 10^6 bacterial suspension was added to each well. After incubation of the plates for 48 h at 37°C , the lowest antibiotic concentration inhibiting visible bacterial growth was recorded as the MIC. All experiments were run in duplicate. The reference strains *E. coli* ATCC25922, *P. aeruginosa* ATCC27853 and *S. aureus* ATCC29213 were used as positive controls. Wells receiving only MH broth were used as negative controls.

MIEC DETERMINATION

The MRC-5 cells were prepared in MEM-10% FCS at a concentration of 6×10^5 cells/mL. This cell suspension was dispensed ($100\ \mu\text{L}$ per well) in flat-bottom 96-well microtiter plates, and incubated 16 h at 37°C in a 5% CO_2 -enriched atmosphere to

Table 1 | Ranges of antibiotic concentrations tested for determination of MICs (broth microdilution method) and MIECs (dye uptake assay) for 11 antibiotics against *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*.

Antibiotics	Antibiotic targets	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MIEC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Gentamicin	Ribosome	0.032–16	0.064–32
Ciprofloxacin	Type II topoisomerases	0.001–0.5	0.004–2.0
Levofloxacin	Type II topoisomerases	0.001–0.5	0.004–2.0
Moxifloxacin	Type II topoisomerases	0.001–0.5	0.004–2.0
Doxycycline	Ribosome	0.032–16	0.032–16
Erythromycin	Ribosome	0.25–128	0.25–128
Imipenem	Cell wall	0.25–128	0.25–128
Meropenem	Cell wall	0.25–128	0.25–128
Linezolid	Ribosome	0.064–32	0.064–32
Rifampicin	RNA polymerase	0.004–2.0	0.016–8.0
Daptomycin	Cytoplasmic membrane	0.5–256	0.5–256

MIC, minimum inhibitory concentration; MIEC, minimum inhibitory extracellular concentration.

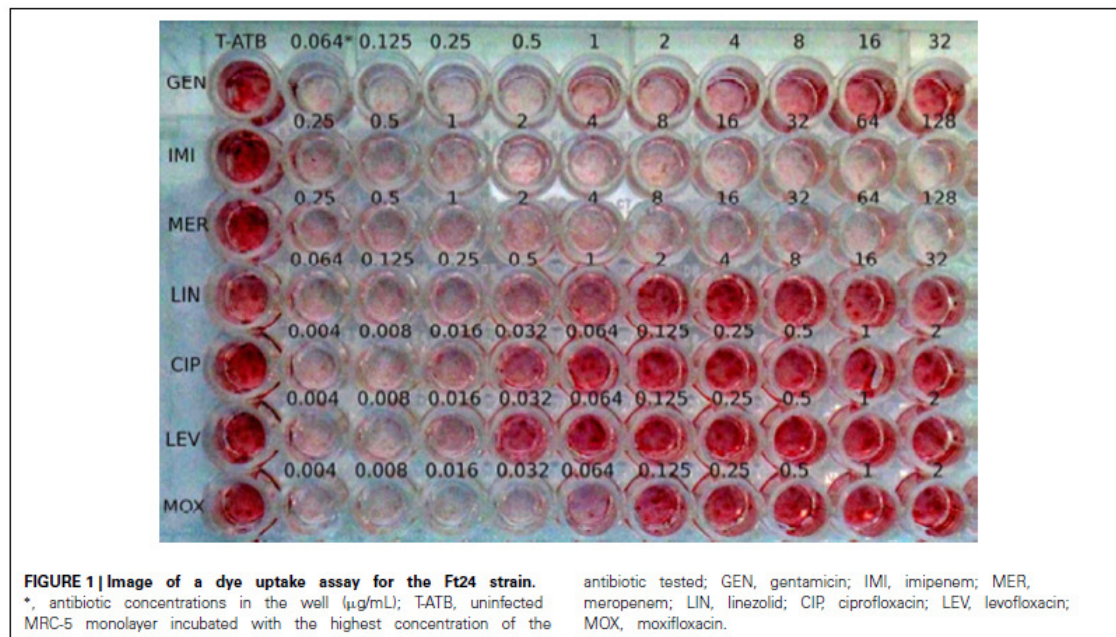
obtain confluent cell monolayers. In parallel, a 1-McFd standard suspension of each *F. tularensis* strain tested was grown for 24 h in brain-heart infusion broth (BHI, bioMérieux) supplemented with 2% PVX, at 37°C, in 5% CO₂. For each strain, the bacterial suspension obtained was adjusted to 0.5 McF standard by adding BHI-2%PVX, and further diluted in MEM-10% FCS to achieve a bacterial inoculum of 1.2×10^5 bacteria/50 μ L of medium (i.e., 2.4×10^6 bacteria/mL). The cell monolayers were infected by replacing the supernatant with 50 μ L of the previously prepared bacterial suspension. The plates were incubated at 37°C, in 5% CO₂ for 3 h to allow internalization of bacteria into MRC-5 cells. Cell monolayers were then washed in pH 7.2 sterile phosphate buffer saline (PBS, Gibco) and re-incubated for 1 h (37°C, 5% CO₂) in MEM-10% FCS medium containing 5 μ g/mL of gentamicin in order to eliminate extracellular bacteria. At that time, the intracellular bacterium inoculum (referred to as the primary intracellular inoculum) was determined using the CFU-enumeration method (see below). After 3 additional washes with PBS, infected MRC-5 monolayers were incubated (37°C, 5% CO₂) in MEM-10% FCS medium containing twofold serial concentrations of the tested antibiotic (Table 1). MIECs were read after 1 or 5 days incubation of the plates at 37°C, in 5% CO₂ for the CFU method and the dye uptake assay, respectively. All assays included a *F. tularensis* positive growth control (infected MRC-5 cells with no antibiotic) and two negative controls (uninfected MRC-5 with no antibiotic or with the antibiotic at the maximum concentration tested). The activity of antibiotics against intracellular *F. tularensis* was then evaluated in parallel using two methods: the dye uptake assay and CFU counting. All experiments were run in duplicates to confirm results.

Dye uptake assay

After incubation of the plates, the cell supernatants were removed and replaced with 50 μ L of 0.15% neutral red dye (Sigma-Aldrich) in PBS, pH 5.5. The plates were incubated 1 h at 37°C in 5% CO₂ to allow penetration of the dye into the cells. The excess dye was then removed by three washes in PBS, pH 6.5. The red staining of cell monolayers was visually evaluated in comparison to positive (T+, MRC-5 monolayer infected at MOI 200:1 without antibiotics) and negative controls (T-ATB, uninfected MRC-5 monolayer incubated with the highest concentration of the antibiotic tested). A staining score of 1 corresponded to complete lysis of the cell monolayer, i.e., T+ control. A staining score of 4 corresponded to full preservation of the cell monolayer, i.e., T-ATB control. Scores 2 and 3 corresponded to intermediate color intensities (Figure 1). The MIEC was defined as the minimum extracellular concentration of the antibiotic tested allowing prevention of a *F. tularensis* cytotoxic effect (staining score of 4).

CFU counts

After incubation of the plates, the cell supernatants were removed and replaced with 200 μ L of 1% saponin solution (ProLabo®, Leuven, Belgium). The plates were incubated 15 min at room temperature to allow disruption of the eukaryotic cell membranes and release of intracellular bacteria into the cell supernatant. After homogenisation, 1, 10, and 100 μ L of the bacterial suspension of each well were plated on CHA-PVX media. CFU counts were determined after 48 h incubation of the CHA-PVX plates at 37°C, in 5% CO₂. The same procedure was used to determine the primary intracellular bacterial inoculum, as mentioned above. Thus



the activity of antibiotics was deduced from their capacity to completely inhibit bacterial growth, i.e., CFU counts after antibiotic exposure \geq CFU counts of the primary intracellular bacterial inoculum.

RESULTS

DYE UPTAKE ASSAY VALIDATION

We first tested the activity of ciprofloxacin and doxycycline against intracellular *F. tularensis* Ft6 strain, using both the CFU and dye uptake assays (Figure 2). For drug-free controls, the mean increase in intracellular bacterial loads after 24 h incubation of cultures was between 2.41 and 3.43 log CFU/well (data not shown). As for ciprofloxacin (Figure 2A), the CFU method determined the MIEC to be 0.125 $\mu\text{g/mL}$. The same method also revealed that ciprofloxacin induced a two-log reduction of bacterial loads at concentrations above the MIEC. The dye uptake assay showed complete destruction of the cell monolayers after 5 days incubation of cultures (score = 1) at ciprofloxacin concentrations up to 0.032 $\mu\text{g/mL}$, a score of 3 at 0.064 $\mu\text{g/mL}$, and a score of 4 for concentrations \geq 0.125 $\mu\text{g/mL}$. Thus, ciprofloxacin MIEC was the same for the dye uptake and CFU count assays. For doxycycline (Figure 2B), the MIECs were 0.25 $\mu\text{g/mL}$ and 0.5 $\mu\text{g/mL}$ using the CFU and dye uptake assays, respectively. Doxycycline only induced a lower (<1 log) reduction in bacterial counts after 24 h incubation. Also, a reduction in the dye uptake scores was observed for doxycycline concentrations \geq 2 $\mu\text{g/mL}$, suggesting a toxic effect of this compound against MRC-5 cells at these concentrations.

MICs AND MIECs OF 11 ANTIBIOTICS AGAINST *F. TULARENSIS* FT6 AND FT24 STRAINS

Both strains displayed low MICs for gentamicin, fluoroquinolones (ciprofloxacin, levofloxacin and moxifloxacin), doxycycline and rifampicin (Table 2). Erythromycin was less effective, with four times higher MIC for the Ft24 strain compared to the Ft6 strain. The carbapenems (imipenem, meropenem) and daptomycin had no inhibitory activity against *F. tularensis*. Similar MIC and MIEC values were obtained for fluoroquinolones,

doxycycline and rifampicin. Gentamicin was less effective against intracellular *F. tularensis*, with MIECs four to eight times higher than MICs. In contrast, erythromycin and linezolid displayed improved activity against intracellular *F. tularensis*. MIECs were four to eight times lower than MICs for erythromycin and eight times lower than MICs for linezolid.

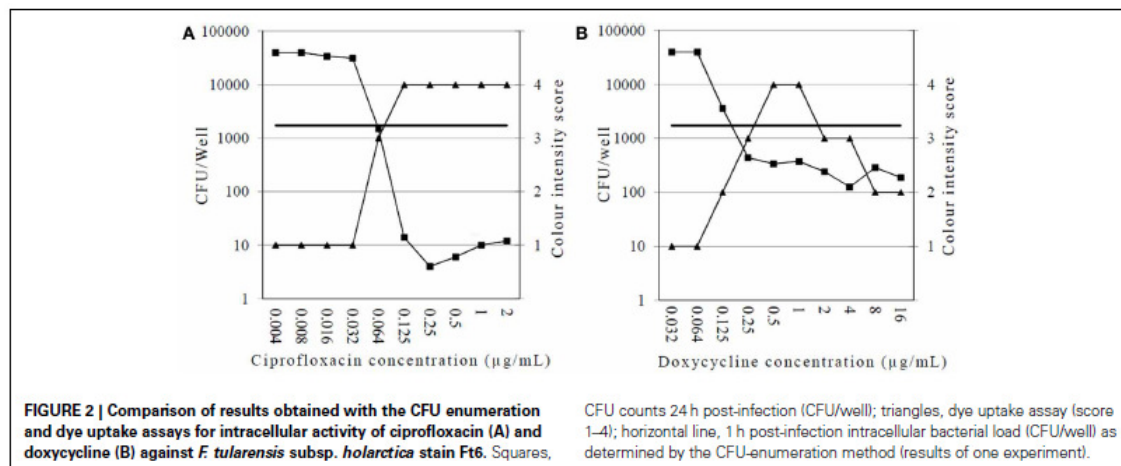
DISCUSSION

We adapted a dye uptake assay previously used to test the antibiotic susceptibilities of strict intracellular pathogens (Rolain et al., 1998) to investigate the activity of antibiotics against the intracellular form of the facultative intracellular bacterium *F. tularensis*. This test is safer than traditional CFU-based assays because it does not need manipulation of large quantities of culture dishes of this highly infectious agent. Although the test should be performed in a biosafety level 3 laboratory, the intracellular activity of several

Table 2 | Activities of 11 antibiotics against two clinical strains (Ft6 and Ft24) of *F. tularensis* subsp. *holarctica* determined using a broth microdilution method and a dye uptake assay, respectively.

	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		MIEC ($\mu\text{g/mL}$)	
	Ft6	Ft24	Ft6	Ft24
Gentamicin	0.25	0.5	2	2
Ciprofloxacin	0.032	0.032	0.064	0.064
Levofloxacin	0.064	0.064	0.064	0.064
Moxifloxacin	0.125	0.125	0.125	0.125
Doxycycline	0.5	1	0.5	0.5
Erythromycin	4	16	1	2
Imipenem	>128	>128	>128	>128
Meropenem	>128	>128	>128	>128
Linezolid	8	8	1	1
Rifampicin	0.5	0.5	0.5	0.5
Daptomycin	>256	>256	>256	>256

MIC, minimum inhibitory concentration; MIEC, minimum inhibitory extracellular concentration.



compounds against a large panel of type A and type B *F. tularensis* strains could be easily achieved. We first validated this new assay by comparing the results obtained for two antibiotics against two clinical strains of *F. tularensis* subsp. *holarctica* when using either the dye uptake assay or a traditional method of VBC determination using CFU methodology. We found a high correlation between MIECs determined using both methods. This was not unexpected since, in our model, *F. tularensis* multiplication led to complete lysis of cell monolayers. In contrast, inhibition of intracellular bacterial growth prevented *F. tularensis* cytolytic effects. Complete monolayer lysis was revealed using the live stain neutral red. This molecule is commonly used for cytotoxicity (Borenfreund and Puerner, 1985) or vacuolation assays (Cover et al., 1991), as it rapidly accumulates in lysosomes after penetration in viable cells by diffusion through the cytoplasmic membrane. It has been previously shown that the presence of weak bases (Ohkuma and Poole, 1981) or bacterial compound (Cover et al., 1991) influences vacuoles production level. Crystal violet has been used for similar experiments with the advantage that this stain binds to chromatin and thus color intensity may not vary according to the antibiotic used (Brasaemle and Attie, 1988). However, we observed an increase in neutral red uptake in cells exposed to antibiotics facilitating interpretation of results due to higher contrast between lysed and unlysed monolayers (Figure 1). For standardization, we framed each assay with controls used as visual cut-off for independent interpretation for each antibiotic (i.e., Materials and Methods section).

We then evaluated the extracellular and intracellular activity of 11 antibiotic compounds against the same two clinical strains of *F. tularensis*, respectively, using a CLSI broth microdilution method and the dye uptake assay developed. The broth microdilution method for antibiotic susceptibility testing of *F. tularensis* remains fastidious and the results are poorly predictive of the clinical situation for some antibiotics (Valade et al., 2008). Numerous controls are also needed, such as the use of non-fastidious control strains to check antibiotic activity in more standardized conditions. MIC results were consistent with previous studies. As expected, the carbapenems, which belong to the beta-lactams family, were not effective against *F. tularensis* (Georgi et al., 2012). Both strains were susceptible to antibiotics used as first-line treatment of tularaemia, including three fluoroquinolone compounds, doxycycline and gentamicin (Urich and Petersen, 2008; Valade et al., 2008). Rifampicin was also highly effective against *F. tularensis* *in vitro*. Erythromycin was less effective, although we tested type B biovar I strains of *F. tularensis*, which was consistent with previous studies (Gestin et al., 2010; Georgi et al., 2012). The new compounds daptomycin (a lipopeptide) and linezolid (an oxazolidinone) were either ineffective or poorly effective against extracellular *F. tularensis*. To our knowledge, linezolid has only been tested against *Francisella* sp. strains using MIC test strips, with inconsistent results between studies. MIC ranges were 2–16 µg/mL for North American strains tested using Mueller-Hinton supplemented with 1% IsovitaleX (Johansson et al., 2002) and 0.5–2.0 µg/mL for Turkish strains from central Anatolia tested using glucose/cysteine blood agar (GCBA) plates supplemented with 9% sheep blood (Yeşilyurt et al., 2011), whereas the MIC₉₀ was 32 µg/mL for Hungarian

strains tested using modified Francis agar plates (Kreuzinger et al., 2012). These discrepancies may represent true differences in linezolid susceptibilities among *F. tularensis* strains of different geographic origin, but may also reflect poor standardization of the methods used. Valade et al. (2008) previously demonstrated that MIC test strips gave different results when using different agar media, and that the results obtained with this method were poorly correlated to those obtained using the reference agar dilution method, especially for nalidixic acid and rifampicin.

We found ciprofloxacin and doxycycline had similar inhibitory activity against extracellular and intracellular *F. tularensis*. These two antibiotic classes are concentrated within eukaryotic cells (Hof, 2003) and are used as reference treatments for infectious diseases caused by intracellular pathogens (Rolain et al., 1998; Wright Valderas and Barrow, 2008). However, using the CFU method, we found a more pronounced bactericidal effect of ciprofloxacin as compared to doxycycline against *F. tularensis* strains grown in MRC-5 cells, which confirms previously published data using macrophage-like cells (Maurin et al., 2000). These findings are consistent with the current recommendation of the use of ciprofloxacin and doxycycline as first-line treatment of tularaemia (Johansson et al., 2000; Scheffel et al., 2010; Maurin et al., 2011). In our model, the aminoglycoside gentamicin was four to eight times less effective against the intracellular form of *F. tularensis*. Previous experiments have shown that gentamicin displays a bactericidal activity against intracellular *F. tularensis*, but prolonged exposure of infected cells to this antibiotic is needed because of its slow penetration and concentration within eukaryotic cells (Maurin and Raoult, 2001). Whereas streptomycin was considered the referenced treatment of tularaemia (Tärnvik and Chu, 2007), gentamicin has been recently associated with treatment failures and relapses (Kaya et al., 2012).

Regarding antibiotics not currently recommended for treatment of tularaemia, three situations were observed. Rifampicin displayed similar extracellular and intracellular activities. This antibiotic is not used for treatment of tularaemia because of concern about selection of resistant mutants (Bhatnagar et al., 1994). Daptomycin and the carbapenems were not effective against the extra- and intracellular forms of the two *F. tularensis* strains tested. The beta-lactams are usually considered unreliable for treatment of tularaemia (Cross and Jacobs, 1993). Although *F. tularensis* may harbor a class A beta-lactamase (Antunes et al., 2012), mechanisms of resistance to carbapenems in this species need further investigation. To our knowledge, susceptibility to imipenem has been reported only for three biovar II strains of *F. tularensis* subsp. *holarctica* (including the LVS strain) (Tomaso et al., 2005). Lee et al. (1991) reported a case of tularaemia with favorable progression after 14-day treatment with imipenem. Finally, erythromycin and linezolid were more active when tested in the MRC-5 cell system. MIECs were eight times lower than MICs, suggesting that these compounds could concentrate in the intracellular compartment of *F. tularensis* multiplication. The same observation was previously reported for azithromycin and the LVS strain of *F. tularensis* (Ahmad et al., 2010). Erythromycin, like other macrolides, can concentrate within acidic compartments of eukaryotic cells (especially lysosomes) because of their

low base nature (Carlier et al., 1987). However, their intracellular activity may be reduced owing to their protonation at acidic pH (Goldman et al., 1990). The macrolides are not considered a safe alternative for tularaemia patients (Enderlin et al., 1994), but recent case reports indicate that azithromycin may be useful in pregnant women with mild disease caused by type B biovar I strains of *F. tularensis* (Dentan et al., 2013). More surprisingly, linezolid displayed significant activity against intracellular *F. tularensis* *in vitro*. This oxazolidinone is currently used for treatment of infections caused by multi-drug-resistant Gram-positive bacterial species, such as *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Enterococcus* sp. Interestingly, an additive effect of the combination of linezolid and gentamicin was reported against *S. aureus* (Grohs et al., 2003). Linezolid is not active against aerobic Gram-negative bacteria such as enterobacterial and *Pseudomonas* sp. (Leclercq, 2010). On the other hand, linezolid did not accumulate in THP-1 human macrophage cells (Lemaire et al., 2011). Thus, the mechanism of action of linezolid against intracellular *F. tularensis* should be further investigated.

In conclusion, we adapted a dye uptake assay in order to evaluate the activity of antibiotics against intracellular *F. tularensis*. This test would facilitate screening of the activity of new compounds against this fastidious, facultative intracellular bacterium in the search for new therapeutic alternatives for tularaemia. Also, because the proposed technique is much easier to perform than the traditional CFU methodology, it may help standardize antibiotic susceptibility testing for *F. tularensis* strains. Finally, this study highlights the potential usefulness of linezolid as a therapeutic alternative for tularaemia patients, especially in case of failure or relapses after administration of current first-line antibiotics. *In vitro* results obtained with this drug warrant further investigation in animal models.

AUTHOR CONTRIBUTION

Research project design: Vivien Sutera and Max Maurin. Experiments: Vivien Sutera, Yvan Caspar and Sandrine Boisset. Writing: Vivien Sutera and Max Maurin.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Linda Northrup for English editing. This work was supported by the Institut National de Veille Sanitaire (InVS), the Direction Générale de l'Armement (DGA, 07CO301), and the Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) of Grenoble, Joseph Fourier University-Grenoble I.

REFERENCES

- Ahmad, S., Hunter, L., Aiping, Q., Mann, B. J., and Van Hoek, M. L. (2010). Azithromycin effectiveness against intracellular infections of *Francisella*. *BMC Microbiol.* 10:123. doi: 10.1186/1471-2180-10-123
- Anthony, L. S. D., Burke, R. D., and Nano, F. E. (1991). Growth of *Francisella* spp. in rodent macrophages. *Infect. Immun.* 59, 3291–3296.
- Antunes, R. T., Frase, H., Toth, M., and Vakulenko, S. B. (2012). The class A β -lactamase FTU-1 is native to *Francisella tularensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 666–671. doi: 10.1128/AAC.05305-11
- Bhatnagar, N., Getachew, E., Straley, S., Williams, J., Meltzer, M., and Fortier, A. (1994). Reduced virulence of rifampicin-resistant mutants of *Francisella tularensis*. *J. Infect. Dis.* 170, 841–847. doi: 10.1093/infdis/170.4.841
- Borenfreund, E., and Puerner, J. A. (1985). Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol. Lett.* 24, 119–124. doi: 10.1016/0378-4274(85)90046-3
- Bossi, P., Tegnelli, A., Baka, A., Van Loock, F., Hendriks, J., Werner, A., et al. (2004). Bichat guidelines for the clinical management of tularaemia and bioterrorism-related tularaemia. *Euro Surveill.* 9, E9–E10.
- Boulos, A., Rolain, J. M., and Raoult, D. (2004). Antibiotic susceptibility of *Tropheryma whippelii* in MRC-5 cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 747–752. doi: 10.1128/AAC.48.3.747-752.2004
- Brasaemle, D. L., and Attie, A. D. (1988). Microelisa reader quantitation of fixed, stained, solubilised cells in microtitre dishes. *BioTechniques* 6, 418–419.
- Carlier, M. B., Zenebergh, A., and Tulkens, P. M. (1987). Cellular uptake and sub-cellular distribution of roxithromycin and erythromycin in phagocytic cells. *J. Antimicrob. Chemother.* 20, 47–56. doi: 10.1093/jac/20.suppl_B.47
- Chong, A., and Celli, J. (2010). The *Francisella* intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. *Front. Microbiol.* 1:138. doi: 10.3389/fmicb.2010.00138
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing—Nineteenth Informational Supplement M100-S19*. Wayne, PA: CLSI.
- Cover, T. L., Puryear W., Perez-Perez, G. I., and Blaser, M. J. (1991). Effect of urease on HeLa cell vacuolation induced by *Helicobacter pylori* cytotoxin. *Infect. Immun.* 59, 1264–1270.
- Cross, J. T., and Jacobs, R. E. (1993). Tularaemia: treatment failures with outpatient use of ceftriaxone. *Clin. Infect. Dis.* 17, 976–980. doi: 10.1093/clinids/17.6.976
- Dentan, C., Pavese, P., Pelloux, I., Boisset, S., Brion, J. P., Stahl, J. P., et al. (2013). Treatment of tularaemia in pregnant woman, France. *Emerging Infect. Dis.* 19, 996–998. doi: 10.3201/eid1906.130138
- Edouard, S., and Raoult, D. (2013). Use of the plaque assay for testing the antibiotic susceptibility of intracellular bacteria. *Future Microbiol.* 8, 1301–1316. doi: 10.2217/fmb.13.98
- Enderlin, G., Morales, L., Jacobs, R. E., and Cross, J. T. (1994). Streptomycin and alternative agents for the treatment of tularaemia: review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 19, 42–47. doi: 10.1093/clinids/19.1.42
- Georgi, E., Schacht, E., Scholz, H. C., and Spettstoesser, W. D. (2012). Standardized broth microdilution antimicrobial susceptibility testing of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strains from Europe and rare *Francisella* species. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2429–2433. doi: 10.1093/jac/dks238
- Gestin, B., Valade, E., Thibault, F., Schneider, D., and Maurin, M. (2010). Phenotypic and genotypic characterization of macrolide resistance in *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* biovar I. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 2359–2367. doi: 10.1093/jac/dkq315
- Goldman, R. C., Fesik, S. W., and Doran, C. C. (1990). Role of protonated and neutral forms of macrolides in binding to ribosomes from gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 426–431. doi: 10.1128/AAC.34.3.426
- Grohs, P., Kitzis, M. D., and Gutmann, L. (2003). *In vitro* bactericidal activities of linezolid in combination with vancomycin, gentamicin, ciprofloxacin fusidic acid, and rifampicin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 418–420. doi: 10.1128/AAC.47.1.418-420.2003
- Hall, J. D., Craven, R. R., Fuller, J. R., Pickles, R. J., and Kawula, T. H. (2007). *Francisella tularensis* replicates within alveolar type II epithelial cells *in vitro* and *in vivo* following inhalation. *Infect. Immun.* 75, 1034–1039. doi: 10.1128/IAI.01254-06
- Hepburn, M. J., and Simon, A. J. (2008). Tularaemia: current diagnosis and treatment options. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 6, 231–240. doi: 10.1586/14787210.6.2.231
- Hof, H. (2003). Listeriosis: therapeutic options. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35, 203–205.
- Horzempa, J., O'Dee, D. M., Shanks, R. M. Q. and Nau, G. J. (2010). *Francisella tularensis* Δ pyrF mutants show that replication in non-macrophages is sufficient for pathogenesis *in vivo*. *Infect. Immun.* 78, 2607–2019. doi: 10.1128/IAI.00134-10
- Ives, T. J., Manzwitsch, P., Regnery, R. L., Butts, J. D., and Kebede, M. (1997). *In vitro* susceptibilities of *Bartonella henselae*, *B. quintana*, *B. elizabethae*, *Rickettsia rickettsii*, *R. conorii*, *R. akari*, and *R. prowazekii* to macrolide antibiotics as determined by immunofluorescent-antibody analysis of infected Vero cell monolayers. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 578–582.
- Johansson, A., Berglund, L., Sjöstedt, A., and Tärnvik, A. (2001). Ciprofloxacin for treatment of tularaemia. *Clin. Infect. Dis.* 33, 267–268. doi: 10.1086/321825

- Johansson, A., Berglund, L., Gothefer, L., Sjøstedt, A., and Tärnvik, A. (2000). Iprofloxacin for treatment of tularaemia in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19, 449–453. doi: 10.1097/00006454-200005000-00011
- Johansson, A., Urich, S. K., Chu, M. C., Sjøstedt, A., and Tärnvik, A. (2002). *In vitro* susceptibility to quinolones of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*. *Scand. J. Infect. Dis.* 34, 327–330. doi: 10.1080/00365540110080773
- Kaya, A., Deveci, K., Güven, A. S., Demir, M., Uysal, E. B., Gültekin, A., et al. (2012). Tularaemia in children: evaluation of clinical, laboratory and therapeutic features of 27 tularaemia cases. *Turk. J. Pediatr.* 54, 105–112.
- Keim, P., Johansson, A., and Wagner, D. M. (2007). Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1105, 30–66. doi: 10.1196/annals.1409.011
- Kreizinger, Z., Makrai, L., Helyes, G., Magyar, T., Erdélyi, K., and Gyurancz, M. (2012). Antimicrobial susceptibility of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strains from Hungary, Central Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 370–373. doi: 10.1093/jac/dks399
- La Scola, B., Elkarkouri, K., Li, W., Wahab, T., Fournous, G., Rolain, J. M., et al. (2008). Rapid comparative genomic analysis for clinical microbiology: the *Francisella tularensis* paradigm. *Genome Res.* 18, 742–750. doi: 10.1101/gr.071266.107
- Leclercq, R. (2010). "Oxazolidinones" in *Antibiogram*, ed P. Courvalin, R. Leclercq, and L. B. Rice (Portland, OR: ESKA publishing, ASM Press), 339–345.
- Lee, H. C., Horowitz, E., and Linder, W. (1991). Treatment of tularaemia with imipenem/cilastin sodium. *South. Med. J.* 84, 1277–1278. doi: 10.1097/00007611-199110000-00030
- Lemaire, S., Van Bambeke, F., Pierard, D., Applebaum, P. C., and Tulkens, P. M. (2011). Activity of fusidic acid against extracellular and intracellular *Staphylococcus aureus*: influence of pH and comparison with linezolid and clindamycin. *Clin. Infect. Dis.* 52, S493–S503. doi: 10.1093/cid/cir165
- Loveless, B. M., Yermakova, A., Christensen, D. R., Kondig, J. P., Heine, H. S. I. I., Wasieleski, L. P., et al. (2010). Identification of ciprofloxacin resistance by SimpleProbe™, high resolution melt and pyrosequencing™ nucleic acid analysis in biothreat agents: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* and *Francisella tularensis*. *Mol. Cell. Probes.* 24, 154–160. doi: 10.1016/j.mcp.2010.01.003
- Maurin, M., Mersali, N. F., and Raoult, D. (2000). Bactericidal activities of antibiotics against intracellular *Francisella tularensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 3428–3431. doi: 10.1128/AAC.44.12.3428-3431.2000
- Maurin, M., Pelloux, I., Brion, J. P., Del Bano, J. N., and Picard, A. (2011). Human tularaemia in France, 2006–2010. *Clin. Infect. Dis.* 53, E133–E141. doi: 10.1093/cid/cir612
- Maurin, M., and Raoult, D. (2001). Use of aminoglycosides in treatment of infections due to intracellular bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2977–2986. doi: 10.1128/AAC.45.11.2977-2986.2001
- Ohkuma S., and Poole, B. (1981). Cytoplasmic vacuolation of mouse peritoneal macrophages and the uptake into lysosomes of weakly basic substances. *J. Cell Biol.* 90, 656–664. doi: 10.1083/jcb.90.3.656
- Perez-Castrillon, J. L., Bachiller-Luque, P., Martin-Luquero, M., Mena-Martin, F. J., and Herreros, V. (2001). Tularaemia epidemic in northwestern Spain: clinical description and therapeutic response. *Clin. Infect. Dis.* 33, 573–576. doi: 10.1086/322601
- Rolain, J. M., Maurin, M., Vestris, G. and Raoult, D. (1998). *In vitro* susceptibilities of 27 *Rickettsiae* to 13 antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 1537–1541.
- Scheffel, J. M., Griffith, J. M., Leppke, B. A., Pantlin, G. C., Snippes, P. M., and Wunschmann, A. (2010). Tularaemia in Minnesota: case report and brief epidemiology. *Zoonoses Public Health* 57, E165–E169. doi: 10.1111/j.1863-2378.2009.01318.x
- Segreti, J., Meyer, P., and Kapell, K. (1996). *In vitro* activity of macrolides against intracellular *Legionella pneumophila*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 25, 123–126. doi: 10.1016/S0732-8893(96)00097-1
- Sutera, V., Levert, M., Burmeister, W. P., Schneider, D. and Maurin, M. (2014). Evolution toward high-level fluoroquinolone resistance in *Francisella* species. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 101–110. doi: 10.1093/jac/dkt321
- Tärnvik, A., and Chu, M. C. (2007). New approaches to diagnosis and therapy of tularaemia. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1105, 378–404. doi: 10.1196/annals.1409.017
- Tomaso, H., Al Dahouk, S., Hofer, E., Splettsdoesser, W. D., Treu, T. M., Dierich, M. P., et al. (2005). Antimicrobial susceptibilities of Austrian *Francisella tularensis* holarctica biovar II strains. *Int. J. Antimicrob. Agents* 26, 279–284. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2005.07.003
- Urich, S. K., and Petersen, J. M. (2008). *In vitro* susceptibility of isolates of *Francisella tularensis* types A and B from North America. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2276–2278. doi: 10.1128/AAC.01584-07
- Valade, E., Vaissaire, J., Mérens, A., Hernandez, E., Gros, C., Le Doujet, C., et al. (2008). Susceptibility of 71 French isolates of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* to eight antibiotics and accuracy of the Etest® method. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 208–210. doi: 10.1093/jac/dkn146
- Wright Valderas, M., and Barrow, W. W. (2008). Establishment of a method for evaluating intracellular antibiotic efficacy in *Brucella abortus*-infected Mono Mac 6 monocytes. *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 128–134. doi: 10.1093/jac/dkm433
- Yeşilyurt, M., Kılıç S., Çelebi, B., Çelik, M., Gül, S., Erdoğan, F., et al. (2011). Antimicrobial susceptibilities of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strains isolated from humans in Central Anatolia region of Turkey. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2588–2592. doi: 10.1093/jac/dkr338

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 16 December 2013; paper pending published: 16 January 2014; accepted: 24 February 2014; published online: 18 March 2014.

Citation: Sutera V, Caspar Y, Boisset S and Maurin M (2014) A new dye uptake assay to test the activity of antibiotics against intracellular *Francisella tularensis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 4:36. doi: 10.3389/fcimb.2014.00036

This article was submitted to the journal *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*.

Copyright © 2014 Sutera, Caspar, Boisset and Maurin. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1 Émergence de la résistance aux fluoroquinolones et modifications des topoïsomérasés de type II

Pour expliquer les nombreux échecs thérapeutiques et rechutes observés chez les patients atteints de tularémie^{58,60,113–116}, nous avons émis l'hypothèse de l'émergence de bactéries résistantes consécutivement à l'administration d'un traitement antibiotique. Nous nous sommes concentrés sur la famille des fluoroquinolones, antibiotique préconisé en première intention dans le traitement des tularémies de gravité moyenne à modérée, largement prédominantes⁴³. De plus, le mécanisme principal de résistance bactérienne à ces antibiotiques correspond à l'introduction de mutations dans les gènes codant pour les topoïsomérasés de type II, cible des fluoroquinolones⁷³, facilitant son étude.

La première partie de nos travaux était basée sur l'étude de lignées d'évolution en présence de concentrations croissantes de ciprofloxacine (fluoroquinolone de 2^{ème} génération). Des lignées indépendantes ont été propagées à partir de trois souches de *Francisella* de virulence diminuée pour l'homme : *F. tularensis* subsp. *holarctica* LVS, *F. novicida* CIP56.12 et *F. philomiragia* ATCC25015.

L'étude des dynamiques d'évolution des populations de mutants sélectionnés au cours du processus évolutif sur les plans phénotypiques et génétiques a montré une disparité inter-espèce. Si tous les mutants de haut niveau sélectionnés montrent une résistance croisée à l'ensemble des fluoroquinolones testées (entre 500 et 2000 fois la CMI de départ) associée à au moins une mutation du gène *gyrA*, les autres caractéristiques d'évolution sont relativement dissemblables. Ces différences inter-espèces portent notamment sur la présence de résistances croisées aux autres familles d'antibiotiques testées pour *F. novicida* et *F. philomiragia*, et sur la nature des mutations observées ; rendant impossible l'extrapolation de ces observations aux souches virulentes. L'ensemble des souches sélectionnées issues de ces deux espèces présente des mutations originales, principalement pour les gènes codant pour l'ADN gyrase.

L'étude des lignées issues de *F. tularensis* subsp. *holarctica* montre une place centrale des mutations du gène *gyrA* modifiant l'acide aminé en position 83. Cette mutation est d'apparition précoce (présente dans 1/3 des lignées d'évolution après

deux passages seulement) et associée à une forte augmentation du niveau de la résistance aux fluoroquinolones des souches et des populations (64 fois la CMI en moyenne). Les autres mutations identifiées sur les gènes codant pour l'ADN gyrase et la topoïsomérase IV ont un impact moindre (<8 fois la CMI). Si certaines peuvent être précoces, elles apparaissent plutôt en fin de processus, consolidant la résistance déjà cliniquement significative. Ces mutations, leur impact sur la résistance aux fluoroquinolones et le processus évolutif sont fréquemment rencontrés chez les bactéries Gram négatif comme *L. pneumophila*¹²⁰, *P. aeruginosa*^{81,124,125}, *E. coli* ou *S. enterica*⁸⁰

Notons que les mutations des gènes codant pour l'ADN gyrase n'impactent pas la capacité de multiplication intracellulaire de *F. tularensis* subsp. *holarctica*. Cette constatation est en opposition avec les observations réalisées sur la capacité d'infection d'*E. coli* au niveau urogénital. Une diminution de la capacité d'infection des cellules rénales et vésicales a été observée chez une souche présentant une mutation *gyrA*. Cette diminution est vraisemblablement liée à la diminution d'expression de facteurs de virulence induite par la modulation de l'activité de super-enroulement de l'ADN.¹²⁶ Cela interroge sur les systèmes de régulation de l'expression du génome de *F. tularensis*.

Seules les mutations induisant une modification du cadre de lecture résultant en l'introduction d'un codon stop proche de l'extrémité N-terminale de ParE entraînent un léger déficit de multiplication dans les macrophages murins. Le maintien de la capacité de réplication intracellulaire malgré l'inactivation de la topoïsomérase IV pourrait être expliqué par une compensation partielle par de l'activité de caténation/décaténation par l'ADN gyrase.¹²⁷ L'étude de cet aspect de l'évolution des clones résistants devrait être approfondie par l'étude de l'activité de décaténation de plasmides des différents mutants *parE*, et par le niveau d'expression des transcrits codant pour les sous unités de l'ADN gyrase.

Un nombre non négligeable de mutations inhabituelles de par la nature de la substitution induite (délétion dans et hors cadre de lecture, nature de l'acide aminé de substitution) ou par la position de la modification a été identifié sur les gènes codant pour les topoïsomérases de type II. Le positionnement de ces mutations sur le modèle tridimensionnel des enzymes laisse pressentir l'implication de certaines dans la résistance. Il sera cependant indispensable de reconstruire ces mutations

isolément dans la souche de départ pour pouvoir évaluer leur impact sur le niveau de résistance aux fluoroquinolones. Pour les mutations dont la présence ne résulterait pas en une augmentation de la résistance, une évaluation de l'activité enzymatique et du fitness dans le milieu de culture utilisé pour la sélection pourrait être envisagée. Celle-ci permettrait un apport d'informations non négligeable dans la compréhension de la fixation de ces mutations dans le modèle évolutif utilisé.

Enfin, peu de données existent concernant la conformation tridimensionnelle des topoïsomérasés de Type II de *Francisella*. L'élaboration d'une procédure d'étude cristallographique de ces enzymes permettrait d'augmenter les informations sur le fonctionnement de ces enzymes chez ce microorganisme. De plus, les lignées ayant produit une grande diversité de mutants pour ces protéines, les modèles ainsi générés pourraient apporter beaucoup à la compréhension des mécanismes de résistance aux fluoroquinolones par modification des cibles.

2 Émergence de la résistance aux fluoroquinolones, échecs thérapeutiques et rechutes.

Forts des résultats précédemment obtenus, nous avons étudié la corrélation entre l'apparition de mutations dans les QRDR des gènes codant pour les sous-unités de l'ADN gyrase (particulièrement *gyrA83* et *gyrA87*) et la survenue d'une rechute ou d'un échec thérapeutique.

Nous disposons pour cette étude de 42 souches et 82 prélèvements cliniques issus de 104 cas confirmés de tularémie, dont 32 ont présenté au cours de la maladie une rechute ou un échec thérapeutique après un traitement par les fluoroquinolones.

L'étude phénotypique et génétique de la résistance des souches de *F. tularensis* subsp. *holarctica* a été réalisée par détermination des CMI et séquençage des QRDR des gènes *gyrA* et *gyrB*, respectivement. Nous avons développé pour l'analyse des prélèvements patients un test de PCR en temps réel permettant la détection des mutations *gyrA83* et *gyrA87* et une méthode de séquençage des QRDR des gènes *gyrA* et *gyrB*.

La mise en œuvre de ces techniques sur notre population de patients atteints de tularémie n'a pas permis la mise en évidence de marqueurs phénotypiques ou génétiques de résistance aux fluoroquinolones. Leur absence, notamment dans les prélèvements obtenus après l'épisode de rechute ou d'échec thérapeutique pour les

patients traités avec les fluoroquinolones, nous amène à conclure que l'émergence de mutants résistants ne peut être le mécanisme principal à l'origine de ce phénomène. Il est cependant important de continuer à rechercher ces mutations dans les prélèvements cliniques futurs. En effet, même si la probabilité d'apparition de mutants résistants *in vivo* semble faible, les résultats obtenus *in vitro* laissent penser que cette éventualité reste plausible. L'utilisation de la PCR en temps réel permettrait alors un dépistage rapide de la résistance. Une autre approche, plus globale consisterait à réaliser le séquençage du génome complet des souches cliniques isolées. Nous pourrions ainsi étudier les liens entre les mutations ainsi découvertes et l'histoire clinique de l'infection. De plus, les outils d'études phénotypiques développés permettront d'approfondir la description de ces caractéristiques.

La problématique majeure de cette approche est l'obtention de souches à partir de prélèvements cliniques, spécialement chez les patients présentant une forme clinique ganglionnaire en échec thérapeutique. Une approche de mise en culture des prélèvements sur culture cellulaire s'est montrée efficace pour obtenir des souches cliniques de bactéries intracellulaires obligatoires ou facultatives à partir de prélèvements cliniques.⁶³

3 Émergence de la résistance aux fluoroquinolones et mutations hors topoïsomérases de Type II

Tirant parti des lignées d'évolution longue (14 étapes) précédemment propagées à partir de *F. tularensis* subsp. *holarctica*, nous avons identifié les mutations apparues au cours de l'évolution des différentes lignées en dehors des gènes codant pour les topoïsomérases de type II. Les gènes impactés par celles-ci peuvent être classés en trois catégories.

Premièrement, les gènes dont l'implication directe dans la résistance aux fluoroquinolones est très probable. Cette catégorie regroupe quatre gènes codant pour des protéines impliquées dans des systèmes de transport transmembranaire. Trois d'entre eux n'ont été identifiés qu'une fois dans l'ensemble des lignées : une protéine transmembranaire appartenant à un système d'efflux ABC exportateur (*FTL_0624*), une protéine d'accroche du substrat dans un système ABC importateur (*FTL_1936*)¹⁰⁴, est une sérine perméase (*FTL_0024*). Le dernier (*FTL_0439*), impliqué dans la captation du fer^{125,126} s'est révélé être une cible majeure. En effet, ce

locus est altéré chez 10 des 11 clones de haut niveau de résistance isolés, le classant juste derrière *gyrA* en termes de fréquence. La reconstruction par clonage de ces mutations dans la souche à l'origine des lignées permettrait d'étudier précisément leur impact sur le niveau de résistance aux fluoroquinolones. De plus, elle autoriserait par introduction dans une souche sensible (*F. tularensis* subsp. *holarctica* biovar I) d'apprécier l'étendue du spectre de la résistance, en le confrontant à d'autres classes d'antibiotiques et notamment aux macrolides.

Lors de cette étude, nous avons pu établir la corrélation entre la mutation du locus *FTL_0439* et la diminution de la capacité de multiplication dans les macrophages. Ce phénomène a déjà été décrit¹²⁶, cependant l'apparition spontanée de mutations dans ce locus dans des conditions de pression antibiotique est nouvelle. Nous avons pu observer une réversion spontanée du phénotype de résistance associée à la survenue d'une mutation compensatrice sur ce locus, probablement à la faveur d'une diminution de la concentration en antibiotiques. Ce phénomène doit être étudié plus avant sur les clones sélectionnés *in vitro* et sur les souches cliniques, celui-ci pouvant potentiellement expliquer le regain de virulence après arrêt du traitement antibiotique.

Le second groupe comprend les gènes dont l'implication indirecte dans la résistance aux fluoroquinolones est probable. Il comprend les loci *FTL_0917* et *FTL_0594*. Le premier est associé dans les lignées à une descendance pléthorique en comparaison des autres clones équivalents (5/1). Ce phénomène laisse supposer un profil hyper-mutateur de cette souche bien corrélé à la fonction de réparation de l'ADN de la protéine codée par ce locus. Des essais de mesure de la capacité de mutagenèse seraient nécessaires pour confirmer ce profil.

Le deuxième code pour une UDP-glucose-4-épimérase impliquée notamment dans la glycosylation de DsbA, indispensable dans l'établissement de la structure secondaire des protéines au niveau du périplasme¹²⁹. L'étude des modifications induite par cette mutation au niveau de l'expression des complexes protéiques membranaires permettrait d'apporter un éclairage sur la portée d'une telle modification dans l'expression notamment des systèmes de transport.

La troisième catégorie comprend 2 loci dont les mutations n'ont probablement pas d'effet sur la résistance.

Les résultats du séquençage des génomes complets des mutants terminaux

isolés des lignées issues de *F. novicida* et *F. philomiragia* constituent également un axe de développement de cette étude. Les mutants de *F. novicida* montrent un nombre de mutations d'intérêt proche de *F. tularensis* subsp. *holarctica* (7/6). Les mutations *gyrA* sont également présentes sur l'ensemble des clones, mêmes si certaines sont positionnées de manière atypique. Très peu de mutations ont été identifiées sur les autres gènes codant des topoïsomérasés de type II. Une autre mutation originale a été ciblée sur les 4 mutants. Celle-ci est située dans le promoteur d'une protéine hypothétique présentant un motif hélice-tour-hélice (HTH), typique des régulateurs de la transcription de la superfamille MerR, notamment impliquée dans la régulation de la transcription des gènes codant pour les systèmes d'efflux MDR. Des mutations sur des gènes codant pour un système d'efflux RND ont également été identifiées sur deux clones (Fno2P14 et Fno4P14). Le fait que ceux-ci présentent un très haut niveau de résistance aux macrolides (CMI de l'érythromycine $\geq 256\text{mg/L}$) laisse supposer un mécanisme aboutissant à un profil de résistance transversale. Il est également intéressant de noter que les mutations du gène *fupA* sont également identifiées pour un clone de *F. novicida* et deux de *F. philomiragia*.

4 Evaluation de l'activité des antibiotiques contre *F. tularensis* intracellulaire

Pour finir, nous avons développé un outil permettant l'évaluation de l'activité des antibiotiques contre les *F. tularensis* intracellulaire. Cette étude a permis, après validation de la technique, la confirmation de l'activité des fluoroquinolones et de la doxycycline dans ce compartiment. Nous avons également pu observer une activité partielle dans les cellules de la gentamicine, probablement liée au délai d'internalisation de la molécule. Nous avons détecté une intéressante diminution de la CEMI par rapport à la CMI pour le linézolide. Un profil de CMI similaire a déjà été décrit pour certaines bactéries à Gram négatif comme *Moraxella*¹³⁰. Cette option thérapeutique devrait être étudiée plus avant sur un modèle animal.

Enfin, le DUA développé pourra être utile pour déterminer l'impact intracellulaire des nouveaux traitements actifs sur *F. tularensis* comme les composés Bis-indoliques¹³¹.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. William, B. & Wherry, M. D. Weekly Reports for December 18, 1914. *Public Health Rep.* **29**, 3375–3455 (1914).
2. Gürcan, Ş. Epidemiology of Tularemia. *Balk. Med. J.* **31**, 3–10 (2014).
3. Euzéby, J. P. List of prokaryotic names with standing in nomenclature.
4. Keim, P., Johansson, A. & Wagner, D. M. Molecular epidemiology, evolution, and ecology of *Francisella*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1105**, 30–66 (2007).
5. Forsman, M., Sandström, G. & Sjöstedt, A. Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 38–46 (1994).
6. Noda, H., Munderloh, U. G. & Kurtti, T. J. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3926–3932 (1997).
7. Scoles, G. A. Phylogenetic Analysis of the *Francisella*-like Endosymbionts of Dermacentor Ticks. *J. Med. Entomol.* **41**, 277–286 (2004).
8. Downs, C. M. & Bond, G. C. Studies on the Cultural Characteristics of *Pasteurella tularensis*. *J. Bacteriol.* **30**, 485–490 (1935).
9. Chong, A. & Celli, J. The *Francisella* intracellular life cycle: toward molecular mechanisms of intracellular survival and proliferation. *Front. Microbiol.* **1**, 138 (2010).
10. Qu, P.-H. *et al.* *Francisella guangzhouensis* sp. nov., isolated from air-conditioning systems. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **63**, 3628–3635 (2013).
11. Gu, Q. *et al.* Characterization of *Francisella* species isolated from the cooling water of an air conditioning system. *Braz. J. Microbiol.* **46**, 921–927 (2015).
12. Rydzewski, K. *et al.* Genome sequence and phenotypic analysis of a first German *Francisella* sp. isolate (W12-1067) not belonging to the species *Francisella tularensis*.

- BMC Microbiol.* **14**, 169 (2014).
13. Brevik, Ø. j., Ottem, K. f., Kamaishi, T., Watanabe, K. & Nylund, A. *Francisella halioticida* sp. nov., a pathogen of farmed giant abalone (*Haliotis gigantea*) in Japan. *J. Appl. Microbiol.* **111**, 1044–1056 (2011).
 14. Sjödin, A. *et al.* Genome characterisation of the genus *Francisella* reveals insight into similar evolutionary paths in pathogens of mammals and fish. *BMC Genomics* **13**, 268 (2012).
 15. Friis-Møller, A., Lemming, L. E., Valerius, N. H. & Bruun, B. Problems in Identification of *Francisella philomiragia* Associated with Fatal Bacteremia in a Patient with Chronic Granulomatous Disease. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 1840–1842 (2004).
 16. Kreitmann, L. *et al.* Disseminated Infection Caused by *Francisella philomiragia*, France, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 2260–2261 (2015).
 17. Larson, C. L., Wicht, W. & Jellison, W. L. A new organism resembling *P. tularensis* isolated from water. *Public Health Rep.* **70**, 253–258 (1955).
 18. Kingry, L. C. & Petersen, J. M. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, (2014).
 19. Hollis, D. G. *et al.* *Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup *novicida* (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 1601–1608 (1989).
 20. Brett, M. *et al.* *Francisella novicida* Bacteremia after a Near-Drowning Accident. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 2826–2829 (2012).
 21. Brett, M. E. *et al.* Outbreak of *Francisella novicida* Bacteremia Among Inmates at a Louisiana Correctional Facility. *Clin. Infect. Dis.* **59**, 826–833 (2014).
 22. Birdsell, D. N. *et al.* *Francisella tularensis* subsp. *novicida* isolated from a human in Arizona. *BMC Res. Notes* **2**, 223 (2009).
 23. Leelaporn, A., Yongyod, S., Limsrivanichakorn, S., Yungyuen, T. & Kiratisin, P.

- Emergence of *Francisella novicida* Bacteremia, Thailand. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1935–1937 (2008).
24. Huber, B. *et al.* Description of *Francisella hispaniensis* sp. nov., isolated from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson *et al.* 1955) Olsufiev *et al.* 1959 as *Francisella tularensis* subsp. *novicida* comb. nov. and emended description of the genus *Francisella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 1887–1896 (2010).
 25. Busse, H.-J. *et al.* Objections to the transfer of *Francisella novicida* to the subspecies rank of *Francisella tularensis* - response to Johansson *et al.* *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 1718–1720 (2010).
 26. Johansson, A. *et al.* Objections to the transfer of *Francisella novicida* to the subspecies rank of *Francisella tularensis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**, 1717-1718-1720 (2010).
 27. Whipp, M. J. Characterization of a *novicida*-like subspecies of *Francisella tularensis* isolated in Australia. *J. Med. Microbiol.* **52**, 839–842 (2003).
 28. Olsufjev, N. G. & Meshcheryakova, I. S. Intraspecific taxonomy of tularemia agent *Francisella tularensis* McCoy *et al.* Chapin. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **26**, 291–299 (1982).
 29. Ellis, J., Oyston, P. C. F., Green, M. & Titball, R. W. Tularemia. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**, 631–646 (2002).
 30. Mohamed, S. E. R., Mubarak, A. I. & Alfarooq, L. O. *Francisella tularensis* Bacteremia: A Case Report from Sudan. *Case Rep. Infect. Dis.* **2012**, (2012).
 31. Champion, M. D. *et al.* Comparative genomic characterization of *Francisella tularensis* strains belonging to low and high virulence subspecies. *PLoS Pathog.* **5**, e1000459 (2009).
 32. Gurycová, D. First isolation of *Francisella tularensis* subsp. *tularensis* in Europe. *Eur. J. Epidemiol.* **14**, 797–802 (1998).
 33. Johansson, A. *et al.* Worldwide genetic relationships among *Francisella tularensis* isolates

- determined by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis. *J. Bacteriol.* **186**, 5808–5818 (2004).
34. Broekhuijsen, M. *et al.* Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 2924–2931 (2003).
35. Staples, J. E., Kubota, K. A., Chalcraft, L. G., Mead, P. S. & Petersen, J. M. Epidemiologic and Molecular Analysis of Human Tularemia, United States, 1964–2004. *Emerg. Infect. Dis.* **12**, 1113–1121 (2006).
36. Vogler, A. J. *et al.* Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J. Bacteriol.* **191**, 2474–2484 (2009).
37. Kugeler, K. J. *et al.* Molecular Epidemiology of *Francisella tularensis* in the United States. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **48**, 863–870 (2009).
38. Origgi, F. C., Frey, J. & Pilo, P. Characterisation of a new group of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in Switzerland with altered antimicrobial susceptibilities, 1996 to 2013. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* **19**, (2014).
39. Dempsey, M. P. *et al.* Genomic deletion marking an emerging subclone of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* in France and the Iberian Peninsula. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7465–7470 (2007).
40. Vogler, A. J. *et al.* Phylogeography of *Francisella tularensis* ssp. *holarctica* in France. *Lett. Appl. Microbiol.* **52**, 177–180 (2011).
41. Foley, J. E. & Nieto, N. C. Tularemia. *Vet. Microbiol.* **140**, 332–338 (2010).
42. Petersen, J. M., Mead, P. S. & Schriefer, M. E. *Francisella tularensis*: an arthropod-borne pathogen. *Vet. Res.* **40**, (2009).
43. Organization, W. H. WHO Guidelines on tularaemia. (2007). Available at: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/43793?locale=fr>. (Accessed: 27th February 2014)

44. Bäckman, S., Näslund, J., Forsman, M. & Thelaus, J. Transmission of tularemia from a water source by transstadial maintenance in a mosquito vector. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
45. Dennis, D. T. *et al.* Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **285**, 2763–2773 (2001).
46. Christopher, G. W., Cieslak, T. J., Pavlin, J. A. & Eitzen, E. M., Jr. Biological warfare. A historical perspective. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **278**, 412–417 (1997).
47. Steiner, D. J., Furuya, Y. & Metzger, D. W. Host–pathogen interactions and immune evasion strategies in *Francisella tularensis* pathogenicity. *Infect. Drug Resist.* **7**, 239–251 (2014).
48. Jones, B. D., Faron, M., Rasmussen, J. A. & Fletcher, J. R. Uncovering the components of the *Francisella tularensis* virulence stealth strategy. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, (2014).
49. Horzempa, J., O’Dee, D. M., Shanks, R. M. Q. & Nau, G. J. *Francisella tularensis* DeltapyrF mutants show that replication in nonmacrophages is sufficient for pathogenesis in vivo. *Infect. Immun.* **78**, 2607–2619 (2010).
50. Clemens, D. L. & Horwitz, M. A. Uptake and intracellular fate of *Francisella tularensis* in human macrophages. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1105**, 160–186 (2007).
51. Checroun, C., Wehrly, T. D., Fischer, E. R., Hayes, S. F. & Celli, J. Autophagy-mediated reentry of *Francisella tularensis* into the endocytic compartment after cytoplasmic replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 14578–14583 (2006).
52. Steele, S. *et al.* *Francisella tularensis* Harvests Nutrients Derived via ATG5-Independent Autophagy to Support Intracellular Growth. *PLoS Pathog.* **9**, (2013).
53. Barel, M., Ramond, E., Gesbert, G. & Charbit, A. The complex amino acid diet of *Francisella* in infected macrophages. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **5**, 9 (2015).
54. Lindgren, H. *et al.* Iron Content Differs between *Francisella tularensis* Subspecies *tularensis* and Subspecies *holarctica* Strains and Correlates to Their Susceptibility to

- H2O2-Induced Killing. *Infect. Immun.* **79**, 1218–1224 (2011).
55. Postic, G. *et al.* Identification of a novel small RNA modulating *Francisella tularensis* pathogenicity. *PLoS One* **7**, e41999 (2012).
56. Rowe, H. M. & Huntley, J. F. From the Outside-In: The *Francisella tularensis* Envelope and Virulence. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **5**, (2015).
57. Bossi, P. *et al.* Bichat guidelines for the clinical management of tularaemia and bioterrorism-related tularaemia. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* **9**, E9-10 (2004).
58. Maurin, M., Pelloux, I., Brion, J. P., Del Banõ, J.-N. & Picard, A. Human tularemia in France, 2006-2010. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **53**, e133-141 (2011).
59. Desvars, A. *et al.* Epidemiology and Ecology of Tularemia in Sweden, 1984–2012. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 32–39 (2015).
60. Ulu-Kilic, A., Gulen, G., Sezen, F., Kilic, S. & Sencan, I. Tularemia in central Anatolia. *Infection* **41**, 391–399 (2013).
61. Mailles, A. & Vaillant, V. 10 years of surveillance of human tularaemia in France. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* **19**, 20956 (2014).
62. Tärnvik, A. & Chu, M. C. New approaches to diagnosis and therapy of tularemia. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1105**, 378–404 (2007).
63. Gouriet, F., Fenollar, F., Patrice, J.-Y., Drancourt, M. & Raoult, D. Use of Shell-Vial Cell Culture Assay for Isolation of Bacteria from Clinical Specimens: 13 Years of Experience. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4993–5002 (2005).
64. Seibold, E., Maier, T., Kostrzewa, M., Zeman, E. & Splettstoesser, W. Identification of *Francisella tularensis* by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Fast, Reliable, Robust, and Cost-Effective Differentiation on Species and Subspecies Levels. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1061–1069 (2010).
65. Maurin, M. *et al.* Real-Time PCR for Diagnosis of Oculoglandular Tularemia. *Emerg.*

- Infect. Dis.* **16**, 152–153 (2010).
66. Hua, F. *et al.* Development and evaluation of an up-converting phosphor technology-based lateral flow assay for rapid detection of *Francisella tularensis*. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
67. Chaignat, V. *et al.* Performance of seven serological assays for diagnosing tularemia. *BMC Infect. Dis.* **14**, 234 (2014).
68. Tigertt, W. D. Soviet viable *Pasteurella tularensis* vaccines a review of selected articles. *Bacteriol. Rev.* **26**, 354–373 (1962).
69. Salomonsson, E. *et al.* Reintroduction of Two Deleted Virulence Loci Restores Full Virulence to the Live Vaccine Strain of *Francisella tularensis*. *Infect. Immun.* **77**, 3424–3431 (2009).
70. Boisset, S., Caspar, Y., Sutura, V. & Maurin, M. New therapeutic approaches for treatment of tularaemia: a review. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, 40 (2014).
71. Johansson, A., Urich, S. K., Chu, M. C., Sjöstedt, A. & Tärnvik, A. In vitro susceptibility to quinolones of *Francisella tularensis* subspecies *tularensis*. *Scand. J. Infect. Dis.* **34**, 327–330 (2002).
72. Maurin, M., Mersali, N. F. & Raoult, D. Bactericidal activities of antibiotics against intracellular *Francisella tularensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 3428–3431 (2000).
73. Andriole, V. T. The quinolones: past, present, and future. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **41 Suppl 2**, S113–119 (2005).
74. Wolfson, J. S. & Hooper, D. C. The fluoroquinolones: structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **28**, 581–586 (1985).
75. Ruiz, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 1109–1117 (2003).
76. Jacoby, G. A. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect.*

- Dis. Soc. Am.* **41 Suppl 2**, S120-126 (2005).
77. Drlica, K. & Zhao, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **61**, 377–392 (1997).
78. Reece, R. J. & Maxwell, A. The C-terminal domain of the Escherichia coli DNA gyrase A subunit is a DNA-binding protein. *Nucleic Acids Res.* **19**, 1399–1405 (1991).
79. Soussy C.J. in *Courvalin P. and Leclercq R. AntibioGramme* 264–277 (2006).
80. Hopkins, K. L., Davies, R. H. & Threlfall, E. J. Mechanisms of quinolone resistance in Escherichia coli and Salmonella: recent developments. *Int. J. Antimicrob. Agents* **25**, 358–373 (2005).
81. Lee, J. K., Lee, Y. S., Park, Y. K. & Kim, B. S. Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. *Int. J. Antimicrob. Agents* **25**, 290–295 (2005).
82. Mahamoud, A., Chevalier, J., Alibert-Franco, S., Kern, W. V. & Pagès, J.-M. Antibiotic efflux pumps in Gram-negative bacteria: the inhibitor response strategy. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**, 1223–1229 (2007).
83. Zechini, B. & Versace, I. Inhibitors of multidrug resistant efflux systems in bacteria. *Recent Patents Anti-Infect. Drug Disc.* **4**, 37–50 (2009).
84. Cattoir, V. [Efflux-mediated antibiotics resistance in bacteria]. *Pathol. Biol. (Paris)* **52**, 607–616 (2004).
85. Guan, X. *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance – current knowledge and future perspectives. *J. Int. Med. Res.* **41**, 20–30 (2013).
86. Robicsek, A., Jacoby, G. A. & Hooper, D. C. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect. Dis.* **6**, 629–640 (2006).
87. García del Blanco, N., Gutiérrez Martín, C. B., de la Puente Redondo, V. A. & Rodríguez Ferri, E. F. In vitro susceptibility of field isolates of Francisella tularensis subsp.

- holarctica recovered in Spain to several antimicrobial agents. *Res. Vet. Sci.* **76**, 195–198 (2004).
88. Georgi, E., Schacht, E., Scholz, H. C. & Splettstoesser, W. D. Standardized broth microdilution antimicrobial susceptibility testing of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strains from Europe and rare *Francisella* species. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 2429–2433 (2012).
89. Gestin, B., Valade, E., Thibault, F., Schneider, D. & Maurin, M. Phenotypic and genetic characterization of macrolide resistance in *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* biovar I. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 2359–2367 (2010).
90. Hotta, A. *et al.* In vitro antibiotic susceptibility of *Francisella tularensis* isolates from Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **66**, 534–536 (2013).
91. Ikäheimo, I., Syrjälä, H., Karhukorpi, J., Schildt, R. & Koskela, M. In vitro antibiotic susceptibility of *Francisella tularensis* isolated from humans and animals. *J. Antimicrob. Chemother.* **46**, 287–290 (2000).
92. Kiliç, S., Celebi, B., Acar, B. & Ataş, M. In vitro susceptibility of isolates of *Francisella tularensis* from Turkey. *Scand. J. Infect. Dis.* **45**, 337–341 (2013).
93. Kreizinger, Z. *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strains from Hungary, Central Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 370–373 (2013).
94. Marinov, K. T., Georgieva, E. D., Ivanov, I. N. & Kantardjiev, T. V. Characterization and genotyping of strains of *Francisella tularensis* isolated in Bulgaria. *J. Med. Microbiol.* **58**, 82–85 (2009).
95. Tomaso, H. *et al.* Antimicrobial susceptibilities of Austrian *Francisella tularensis* *holarctica* biovar II strains. *Int. J. Antimicrob. Agents* **26**, 279–284 (2005).
96. Urich, S. K. & Petersen, J. M. In vitro susceptibility of isolates of *Francisella tularensis* types A and B from North America. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2276–2278 (2008).

97. Valade, E. *et al.* Susceptibility of 71 French isolates of *Francisella tularensis* subsp. holarctica to eight antibiotics and accuracy of the Etest method. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**, 208–210 (2008).
98. Yesilyurt, M. *et al.* Antimicrobial susceptibilities of *Francisella tularensis* subsp. holarctica strains isolated from humans in the Central Anatolia region of Turkey. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**, 2588–2592 (2011).
99. Jehl, F. Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie. (2016).
100. Hotta, A. *et al.* In vitro antibiotic susceptibility of *Francisella tularensis* isolates from Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **66**, 534–536 (2013).
101. Antunes, N. T., Frase, H., Toth, M. & Vakulenko, S. B. The class A β -lactamase FTU-1 is native to *Francisella tularensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 666–671 (2012).
102. Bina, X. R., Lavine, C. L., Miller, M. A. & Bina, J. E. The AcrAB RND efflux system from the live vaccine strain of *Francisella tularensis* is a multiple drug efflux system that is required for virulence in mice. *FEMS Microbiol. Lett.* **279**, 226–233 (2008).
103. Biswas, S., Raoult, D. & Rolain, J.-M. A bioinformatic approach to understanding antibiotic resistance in intracellular bacteria through whole genome analysis. *Int. J. Antimicrob. Agents* **32**, 207–220 (2008).
104. Atkins, H. S. *et al.* The identification and evaluation of ATP binding cassette systems in the intracellular bacterium *Francisella tularensis*. *Res. Microbiol.* **157**, 593–604 (2006).
105. Sawyer, W. D., Dangerfield, H. G., Hogge, A. L. & Crozier, D. Antibiotic prophylaxis and therapy of airborne tularemia. *Bacteriol. Rev.* **30**, 542–550 (1966).
106. Parker R.T., Lister L.M., Bauer R.E., Hall H.E. & Woodward T.E. Use of chloramphenicol (chloromycetin®) in experimental and human tularemia. *J. Am. Med. Assoc.* **143**, 7–11 (1950).
107. Russell, P., Eley, S. M., Fulop, M. J., Bell, D. L. & Titball, R. W. The efficacy of ciprofloxacin and doxycycline against experimental tularaemia. *J. Antimicrob. Chemother.*

- 41**, 461–465 (1998).
108. Peterson, J. W. *et al.* Protection Afforded by Fluoroquinolones in Animal Models of Respiratory Infections with *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis*, and *Francisella tularensis*. *Open Microbiol. J.* **4**, 34–46 (2010).
109. Piercy, T., Steward, J., Lever, M. S. & Brooks, T. J. G. In vivo efficacy of fluoroquinolones against systemic tularemia infection in mice. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 1069–1073 (2005).
110. Steward, J., Piercy, T., Lever, M. S., Simpson, A. J. H. & Brooks, T. J. G. Treatment of murine pneumonic *Francisella tularensis* infection with gatifloxacin, moxifloxacin or ciprofloxacin. *Int. J. Antimicrob. Agents* **27**, 439–443 (2006).
111. Nelson, M. *et al.* Bioavailability and efficacy of levofloxacin against *Francisella tularensis* in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3922–3926 (2010).
112. Rotem, S. *et al.* Consequences of Delayed Ciprofloxacin and Doxycycline Treatment Regimens against *Francisella tularensis* Airway Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 5406–5408 (2012).
113. Pérez-Castrillón, J. L., Bachiller-Luque, P., Martín-Luquero, M., Mena-Martín, F. J. & Herreros, V. Tularemia epidemic in northwestern Spain: clinical description and therapeutic response. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **33**, 573–576 (2001).
114. Komitova, R. *et al.* Tularemia in Bulgaria 2003-2004. *J. Infect. Dev. Ctries.* **4**, 689–694 (2010).
115. Tezer, H. *et al.* Tularemia in Children, Turkey, September 2009–November 2012. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 1–7 (2015).
116. Meric, M. *et al.* Evaluation of clinical, laboratory, and therapeutic features of 145 tularemia cases: the role of quinolones in oropharyngeal tularemia. *APMIS Acta Pathol.*

- Microbiol. Immunol. Scand.* **116**, 66–73 (2008).
117. Chopra, I. & Roberts, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 232–260 (2001).
118. Shadoud, L. *et al.* Hidden Selection of Bacterial Resistance to Fluoroquinolones In Vivo: The Case of *Legionella pneumophila* and Humans. *EBioMedicine* **2**, 1179–1185 (2015).
119. Cheng, A. F. B. *et al.* Multiplex PCR Amplimer Conformation Analysis for Rapid Detection of *gyrA* Mutations in Fluoroquinolone-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 596–601 (2004).
120. Almahmoud, I., Kay, E., Schneider, D. & Maurin, M. Mutational paths towards increased fluoroquinolone resistance in *Legionella pneumophila*. *J. Antimicrob. Chemother.* **64**, 284–293 (2009).
121. La Scola, B. *et al.* Rapid comparative genomic analysis for clinical microbiology: the *Francisella tularensis* paradigm. *Genome Res.* **18**, 742–750 (2008).
122. Loveless, B. M. *et al.* Identification of ciprofloxacin resistance by SimpleProbe, High Resolution Melt and Pyrosequencing nucleic acid analysis in biothreat agents: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* and *Francisella tularensis*. *Mol. Cell. Probes* **24**, 154–160 (2010).
123. Mates, S. M., Patel, L., Kaback, H. R. & Miller, M. H. Membrane potential in anaerobically growing *Staphylococcus aureus* and its relationship to gentamicin uptake. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23**, 526–530 (1983).
124. Gorgani, N., Ahlbrand, S., Patterson, A. & Pourmand, N. Detection of point mutations associated with antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **34**, 414–418 (2009).
125. Henrichfreise, B., Wiegand, I., Pfister, W. & Wiedemann, B. Resistance mechanisms

- of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 4062–4070 (2007).
126. Sánchez-Céspedes, J., Sáez-López, E., Frimodt-Møller, N., Vila, J. & Soto, S. M. Effects of a Mutation in the *gyrA* Gene on the Virulence of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**, 4662–4668 (2015).
127. Zechiedrich, E. L. & Cozzarelli, N. R. Roles of topoisomerase IV and DNA gyrase in DNA unlinking during replication in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* **9**, 2859–2869 (1995).
128. Sen, B., Meeker, A. & Ramakrishnan, G. The *fslE* homolog, FTL_0439 (*fupA/B*), mediates siderophore-dependent iron uptake in *Francisella tularensis* LVS. *Infect. Immun.* **78**, 4276–4285 (2010).
129. Ramakrishnan, G. & Sen, B. The *FupA/B* protein uniquely facilitates transport of ferrous iron and siderophore-associated ferric iron across the outer membrane of *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbiol. Read. Engl.* **160**, 446–457 (2014).
130. Miki, T., Okada, N. & Danbara, H. Two Periplasmic Disulfide Oxidoreductases, *DsbA* and *SrgA*, Target Outer Membrane Protein *SpiA*, a Component of the *Salmonella* Pathogenicity Island 2 Type III Secretion System. *J. Biol. Chem.* **279**, 34631–34642 (2004).
131. Livermore, D. M. Linezolid in vitro: mechanism and antibacterial spectrum. *J. Antimicrob. Chemother.* **51 Suppl 2**, ii9-16 (2003).
132. Caspar, Y., Sutera, V., Boisset, S., Denis, J.-N. & Maurin, M. Bis-indolic compounds as potential new therapeutic alternatives for tularaemia. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, (2014).