



HAL
open science

Stress endogènes et acquisition de résistance aux antibiotiques par les intégrons en biofilm

Linda Tlili

► **To cite this version:**

Linda Tlili. Stress endogènes et acquisition de résistance aux antibiotiques par les intégrons en biofilm. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2021. Français. NNT : 2021LIMO0067 . tel-03738134

HAL Id: tel-03738134

<https://theses.hal.science/tel-03738134v1>

Submitted on 25 Jul 2022

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.

Université de Limoges
ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)
RESINFIT, UMR Inserm 1092

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges
Immunologie, oncologie, inflammation et infectiologie

Présentée et soutenue par
Linda Tlili

Le 26 novembre 2021

**Stress endogènes et acquisition de résistance aux antibiotiques par
les intégrons en biofilm**

Thèse dirigée par la Dr Sandra DA RE

JURY :

Président du jury

Mme la Pr Marie-Cécile PLOY, UMR INSERM 1092, Université de Limoges

Rapporteurs

Mr le Pr Jean Marc GHIGO, Unité de Génétique des Biofilms, Institut Pasteur, Paris

Mme la Dr Zeynep BAHAROGLU, Unité Plasticité du Génome Bactérien, Institut Pasteur, Paris

Examineurs

Mr le Pr Didier HOCQUET, UMR CNRS 6249, Université Franche-Comté

Mr le Dr Rémy BONNIN, UMR INSERM 1184, Université Paris Sud

Mme la Dr Sandra DA RE, directrice de thèse, UMR INSERM 1092, Université de Limoges



*A mon papa, parti trop tôt
A maman et ma grand-mère
A Mohamed*

Remerciements

Tout d'abord je souhaiterais remercier les membres du Jury qui m'ont honoré de leur présence le jour de la soutenance. Je remercie le Professeur Marie-Cécile Ploy pour avoir accepté de présider ce jury, le Professeur Jean Marc Ghigo et la Docteure Zeynep Baharoglu d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Je remercie aussi le Professeur Didier Hocquet et le Docteur Rémy Bonnin d'avoir accepté de juger mon travail de thèse en tant qu'examineurs. Merci à tous les membres du jury, pour le temps que vous avez consacré à ce travail de thèse.

Je souhaiterais aussi remercier Sandra pour avoir accepté ma candidature il y a 4 ans et m'avoir donné l'opportunité de faire de mon rêve une réalité. Sandra, je te suis très reconnaissante pour ta présence et ton soutien tant sur le plan professionnel que sur le plan personnel. Merci pour ton encadrement et pour tes encouragements qui m'ont permis de tenir bon jusqu'au bout et vraiment j'en sors grandie.

J'aimerais aussi remercier tous les membres de l'UMR 1092, j'ai passé 4 merveilleuses années de thèse, merci à tous d'avoir répondu présent dans les bons moments comme dans les mauvais, une grande famille au vrai sens du terme. Je souhaite remercier tous ceux qui ont participé à la vidéo de thèse, c'était vraiment sympa je pars avec des souvenirs plein la tête.

J'aimerais ensuite remercier Marie-Cécile pour son accueil, sa bienveillance et son accompagnement, merci pour vos conseils qui m'ont permis d'évoluer. Je voudrais aussi remercier Cécile pour ses précieux conseils et sa grande générosité. J'ai vraiment adoré faire de l'enseignement avec toi, merci de m'avoir appris à être pédagogue et à me mettre à la place des étudiants (c'est vrai car j'avais tendance à être un peu trop exigeante). J'ai vraiment passé d'agréable moment en ta compagnie même si la dernière année a été compliquée. Je te souhaite beaucoup de bonheur et de santé dans ta vie.

Je souhaite aussi remercier deux personnes sans lesquelles ce travail n'aurait pas pu voir le jour, Claire Carrion et Cathy Ouk, merci pour votre disponibilité, bienveillance et vos conseils, j'ai tellement appris à vos côtés. Je voudrais ensuite remercier Sophie R, Olivier et Thomas pour leurs conseils et les nombreuses discussions scientifiques très enrichissantes. Je remercie aussi Fabien, Sophie A, Sébastien Hantz pour leur bienveillance.

Je voudrais ensuite remercier la première personne qui m'a accueillie dans le labo et qui a tout fait pour que je me sente bien, Claire, ma co-bureau d'amour, on n'a eu qu'un an ensemble mais j'ai découvert en toi une personne fabuleuse, merci de m'avoir appris tout ce que tu m'as appris quand je suis arrivée au labo (on reconnaît bien l'enseignante qui est en toi), merci pour nos discussions interminables sur des sujets divers : religions, politique, la société... c'était tellement enrichissant pour moi. Ton départ était trop dur pour moi, tu as laissé un grand vide 😞 mais tu n'as jamais été loin, toujours là à m'encourager et à avoir les mots pour que j'avance malgré les difficultés et jusqu'au jour de ma thèse tu étais présente en direct du Danemark. Merci sœurte 😊. Chloé, si je devais t'associer à un mot ça serait forcément bonne humeur, c'est tellement toi rendre n'importe quelle situation énervante ou stressante en un moment drôle =). Merci beaucoup pour tous les bons moments passés ensemble et surtout d'avoir fait le déplacement depuis la suède pour assister à la thèse ça m'a fait tellement plaisir. Déborah merci pour ta douceur, générosité et tes conseils (surtout en qPCR 😊 je t'ai bien embêtée » je te souhaite une belle carrière professionnelle et une vie personnelle épanouie. Un grand merci à **Dr** Yohann, ta présence et ton soutien tout au long de ma thèse et surtout à la fin étaient inestimables ça m'a donné de la force pour continuer mon chemin jusqu'au bout, merci d'avoir toujours cru en moi, merci pour tes lectures et relectures de la ma thèse et du temps que tu y as consacré. Nos discussions sur l'avenir des chercheurs en France et sur les énormes sacrifices que ce métier demande, nos soirées, ta bienveillance et ta bonne humeur à toute épreuve me manqueront mais ce n'est qu'un au revoir 😊 je te souhaite une très belle continuation dans ta carrière, tu le mérites amplement.

Ma petite Lucie, ma co-bureau on a tellement partagé de choses ensemble : soirée top chef, pékin express, soirée bouffe, MT180s, organisation nuit européenne des chercheurs ou encore fête de la science. Merci pour ta joie et ta bonne humeur sans égale, la preuve dès que tu n'es pas bien ça se ressent tout de suite et l'ambiance dans le bureau n'est plus la même, merci aussi pour tes encouragements à chaque épreuve tu as toujours su trouver les mots. Je suis très heureuse de te compter dans ma vie, je te souhaite beaucoup de courage pour la fin de la thèse mais je crois fort en toi et je sais que tu vas tout déchirer.

Je voudrais aussi remercier une personne qui m'a beaucoup soutenue durant ma thèse, ma chère Ana Catalina ma talentueuse colombienne, dès ton arrivée au laboratoire j'ai très vite senti qu'on allait bien s'entendre tu avais tellement envie d'apprendre et je voulais tellement te transmettre ce que je savais (et j'ai aussi tellement appris avec toi :*) mais ça ne t'a pas empêché de faire des bêtises comme préparer des bactéries compétentes dans du PBS, confondre faire fondre une bouteille de gélose et une recette pour préparer des cookies 😊 bon je m'arrête là je ne vais pas tout dénoncer. Nous avons tellement partagé des choses durant ces 3 années, en plus de travailler avec toi (brillante chercheuse), nos soirées bouffe, nos soirées labo à travailler tard, nos discussions scientifiques, nos discussions de tout et de rien, nos journées détente et tout le reste me manqueront énormément, mais je pense qu'une amitié est née pour la vie et que même si nous continuerons notre chemin chacune de notre côté nous ne manquerons pas de nous retrouver.

Mon chère Sylvain, merci à toi aussi pour tes encouragements, tes gâteaux (surtout la tarte poire amande) après j'aime aussi tes petites surprises culinaires parfois un peu osées, merci aussi pour les nombreuses pauses tisanes à la maison elles m'ont bien réconfortées quand j'en avais besoin. J'espère que ta thèse se passera à merveille et que tu réaliseras tout tes rêves tant sur le plan professionnel mais aussi personnel. En plus, maintenant que tu es devenu un pro des bricks 😊 je peux partir tranquille.

Margaux, une très belle rencontre, merci pour ton énergie quotidienne au labo merci aussi pour tes encouragements et tes conseils inestimables, j'espère que nous resterons en contact

=). Ma chère Melissa, merci beaucoup pour ta bienveillance toujours les mots qu'il faut quand il le faut, Merci aussi pour toute la joie et la bonne humeur que tu dégages, je te souhaite plein de bonheur avec ta petite famille. Camille, merci pour ton sourire et tes encouragements, je te souhaite beaucoup de courage pour ta thèse et j'espère qu'on se reverra pour ta soutenance, je te souhaite aussi une vie professionnelle et personnelle épanouie à Bordeaux. Sadika, quelle merveilleuse rencontre, merci pour tout : tes encouragements, conseils +++ (surtout perso 😊), blagues, fous rires, on a partagé tellement de moments inoubliables et j'espère qu'on en partagera beaucoup d'autres. Wadad, merci d'avoir partagé avec moi ces 4 années avec tous les hauts et tous les bas, aujourd'hui on a toutes le deux réussis et on est délivrées, je te souhaite beaucoup de bonheur =). Stecy, merci beaucoup pour ton sourire et ta joie de vivre, merci pour ton aide avec l'Aria tu m'as sauvé la vie plus d'une fois 😊 merci de prendre le temps à chaque fois aussi de répondre à mes inquiétudes lors des manip de tri, je te souhaite une belle fin de thèse et comme je vous le dis toujours avec Ana j'ai aucune inquiétude vous allez assurer. Merci aussi à tous les stagiaires qui sont passés au laboratoire et avec qui j'ai passé d'agréables moments : Mickael, Walid, Manon, Camille, Damien, Ana, Carolina. Je voudrais aussi remercier les derniers arrivants au labo, on n'a pas eu beaucoup de temps à partager ensemble surtout avec l'écriture de la thèse mais j'ai découvert des personnes exceptionnelles : Jessie, merci pour tout j'ai vraiment découvert une personne géniale j'espère que nous aurons encore un peu l'occasion de nous connaître avant que je parte de Limoges (je t'apprendrais bien l'arabe si tu veux, tu parais bien motivée), Audrey, merci pour tes encouragements, Yolanda, merci pour tes conseils et ton sourire. Je voudrais aussi remercier aussi Isabelle et Cindy pour leur disponibilité et leur aide dans la gestion notamment des commandes, vous nous rendez la vie tellement plus facile merci. Je souhaite aussi remercier toutes les personnes qui ont participé à ce travail de thèse : Emilie Guérin et Eden de la plateforme Biscem pour leur disponibilité, Raya et Anaïs de la laverie pour leur gentillesse, leur sourire et leur efficacité en dépit de mes nombreuses sollicitations.

Je souhaite aussi remercier mes co-doctorants : Hassan, Quentin, Lucie Paulus, Azra, Clotilde, Alexis, j'ai vraiment apprécié les moments qu'on a partagés ensemble. Hassan, je me souviendrai toujours de notre rencontre le jour des auditions de thèse et tes mots d'encouragements alors qu'on ne se connaissait pas encore et tu as été présent jusqu'au dernier jour de ma thèse, merci. Je souhaite aussi remercier les enseignants auprès desquels j'ai eu la chance d'enseigner : Laëtitia Magnol, Christophe Sirac, Stéphanie Durand et Fabrice Dupuy, merci j'ai tellement appris à vos côtés. Je voudrais aussi remercier les techniciens de la faculté des sciences Nelly Vallat, Florence Drouillard et Florence Vallet pour leur aide dans la préparation des TPs et leur gentillesse. Je souhaite aussi remercier Christophe Barget et Claire buisson, l'expérience de MT180 était exceptionnelle elle m'a permis de dépasser mes limites, merci pour vos conseils et vos encouragements.

Je souhaite aussi remercier mes deux collègues du Kremlin bicêtre Saoussen et Cynthia (la dream team), merci pour votre soutien et votre présence. Saoussen, tu as toujours fait en sorte que j'évolue dans ma réflexion et tu as participé grandement à la chercheuse que je suis aujourd'hui. Cynthia, toujours positive et tu as une joie de vie débordante qui nous pousse à toujours aller de l'avant. Je vous aime les filles.

Je voudrais finir en remerciant les membres de ma famille, merci d'avoir fait de moi celle que je suis aujourd'hui, je suis tellement fière de vous et merci de m'épauler quelles que soient les conditions. Je remercie spécialement Maman, tu as toujours été mon pilier et ma force merci pour tout et j'espère qu'un jour je pourrais te rendre un peu de tout ce que tu as fait pour moi. Mama Daloula, j'espère que de là-haut tu es fière de moi, merci pour tout ce que tu as fait pour moi je ne t'oublierai jamais. Je remercie aussi mes tantes et oncles maternels : Chadlia, Rabiaa, Moufida, Lilia, Fatima, Mimia, Latifa, Yamina, Mustapha, Taieb, Lahbib et Adel, merci pour votre soutien et d'avoir toujours cru en moi. Je remercie aussi mes tantes paternelles : Lilia, Hedya, Sherifa, merci pour votre présence et vos encouragements. Je souhaite remercier Mohamed, merci pour ta patience et ta présence durant ces 4 années tu m'as donné la force de continuer à chaque fois, j'ai vraiment de la chance de t'avoir dans ma vie, je sais que je n'étais pas facile à vivre, mais tu ne t'es jamais plaint, merci. Je remercie aussi ma belle-famille

pour leur gentillesse et leur encouragement, je suis heureuse de vous compter dans ma vie. Je voudrais aussi remercier mes amis de toujours, Kalthoum, Amira et Marwa, même si on est loin par la force des choses vous restez très proches de mon cœur, merci pour votre présence et votre soutien.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Remerciements	3
Droits d'auteurs	9
Table des matières	10
Liste des abréviations	14
Index des Figures	16
Index des Tables	18
Introduction	19
Chapitre I. Les intégrons	20
1. La plateforme fonctionnelle d'un intégron	20
1.1. L'intégrase <i>IntI</i>	20
1.2. Le site de recombinaison spécifique <i>attI</i>	21
1.3. Le promoteur des cassettes <i>Pc</i>	22
2. La partie variable d'un intégron : le réseau de cassettes	23
2.1. Structure et fonctions des cassettes de gène	23
2.2. Le site <i>attC</i>	24
3. Mouvement des gènes cassettes : recombinaison catalysée par <i>IntI</i>	26
3.1. Insertion d'une cassette : Recombinaison <i>attI</i> X <i>attC</i>	26
3.2. Excision d'une cassette : Recombinaison <i>attC</i> X <i>attC</i>	27
3.3. Autres réactions de recombinaison	28
3.3.1. <i>attI</i> X <i>attI</i>	28
3.3.2. Recombinaisons sites secondaires	28
4. Expression des cassettes de gène	29
4.1. Régulation transcriptionnelle	29
4.2. Régulation traductionnelle	30
5. Régulation de l'expression de l'intégrase d'intégron	31
5.1. Régulation par la réponse SOS	31
5.2. Autres régulations	33
5.3. Interférence transcriptionnelle	33
5.4. Régulation biofilm-spécifique	34
6. Les différents types d'intégrons	35
6.1. Les intégrons de résistances (IR)	35
6.1.1. Les intégrons de résistance de classe 1 (IR 1)	35
6.1.2. Les intégrons de résistance de classe 2 (IR 2)	36
6.1.3. Les intégrons de résistance de classe 3 (IR 3)	38
6.1.4. Les intégrons de résistance de classe 4 (IR 4), 5 (IR 5) et 6 (IR6)	39
6.2. Les intégrons sédentaires chromosomiques (ISC)	39
7. Epidémiologie des intégrons de résistance	40
7.1. Chez l'homme	41
7.2. Chez l'animal	41
7.3. Dans l'environnement	42
8. Origine et évolution des intégrons	43
Chapitre II. Le biofilm	45
1. Le mode de vie biofilm	45

1.1.	Définition et ubiquité des biofilms.....	45
1.2.	Etapas de formation des biofilms	46
2.	Hétérogénéité du biofilm	47
3.	Les biofilms, un problème de santé publique	49
4.	La récalcitrance du biofilm vis-à-vis des antibiotiques est multifactorielle.....	51
4.1.	Diffusion des antibiotiques dans le biofilm.....	52
4.2.	Hétérogénéité du biofilm : hypoxie et limitation en nutriments.....	53
4.2.1.	Hypoxie	53
4.2.2.	Limitation en nutriments.....	54
4.3.	Le transfert horizontal de gènes.....	55
4.4.	Les bactéries persistantes	56
5.	Modèles de culture du biofilm	58
5.1.	Modèles statiques.....	58
5.2.	Modèles de culture en continue	58
6.	Méthodes permettant l'étude de l'expression hétérogène des gènes en biofilm	59
6.1.	Techniques basées sur la détection de fluorescence	60
6.1.1.	La microscopie	60
6.1.2.	La cytométrie en flux.....	61
6.1.3.	Le choix des protéines fluorescentes.....	62
6.2.	La microdissection laser	63
Chapitre III. La réponse SOS.....		65
1.	Les acteurs de la réponse SOS	65
1.1.	La protéine LexA.....	65
1.2.	La protéine RecA	66
2.	Mécanisme de régulation par la réponse SOS.....	67
3.	Facteurs déclenchant la réponse SOS.....	69
4.	Le régulon SOS	72
5.	La réponse SOS, acteur majeur de la survie des bactéries aux traitements antibiotiques	73
6.	La réponse SOS : une cible prometteuse pour le développement de nouvelles stratégies antibactériennes.	76
Chapitre IV. La réponse stringente		80
1.	Régulateurs de la réponse stringente	81
1.1.	Architecture et distribution des enzymes RSH	81
1.2.	Le régulateur RelA.....	82
1.3.	Le régulateur SpoT	83
2.	Conséquences de l'induction de la réponse Stringente.....	84
2.1.	Inhibition de la réplication	84
2.2.	Effet sur la transcription	85
2.3.	Inhibition de la traduction	88
2.4.	Effets sur le métabolisme cellulaire.....	89
3.	Réponse stringente, acteur majeur de la survie des bactéries aux antibiotiques.....	89
4.	La réponse stringente nouvelle cible antibactérienne.....	93
Objectifs de thèse.....		96
Axe 1 : Localisation et quantification de l'expression des gènes <i>intl1</i> et <i>sfiA</i> en biofilm		98
Mises au point expérimentales		101

1. Mise au point du suivi en temps réel du développement d'un biofilm en système de culture continue microfluidique par microscopie confocale.....	101
1.1. Présentation du système de culture continue microfluidique.....	101
1.2. Souches et plasmides utilisés.....	101
1.3. Culture des biofilms en flow-cell microfluidique.....	102
1.4. Acquisition des images par microscopie confocale.....	103
1.5. Mise au point de la visualisation de formation de biofilm par la souche MG1656 Δ relA Δ spoT F'.....	103
2. Mise au point de la quantification du nombre de bactéries exprimant un gène d'intérêt par cytométrie en flux.....	104
2.1. Culture des biofilms en microfermenteur.....	104
2.2. Analyse par cytométrie en flux.....	104
2.2.1. Test d'autres protéines fluorescentes.....	105
2.2.2. Test d'un autre système de culture de biofilm.....	106
2.2.3. Méthode de « récupération de la fluorescence en aérobie ».....	107
3. Mise au point de la quantification par RT-qPCR du niveau d'expression d'un gène d'intérêt dans les populations de bactéries triées.....	108
3.1. Extraction d'ARNs.....	109
3.2. Quantification du niveau d'expression de gènes par RT-qPCR à partir d'une faible quantité d'ARN.....	110
Résultats.....	112
Axe 2 : Rôle des protéines CRP et IHF dans la régulation de l'expression de l'intégrase <i>intl1</i> en biofilm.....	147
1. Matériels et méthodes.....	150
1.1. Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture.....	150
1.1.1. Souches bactériennes et plasmides.....	150
1.1.2. Conditions de culture.....	150
1.2. Constructions des mutants MG1656 Δ crp et MG1656 Δ ihfA.....	151
1.3. Construction du plasmide de complémentation pZStetR1.1 crp.....	152
1.4. Essais β -galactosidase.....	152
1.5. Analyse statistique.....	152
2. Résultats.....	152
2.1. Rôle de la protéine CRP dans la régulation de l'expression de <i>intl1</i>	152
2.1.1. Effet de la délétion de <i>crp</i>	152
2.1.2. Complémentation par CRP.....	153
2.1.3. Effet de l'arabinose sur l'expression de <i>intl1</i>	154
2.1.4. Complémentation par RelA.....	155
2.2. Influence de la protéine IHF sur l'expression de <i>intl1</i>	156
Discussion.....	157
1. Le stress endogène dans le biofilm favorise l'apparition d'une sous-population de bactéries à fort potentiel de résistance.....	159
2. Etude de la régulation biofilm-spécifique de l'expression de l'intégrase <i>intl1</i>	167
2.1. La régulation de <i>intl1</i> par IHFA n'est pas biofilm-spécifique.....	168
2.2. CRP est impliquée dans la régulation biofilm-spécifique de <i>intl1</i>	168
2.2.1. Hypothèse 1 : CRP induirait l'expression de <i>intl1</i> par l'intermédiaire de RelA	169

2.2.2. Hypothèse 2 : Intermédiaire commun lié à l'induction de la réponse SOS (DksA ?)	170
2.2.3. Lien entre CRP et induction de la réponse SOS	171
3. Régulation de l'expression <i>intl1</i> SOS-indépendante	172
Conclusion et perspectives.....	175
Références bibliographiques	178

Liste des abréviations

°C	Degré Celsius
3'CS	Région 3' conservé
5'CS	Région 5' conservé
A	Adénine
aa	Acides aminés
ACP	Acyl carrier protein
AD	Domaine supplémentaire
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADNe	ADN extracellulaire
ADNsb	ADN simple brin
AFR	Aerobic fluorescence recovery
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ARNP	ARN polymérase
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
BGN	Bactéries à Gram négatif
BGP	Bactéries à Gram positif
CMF	Cytométrie en flux
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CRP	cAMP Receptor protein
di-GMP	di-guanosine monophosphate cyclique
DO	Densité optique
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EHB	Bases extra-hélicoïdale
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAST	Fluorescence-Activating and absorption-Shifting Tag
FbFPs	Flavin-based fluorescent proteins
FIS	Factor for inversion stimulation
G	Guanine
GFP	Green fluorescent protein

GMP	Guanosine monophosphate
GTP	Guanosine triphosphate
HBR	hydroxybenzylidène rhodanine
HD	Domaine hydrolase
HNS	Histone-like Nucleoid structuring protein
Hpf	Hibernation promoting factor
ICE	Élément intégratif et conjugatif
Lrp	Leucine-responsive protein
NIH	National Institutes of Health
OHB	Oxygénothérapie hyperbare
Para-seq-FISH	Parallel sequential fluorescence in situ hybridization
Pb	Paire de base
PBS	Phosphate-buffered saline
PPX	Exopolyphosphatase
R	Purine
RaiA	Ribosome associated inhibitor
RBS	Site de fixation du ribosome
Rmf	Ribosome modulating factor
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RSH	RelA/SpoT Homolog
RT	Rétrotranscription
RT-qPCR	Reverse transcription quantitative real-time PCR.
SAH	Small alarmone hydrolase
SAS	Small alarmone synthetase
SD	Domaine synthétase
SETI	Structured Enhancer of translation initiation
T	Thymine
THG	Transfert horizontal de gènes
TIR	Région d'initiation de la traduction
UCS	Segment central non apparié
UV	Ultraviolet
VTS	Structure terminale variable
Y	Pyrimidine

Index des Figures

- Figure 1 : Structure d'un intégron
- Figure 2 : Schéma représentant les activités de recombinaison de l'intégrase IntI
- Figure 3 : Alignement de la séquence C-terminale de l'intégrase d'intégron avec d'autres membres des Tyrosines Kinases
- Figure 4 : Structure du site de recombinaison spécifique *attI1*
- Figure 5 : Structure du site de recombinaison *attC*
- Figure 6 : Mécanisme moléculaire de l'insertion d'une cassette de gène (recombinaison *attI* x *attC*)
- Figure 7 : Mécanisme moléculaire de l'excision d'une cassette de gène (recombinaison *attC* x *attC*)
- Figure 8 : Mécanisme moléculaire de recombinaison entre deux sites *attI*
- Figure 9 : Séquence et organisation de la région promotrice des IR1
- Figure 10 : Modèle proposé pour la régulation de l'expression de l'intégrase *intI1* par la réponse stringente en biofilm
- Figure 11 : Modèle illustrant l'origine des intégrons de classe 1
- Figure 12 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle d'un biofilm bactérien
- Figure 13 : Développement et structure d'un biofilm bactérien
- Figure 14 : Différentes architectures de biofilm
- Figure 15 : Hétérogénéité chimique au sein du biofilm
- Figure 16 : Les différentes microniches probables au sein d'un biofilm mono-espèce
- Figure 17 : Différents types d'infections liées aux biofilms qui peuvent être contractées chez l'Homme
- Figure 18 : La récalcitrance des biofilms aux antibiotiques est multifactorielle
- Figure 19 : Modèles utilisés pour la culture des biofilms
- Figure 20 : Techniques utilisées pour la caractérisation détaillée des différents composants du biofilm
- Figure 21 : Structure de la protéine LexA
- Figure 22 : Structure de la protéine RecA
- Figure 23 : La réponse SOS chez *E. coli*
- Figure 24 : Signaux induisant la réponse SOS
- Figure 25 : Vue d'ensemble des processus régulés par la réponse SOS
- Figure 26 : Stratégies thérapeutiques développées pour inhiber la réponse SOS
- Figure 27 : Architecture des enzymes RSH, synthèse et hydrolyse du (p)ppGpp
- Figure 28 : Synthèse du (p)ppGpp
- Figure 29 : Le (p)ppGpp inhibe la réplication du chromosome chez *E. coli* et *B. subtilis*

- Figure 30 : Le (p)ppGpp inhibe la traduction protéique
- Figure 31 : Le Système microfluidique CellASIC® ONIX2
- Figure 32 : Induction de la réponse SOS dans un mutant MG Δ relA Δ spoT par ajout du colorant FM4-64
- Figure 33 : Problème de maturation des protéines fluorescentes en biofilm
- Figure 34 : Capacité de différentes protéines fluorescentes à fluorescer après culture des bactéries en biofilm en microfermenteur
- Figure 35 : Capacité de protéines fluorescentes à fluorescer après culture des bactéries en biofilm en chambre ibidi
- Figure 36 : Effet de l'AFR sur la maturation des protéines GFP+ et mCherry
- Figure 37 : RT-qPCR « One-Step » versus « Two -Step »
- Figure 38 : Séquence consensus du site de fixation du complexe CRP-AMPc
- Figure 39 : Séquence consensus du site de fixation de la protéine IHF
- Figure 40 : Influence de la protéine CRP sur l'expression de *intl1*
- Figure 41 : Complémentation du mutant Δ *crp*
- Figure 42 : Effet de l'arabinose sur l'expression de *intl1*
- Figure 43 : Complémentation du mutant Δ *crp* par RelA
- Figure 44 : Influence de la protéine IHF sur l'expression de *intl1*

Index des Tables

- Table 1 : Pourcentage d'identité et de similarité entre les séquences protéiques des intégrases d'intégron de résistance
- Table 2 : Déterminants de surface impliqués dans la formation de biofilm chez *E. coli*
- Table 3 : Liste de gènes appartenant au régulon SOS chez *E. coli*
- Table 4 : Conditions testées pour l'AFR
- Table 5 : Conditions testées pour optimiser la lyse des bactéries
- Table 6 : Efficacité des kits en termes de concentration d'ARN
- Table 7 : Comparaison d'efficacité des kits en termes de sensibilité de détection
- Table 8 : Souches et plasmide utilisés dans cette étude
- Table 9 : Amorces utilisées dans cette étude

Introduction

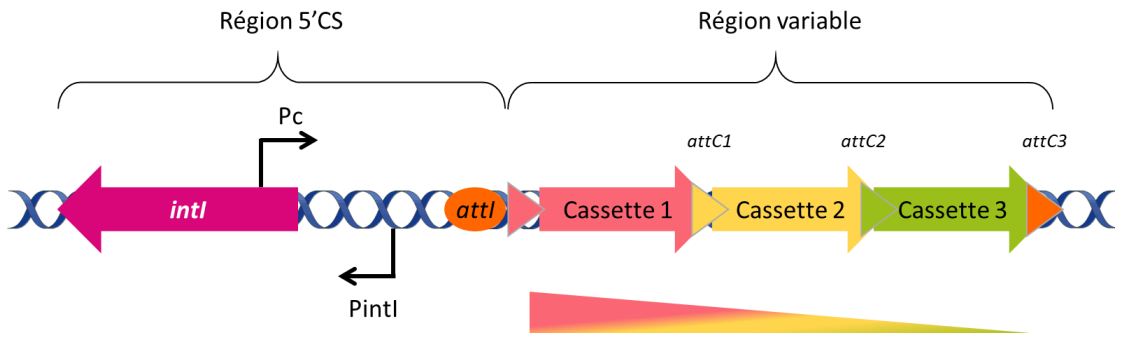


Figure 1 : Structure d'un intégron

Un intégron est constitué de deux parties: la région 5' conservée (5'CS) et la région variable. La région 5'CS est composée de trois éléments: le gène *intI*, un site spécifique de recombinaison *attI* et un promoteur de cassettes, Pc. La région variable contient l'ensemble des cassettes de gène. Une cassette de gène se définit par un cadre ouvert de lecture (*orf*) et d'un site de recombinaison spécifique *attC*. L'expression des cassettes de gène se fait à partir du promoteur Pc. Le niveau d'expression d'une cassette de gène dépend de sa position par rapport au promoteur Pc: plus la cassette est proche du Pc, plus son niveau d'expression est élevé (flèche en dessous des cassettes).

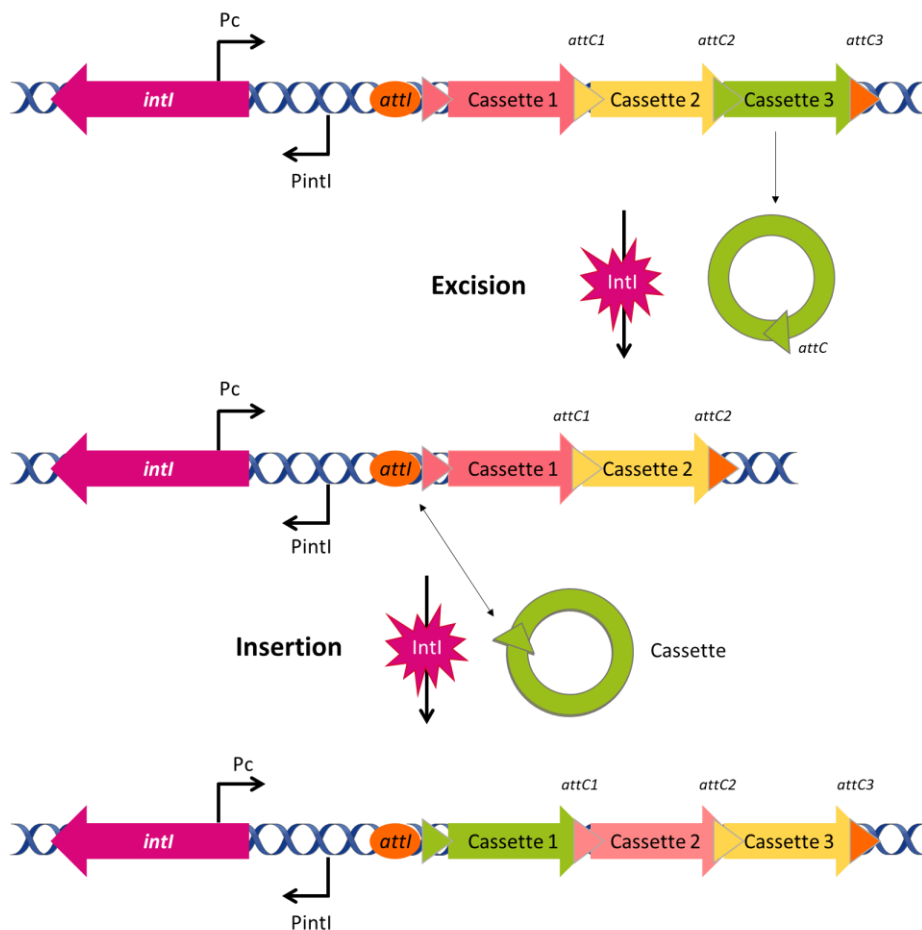


Figure 2: Schéma représentant les activités de recombinaison de l'intégrase IntI

Sont représentées les réactions d'excision: recombinaison entre deux sites *attC* conduisant à l'excision de la cassette de gène verte sous forme circulaire; et la réaction d'intégration: recombinaison entre le site *attI* et un site *attC*, conduisant à l'intégration de la cassette de gène verte en 1^{er} position.

Chapitre I. Les intégrons

En 1989, les chercheurs australiens Hatch Stokes et Ruth Hall ont décrit des éléments génétiques permettant la capture et l'expression de gènes sous forme de cassettes qu'ils ont appelés « intégrons » (Stokes and Hall, 1989). Les intégrons ont historiquement été divisés en deux grandes familles

- Les intégrons de résistance (IR) ou intégrons mobiles, qui sont portés par des plasmides ou des transposons qui assurent leur mobilité. Les IR contiennent un nombre limité de cassettes qui codent essentiellement des gènes de résistances aux antibiotiques. De ce fait, les IRs jouent un rôle majeur dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques.
- Les intégrons sédentaires chromosomiques (ISC) autrefois appelés super-intégrons (SI), sont retrouvés uniquement sur le chromosome bactérien. Ils peuvent porter plus de 200 cassettes dont la plupart codent des protéines de fonctions inconnues. Les ISCs semblent constituer un réservoir de gènes permettant aux bactéries de s'adapter aux stress environnementaux (Mazel, 2006).

1. La plateforme fonctionnelle d'un intégron

Les intégrons se composent à minima de trois éléments clés situés dans une région communément appelée segment conservé 5' (5'CS) : un gène *intl* qui code pour une intégrase, un site spécifique de recombinaison *attI* et un promoteur de cassettes P_c permettant l'expression des cassettes de gène contenues dans la région variable (Figure 1). Une cassette de gène est composée d'un cadre ouvert de lecture et d'un site de recombinaison *attC* (voir section 2 de ce chapitre).

1.1. L'intégrase Intl

L'intégrase Intl est l'élément clé de l'intégron. Elle catalyse l'insertion (recombinaison entre site *attI* et site *attC*) ou l'excision de cassettes de gène (recombinaison entre deux sites

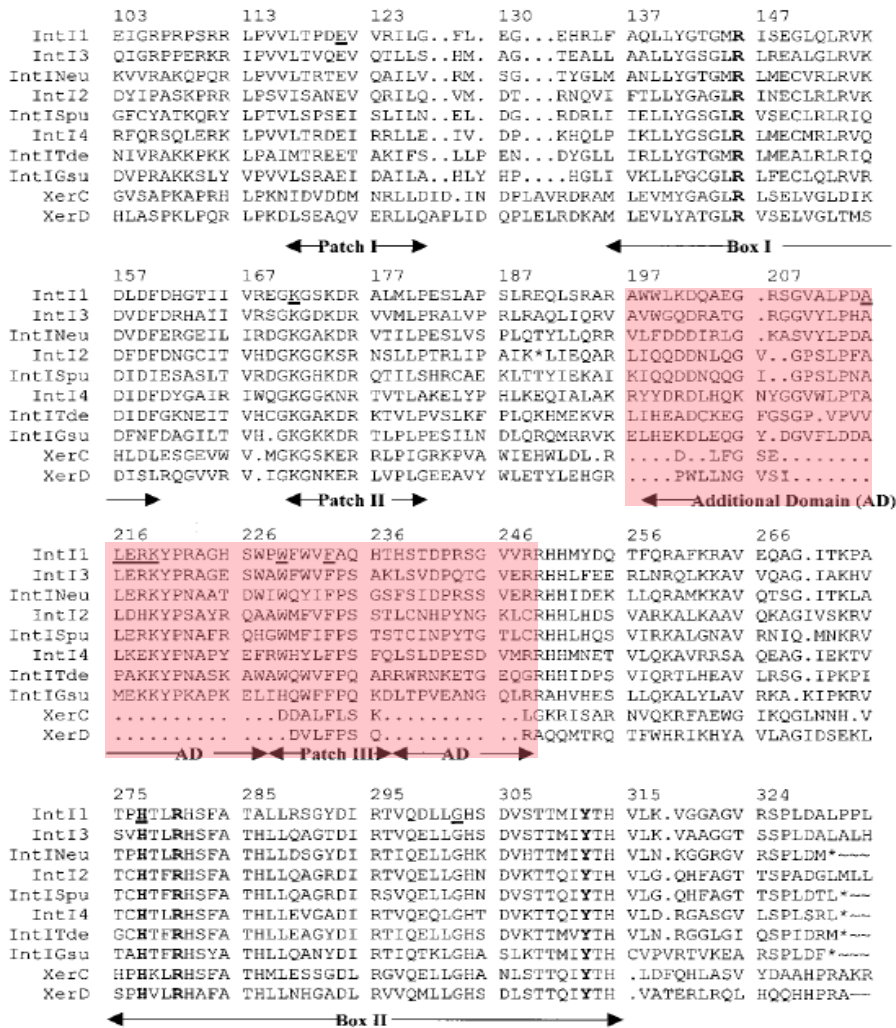


Figure 3 : Alignement de la séquence C-terminale de l'intégrase d'intégron avec d'autres membres des Tyrosines Kinases

IntI1: intégrase d'intégron de classe 1 du plasmide pVS1; IntI2: intégrase d'intégron de classe 2 du transposon Tn7; IntI3: intégrase d'intégron de classe 3 du plasmide *Serratia marcescens*; IntI4: intégrase d'intégron de classe 4 de *Vibrio cholerae*; IntISpu: intégrase d'intégron de *Shewanella putrefaciens*; IntINeu: intégrase d'intégron de *Nitrosomonas europaea*; IntITde: intégrase d'intégron de *Treponema denticola*; IntIGsu: intégrase d'intégron de *Geobacter sulfurreducens*; XerC: recombinase à tyrosine d' *E. coli*; XerD: recombinase à tyrosine d' *E. coli*.

La numérotation utilisée est basée sur la séquence de IntI1. Les boîtes (box 1 et box 2) et les motifs (Patch I, II et III) conservés sont indiqués. Les acides aminés catalytiques sont indiqués en gras au sein des deux boîtes conservées box 1 et box 2. Le domaine AD (en rouge) est présent uniquement chez les intégrases d'intégron, il est à l'origine de la spécificité des intégrases d'intégron à reconnaître et recombiner des molécules d'ADN simple brin. D'après (Messier et Roy 2001).

attC) (Figure 2). L'activité recombinase de l'intégrase sera décrite plus en détail dans la section 3 de ce chapitre.

L'intégrase d'intégron est une protéine tétramérique appartenant à la famille des recombinases à tyrosine spécifique de site (Y-recombinases) (Nunes-Düby et al., 1998). Elle possède les principales caractéristiques structurales de cette famille : un site actif composé de cinq résidus hautement conservés RKHRH (arginine-lysine-histidine-arginine-histidine) localisé près de la tyrosine catalytique dans la partie carboxyle de la protéine (Grindley et al., 2006), deux boîtes appelées « box 1 » et « box 2 » impliquées dans l'interaction avec l'ADN (Lee et al., 1999), et trois motifs Patch I, II et III jouant un rôle dans la structure secondaire de ces enzymes (Grindley et al., 2006) (Figure 3). Contrairement à la plupart des Y-recombinases, les intégrases d'intégrons sont capables de recombiner une molécule double brin (*attI*) avec une deuxième molécule simple brin (*attC*) en reconnaissant une structure secondaire très spécifique (Bouvier et al., 2005). La comparaison entre la séquence des intégrases d'intégrons et les autres Y-recombinases a mis en évidence l'existence d'un domaine supplémentaire (AD) de 35 résidus situé juste en aval du patch III contenant une hélice α , appelée I2, qui semble être responsable de la spécificité des intégrases d'intégrons à reconnaître et recombiner des molécules d'ADN simple brin (MacDonald et al., 2006; Messier and Roy, 2001) (Figure 3).

La séquence en acides aminés de l'intégrase a permis de définir différentes classes d'intégrons. Aujourd'hui, on compte 6 classes d'intégrons de résistances (Jove, 2021). Les intégrases d'intégrons de résistance présentent une très forte similitude de séquence protéique environ 40-60% (Collis et al., 2002b; Hall et al., 1999) (Table 1).

1.2. Le site de recombinaison spécifique *attI*

Le site *attI* est une séquence spécifique reconnue par l'intégrase IntI, il sert de point d'intégration pour les nouvelles cassettes au sein de l'intégron. Il est composé au minimum de 63 paires de bases (pb) et sa séquence varie fortement d'une classe d'intégron à une autre (Hall and Collis, 1998). Les sites *attI* comportent deux sites de liaison à l'intégrase : une boîte R comportant un motif conservé de 7pb, GTTRRRY (R : purine, G : pyrimidine), et une boîte

Table 1 : Pourcentage d'identité (bleu) et de similarité (rose) entre les séquences protéiques des intégrases d'intégron de résistance. (D'après Collis et al,2002)

	IntI1	IntI2	IntI3	IntI4	IntI5
IntI1	100	46.6	59.6	45.5	44
IntI2	63	100	46.3	49.2	48
IntI3	72.8	59.7	100	44.8	45
IntI4	64.3	64.3	62.1	100	94
IntI5	62	62	63	96	100

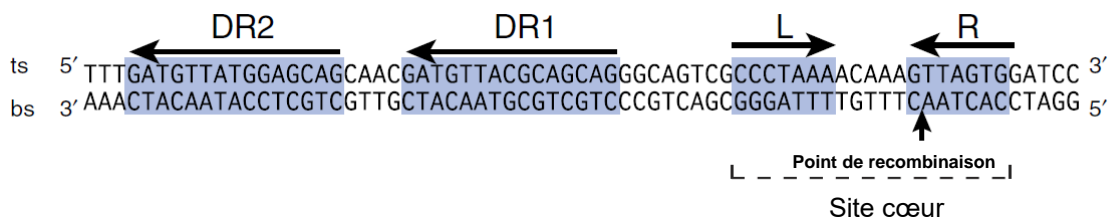


Figure 4 : Structure du site de recombinaison spécifique *attI1*

Le site *attI1* comporte deux sites de liaison à l'intégrase : une boîte L et une boîte R. La recombinaison des cassettes s'opère au niveau du triplet hautement conservé 5'-GTT-3' se trouvant au sein de la boîte R. Les deux boîtes DR1 et DR2 sont également capables de lier l'intégrase IntI1, mais sont non essentielles à son activité, elles augmentent l'efficacité de recombinaison en la piégeant à proximité du site cœur. bs: brin du bas; ts: brin du haut ; DR: répétitions directes. D'après (Escudero *et al*, 2016).

L avec une séquence variable ; les boîtes R et L constituent un site appelé « site simple » ou « site cœur » (Figure 4) (Collis and Hall, 2004). La recombinaison des cassettes s'opère au niveau du triplet hautement conservé 5'-GTT-3' se trouvant au sein de la boîte R, le clivage survient entre le C et le premier A du brin complémentaire (brin bas) (Figure 4) (Hall et al., 1991; Martinez and de la Cruz, 1990). Le site *attI1* comporte aussi deux séquences répétées directes imparfaites de liaison à l'intégrase, DR1 (site de fixation fort) et DR2 (site de fixation faible), localisées en amont du site cœur (Figure 4). Ces séquences sont non essentielles à l'activité de l'intégrase d'intégron de classe 1 (IntI1) mais elles augmentent son efficacité de recombinaison en la piégeant à proximité du site cœur (Gravel et al., 1998; Partridge et al., 2000). Il existe pour chaque gène d'intégrase d'intégron un site *attI* associé avec lequel l'intégrase recombine préférentiellement, mais elle est aussi capable de recombiner avec les autres sites *attI* avec une efficacité moindre ; par exemple IntI1 peut intégrer des cassettes au sein des sites *attI2* ou *attI3* (Collis et al., 2002b).

1.3. Le promoteur des cassettes Pc

La grande majorité des cassettes de gène ne possède pas de promoteur propre, leur expression se fait à partir du promoteur de cassettes Pc, localisé dans la 5'CS soit au sein de la séquence codante de l'intégrase pour les intégrons de classe 1 et 3 (Figure 1), soit au sein du site *attI* pour les intégrons de classe 2 (Collis and Hall, 1995; Jové et al., 2017). Il existe néanmoins des cassettes de gène possédant leur propre promoteur telles que *cmIA1*, *ere(A)*, *oxa10* et *qnrVC1* (Bissonnette et al., 1991; Biskri and Mazel, 2003; Naas et al., 2001; da Fonseca and Vicente, 2012). Le niveau d'expression d'une cassette de gène dépend de sa position par rapport au promoteur Pc: plus la cassette est proche du promoteur plus son niveau d'expression est élevé et inversement (Figure 1) (Collis et al., 2002a; Collis and Hall, 1995).

La région promotrice permettant l'expression des cassettes chez les intégrons de résistance de classe 1 (IR 1) est la plus étudiée. Chez ces intégrons, le promoteur Pc se trouve dans la séquence codante du gène *intl1*, plus de 200 paires de base en amont de la première cassette. Chez les intégrons de résistance de classe 2 (IR 2), deux promoteurs Pc (Pc2A et

Pc2B) ont été identifiés. Ils se trouvent dans le site *attI2* et semblent contribuer de manière similaire à l'expression des cassettes de gène (Jové et al., 2017). Chez les intégrons de résistances de classe 3 (IR 3), le promoteur Pc est localisé dans la séquence codante du gène *intI3* et 4 variants ont été identifiés à ce jour (Collis et al., 2002a; Simo Tchuinte et al., 2016).

2. La partie variable d'un intégron : le réseau de cassettes

2.1. Structure et fonctions des cassettes de gène

Les cassettes de gène sont composées d'un cadre ouvert de lecture (orf) et d'un site de recombinaison spécifique *attC* reconnu par l'intégrase (Recchia and Hall, 1995). Les cassettes de gène constituent la partie variable et mobile de l'intégron (Figure 1). De tailles relativement petites, entre 500 à 1000pb, les cassettes peuvent se trouver soit sous forme circulaire libres et non-replicative, soit sous forme linéaire double brin intégrées au sein d'un intégron (Escudero* et al., 2015). L'ensemble des cassettes de gène contenues dans un intégron constitue ce que l'on appelle le réseau de cassettes. Chez les IR1 le réseau le plus long décrit à ce jour comporte 10 cassettes (GenBank : KC170993). Inversement, des intégrons de résistance ne portant aucune cassette ont été décrits et sont fréquemment retrouvés (Bissonnette and Roy, 1992; Stalder et al., 2014). Le nombre limité des cassettes de gène au sein des IRs pourrait être expliqué par leur coût biologique. En effet une étude récente du laboratoire a démontré que le coût biologique d'un intégron augmente de façon significative avec le nombre de cassettes présentes dans le réseau de cassettes (Lacotte et al., 2017). Les gènes contenus dans les cassettes des intégrons de résistance codent généralement des gènes de résistance aux antibiotiques. A ce jour (Juin 2021) 174 cassettes de résistance ont été identifiées conférant la résistance à toutes les familles d'antibiotiques : β -lactamines, tous les aminosides, streptomycine, triméthoprime, chloramphénicol, fosfomycine, macrolides, lincosamides, rifampicine mais aussi quinolones (<http://integrall.bio.ua.pt/>) (Moura et al., 2009; Partridge et al., 2009). On retrouve aussi le gène *qac* qui confère la résistance aux ammoniums quaternaires et de nombreuses cassettes qui codent pour des fonctions inconnues.

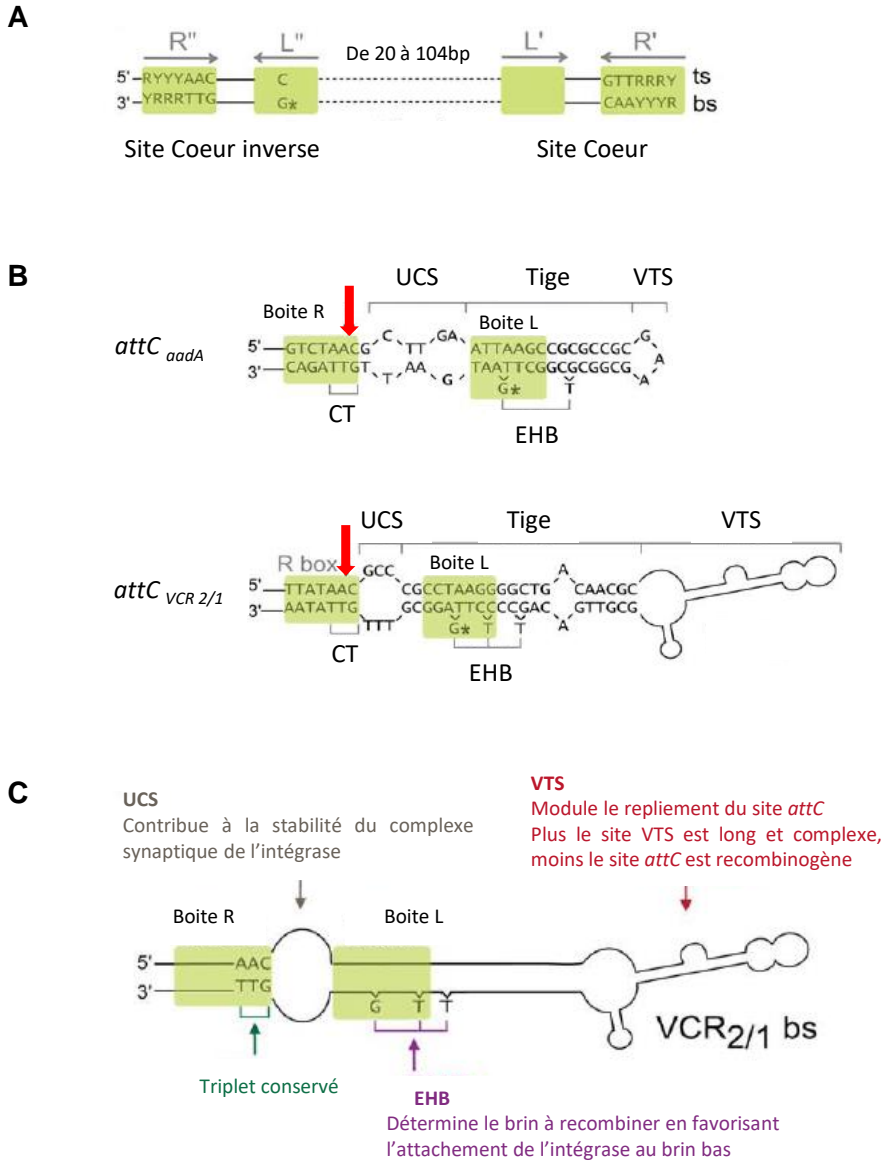


Figure 5 : Structure du site de recombinaison *attC*

A. Représentation schématique du site *attC* double brin. Le site *attC* comporte deux régions inversées répétées imparfaites : R''L'' et R'L' séparées par une région variable en taille et en séquence. Le brin du haut (ts pour top strand) et le brin du bas (bs pour bottom strand) sont indiqués sur le schéma.

B. Exemples de la structuration du brin bas des sites *attC_{adaA7}* et *attC_{VCR2/1}*. Les deux régions R''L'' et R'L' du brin bas s'apparient et forment deux boîtes R et L. Ce repliement du site *attC* aboutit à une structure cruciforme reconnue et recombinée par l'intégrase IntI. Le point de recombinaison (flèche rouge) est situé dans la boîte R.

C. Représentation schématique des caractéristiques structurales du site *attC* et de leurs rôles. La structuration du site *attC* aboutit à la formation de trois éléments structuraux impactant son pouvoir recombinogène: les bases extra-hélicoïdale ou EHBs présentes au niveau de la tige, un segment central non apparié ou UCS, et une structure terminale variable (VTS). D'après (Escudero *et al*, 2015 et Nivina *et al*, 2016).

2.2. Le site *attC*

Le site *attC* fait partie intégrante des cassettes de gène, il est nécessaire à leur mobilité et il est spécifique à chaque cassette (chez les intégrons de résistance). Le site *attC* s'organise en deux régions inversées répétées imparfaites : R''L'' et R'L' (aussi dites 1L-2L et 2R-2L respectivement) séparées par une région variable en taille et en séquence, donnant ainsi des sites *attC* de taille variable allant de 57pb à 141pb (Figure 5A) (Stokes et al., 1997). Malgré la variabilité de la séquence du site *attC*, on retrouve deux régions de 7 pb, habituellement complément inverse l'une de l'autre, dans les régions R'' (5'-RYYYAAC-3') et R' (5'-GTTRRRY-3') (R : purine, Y : pyrimidine) appelées « site cœur » et « site cœur inverse » respectivement (Stokes et al., 1997) (Figure 5A). La comparaison des différents sites *attC* a montré que la conservation de séquence concerne uniquement les deux triplets 5'-AAC-3' et 5'-GTT-3' contenu respectivement dans les régions R'' et R' ; les mêmes triplets sont présents dans le site *attI* (Stokes et al., 1997). L'appariement entre les régions R''L'' et R'L' du brin bas du site *attC* aboutit à la formation des boîtes R et L et donne lieu à une structure secondaire cruciforme de type « tige boucle » (Figure 5B), substrat qui sera reconnu et recombinaison par l'intégrase. En effet, la reconnaissance du site *attC* n'est pas basée sur sa séquence primaire mais plutôt sur sa structure secondaire (Bouvier et al., 2005; Francia et al., 1999; Johansson et al., 2004). La recombinaison du brin bas du site *attC* par l'intégrase est essentielle pour l'expression à partir du Pc, de la cassette de gène nouvellement insérée (Bouvier et al., 2009).

Le potentiel recombino-gène du site *attC* est influencé par trois caractéristiques structurales qui apparaissent lors du repliement du brin bas :

Les bases extra-hélicoïdale ou EHBs (extrahelical bases) : il y en a deux ou trois en fonction du site *attC*, ce sont des bases présentes sur le bras R''L'' qui n'ont pas de bases complémentaires dans le bras R'L' et qui « dépassent » du site (Bouvier et al., 2009) (Figures 5B et C). Ces bases jouent trois rôles majeurs lors de la recombinaison : (i) elles déterminent le brin qui va recombiner, le brin bas, ce qui conditionne l'insertion de la cassette gène dans le sens du Pc pour qu'elle puisse être exprimée une fois insérée au sein de l'intégron (Bouvier et al., 2009; Nivina et al., 2016), (ii) elles stabilisent le complexe synaptique lors de la

recombinaison en établissant des liaisons avec les quatre monomères de l'intégrase et (iii) elles empêchent une seconde coupure du site *attC* et l'échange abortif du second brin en éloignant la tyrosine catalytique des monomères de l'intégrase fixés aux boîtes L''- L' (MacDonald et al., 2006).

Un segment central non apparié ou UCS (Uncoupled central spacer) : sa séquence n'est pas conservée, il se trouve entre la boîte L et R, il provient de l'alignement imparfait des régions R''L'' et R'L' (Figures 5B et C). Bouvier *et al.* ont démontré que la région UCS augmentait l'efficacité de la réaction de recombinaison mais ne participait pas à déterminer le brin à recombinaison (Bouvier et al., 2009). Néanmoins, une étude récente du même laboratoire a mis en évidence que la région UCS jouait aussi un rôle important dans la sélection du brin du site *attC* à recombinaison (brin bas), le mécanisme par lequel cette structure contribue à la sélection du brin à recombinaison semble indirecte (cette structure ne se lie pas à l'intégrase) mais reste encore non identifié. Les auteurs suggèrent que lors de l'insertion d'une cassette, la structure UCS pourrait stabiliser la structure repliée du brin bas ou influencer la stabilité du complexe synaptique de l'intégrase (Nivina et al., 2016).

Une structure terminale variable (VTS) : elle correspond à la fin de la tige boucle, sa taille varie en fonction du site *attC*. Les sites *attC* des IRs ont généralement des structures VTS courtes (3 nucléotides pour le *attC_{aadA7}*). Cependant, cette structure est plus longue chez les sites *attC* des ISCs formant une structure complexe en branche (exemple *attC_{VCR}*) (Figure 5C). Il a été montré que la taille et la complexité de la structure VTS impactait la capacité du site *attC* à former une structure recombinogène (motif tige boucle) lorsque celui-ci doit s'extruder d'une molécule d'ADN double brin symétrique et appariée (plus la structure VTS est longue moins le site *attC* est recombinogène) (Loot et al., 2010). Récemment, il a été mis en évidence qu'en plus d'influencer la fréquence de recombinaison, la VTS participerait à la sélection du brin du site *attC* à recombinaison afin d'assurer l'insertion de la cassette dans le bon sens par rapport au promoteur Pc (Nivina et al., 2016).

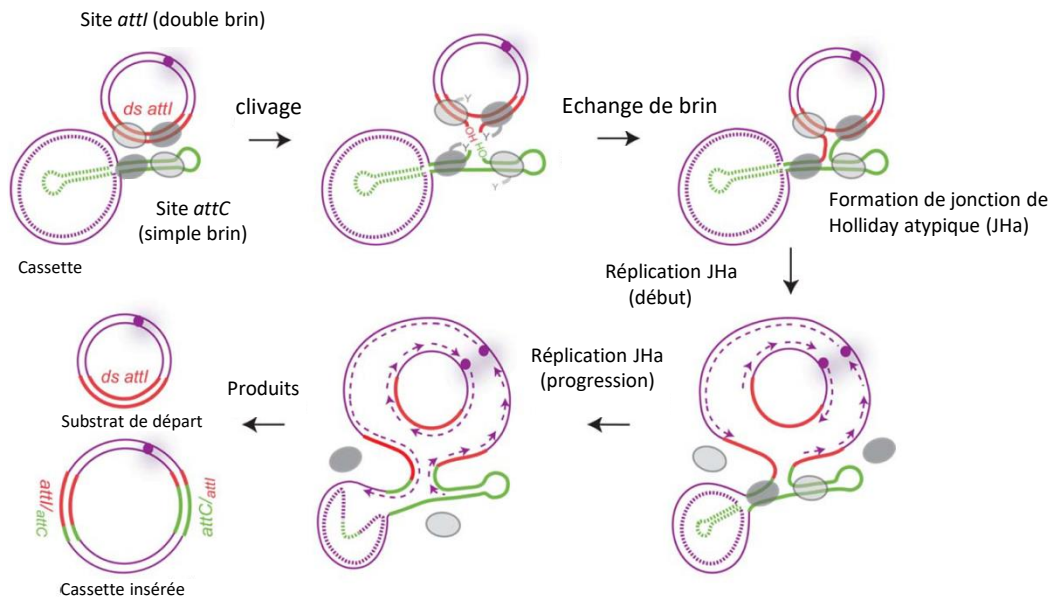


Figure 6 : Mécanisme moléculaire de l'insertion d'une cassette de gène (recombinaison *attI* x *attC*)

L'insertion d'une cassette de gène dans un intégron se fait par recombinaison entre un site *attI* double brin (ligne rouge) et le brin bas d'un site *attC* (ligne verte continue). Le brin haut du site *attC* est aussi représenté (ligne verte en pointillés). La cassette est indiquée en violet.

La réaction de recombinaison est catalysée par un tétramère de protéine *IntI* (chaque monomère est représenté au niveau de son site de liaison avec les sites *attI* et *attC* par des ovaux gris, les deux monomères actifs sont en gris foncé). L'ADN est clivé au niveau du point de recombinaison entre le C et AA des sites *attI* et *attC*. Il y a ensuite un échange de brin entre les deux structures et la formation d'une jonction de Holliday atypique (JHa) (double brin/ simple brin). La résolution de la JHa fait intervenir une étape de réplication de l'ADN. Les origines de réplication sont représentées par un cercle violet et les brins nouvellement synthétisés sont indiqués par des lignes violettes en pointillés. Les produits de recombinaison sont représentés: le substrat de départ et le substrat ayant inséré la nouvelle cassette. Suite à l'insertion de la nouvelle cassette, il y a formation d'un site *attI/attC* chimérique : les 6 dernières bases du site *attI* correspondent aux 6 dernières bases du site *attC* de la nouvelle cassette et inversement. D'après (Escudero *et al*, 2015).

3. Mouvement des gènes cassettes : recombinaison catalysée par IntI

3.1. Insertion d'une cassette : Recombinaison *attI* X *attC*

L'intégrase catalyse la recombinaison entre les sites *attI* et *attC* aboutissant à l'insertion d'une cassette de gène au sein de l'intégron. L'efficacité de cette réaction est due en partie au fait que le site *attI* est constamment sous sa forme recombinogène (dsDNA) (Escudero et al., 2018). La cassette nouvellement acquise est introduite au plus près du promoteur Pc pour être exprimée efficacement, les cassettes initialement présentes au sein de l'intégron se retrouvent alors à une distance plus importante de Pc diminuant ainsi leur niveau d'expression. Cette réaction fait de l'intégrase d'intégron une Y-recombinase unique du fait de sa capacité à recombiner deux sites d'architecture différente : le site *attI* (double brin) et le site *attC* (structure secondaire en tige-boucle et simple brin).

Au cours de la recombinaison, les quatre monomères de l'intégrase IntI se fixent sur les boîtes R et L des sites *attI* et *attC*. Seuls les deux monomères fixés sur les boîtes R des sites *attI* et *attC* sont actifs (Figure 6). La recombinaison est initiée par le clivage des brins d'ADN par le biais de la tyrosine catalytique sur chacun des duplex au niveau des points de recombinaison entre le C et AA, la deuxième étape consiste à transférer un premier brin formant ainsi une jonction de Holliday atypique (Figure 6). Dans un contexte classique de recombinaison entre deux molécules double brin, la résolution de la jonction se serait faite par l'échange d'un second brin, mais dans le cas des intégrons où seul le brin bas du site *attC* fait l'objet de la recombinaison, l'échange d'un second brin aboutirait à la formation d'une molécule fermée de façon covalente et non viable ; pour cela l'échange du second brin doit être évité. En effet dans la boîte L du site *attC*, une base extra-héliocœdale « T » semble éloigner la tyrosine catalytique d'un des monomères de l'intégrase évitant l'attaque nucléophile au sein de cette boîte L du site *attC* (MacDonald et al., 2006). Il a été démontré que la résolution de cette jonction de Holliday atypique fait intervenir une étape de réplication de l'ADN, c'est un processus semi-conservatif qui aboutit à la formation de deux produits : le substrat initial et une molécule ayant inséré la cassette (Loot et al., 2012). A l'issue de la réaction de

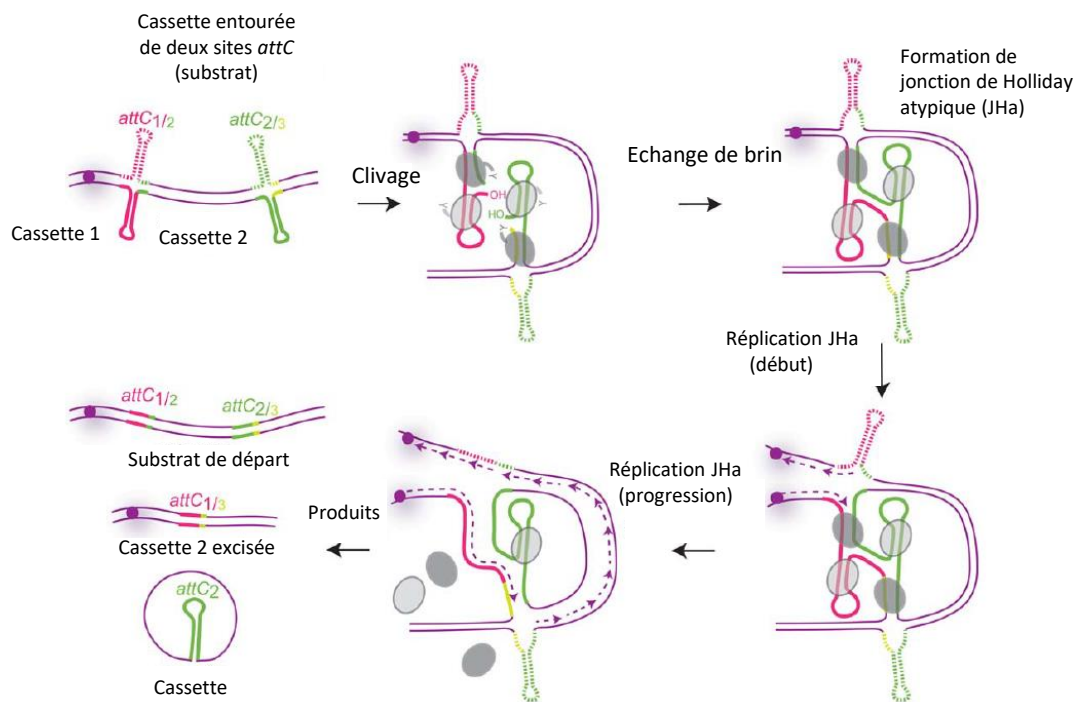


Figure 7 : Mécanisme moléculaire de l'excision d'une cassette de gène (recombinaison *attC* x *attC*)

L'excision d'une cassette de gène à partir d'un intégron se fait par recombinaison entre deux sites *attC* (brin bas en tige-boucle représenté en rose et vert pour les sites *attC*₁ et *attC*₂ respectivement). Les brins hauts des sites *attC* sont aussi représentés en pointillés. Les cassettes 1 et 2 sont indiquées sur le schéma.

La réaction de recombinaison est catalysée par un tétramère de la protéine IntI (chaque monomère est représenté au niveau de son site de liaison sur les sites *attC* par des ovales gris, les deux monomères actifs sont en gris foncé). Dans un premier temps l'ADN est clivé. Il y a ensuite un échange de brin entre les deux structures et la formation d'une jonction de Holliday atypique (JHa) (simple brin/ simple brin). Le modèle de résolution de la JHa impliquerait une étape de réplication comme pour la recombinaison *attI* x *attC*. Les origines de réplication sont représentées par un cercle violet et les brins nouvellement synthétisés sont indiqués par des lignes violettes en pointillés. Les produits de recombinaison sont représentés: le substrat de départ, le substrat ayant excisé la cassette et la cassette excisée sous forme simple brin. D'après (Escudero *et al*, 2015).

recombinaison, il y a formation de site *attI* / *attC* chimérique : les 6 dernières bases de la boîte R du nouveau site *attI* correspondent aux 6 dernières bases du site R' du site *attC* de la nouvelle cassette, et les 6 dernières bases du site *attC* de la nouvelle cassette correspondent aux 6 bases du site *attI* (Figure 6). Cependant, si l'intégron contient déjà des cassettes, les 6 dernières bases du site *attC* de la nouvelle cassette correspondront aux 6 bases du site R' du site *attC* de la cassette qui était en première position (Escudero* et al., 2015).

3.2. Excision d'une cassette : Recombinaison *attC* X *attC*

L'excision d'une cassette nécessite une réaction de recombinaison entre deux sites *attC*, l'un en amont et l'autre en aval de la cassette, ce qui aboutit à l'excision d'une cassette circulaire fermée de façon covalente (Figure 7) (Collis and Hall, 1992). Il est nécessaire que les deux sites *attC* soient sous forme recombinogène au même moment (brin bas en structure tige-boucle) pour que l'intégrase catalyse la réaction d'excision (Escudero* et al., 2015). L'excision d'une cassette se fait selon le principe décrit précédemment : clivage du brin au niveau du site R du site *attC* et échange de brin donnant lieu à une jonction de Holliday atypique dont la résolution semble se faire par mécanisme répliatif car l'échange du second brin n'aboutirait pas à l'excision de la cassette mais à l'échange du brin bas entre les deux sites *attC*. Ce processus semi-conservatif résulte en la formation de trois produits : la réplication du brin bas libèrera une cassette sous forme de molécule simple brin circulaire, fermée de manière covalente ainsi que la molécule d'ADN recombinée et excisée, et la réplication du brin haut donnera lieu au substrat initial (Figure 7) (Escudero* et al., 2015). La cassette nouvellement excisée est sous forme simple brin donc prête à être recombinée par l'intégrase pour une nouvelle intégration. Cette réaction doit se faire rapidement faute de quoi la cassette sera perdue lors de la division cellulaire car elle est dépourvue d'origine de réplication (Escudero* et al., 2015).

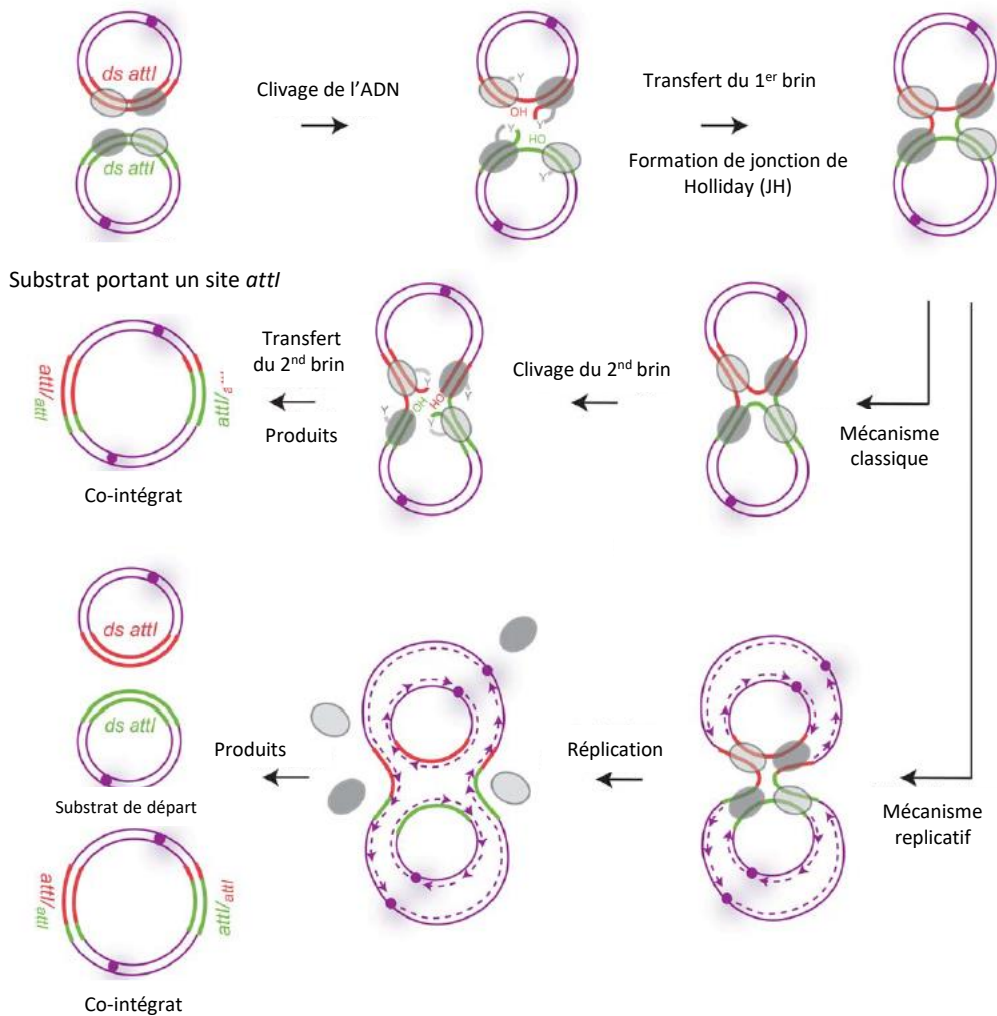


Figure 8 : Mécanisme moléculaire de recombinaison entre deux sites *attI*

La recombinaison entre deux sites *attI* (en vert et rouge) est représentée ici. La réaction de recombinaison est catalysée par un tétramère de la protéine IntI (chaque monomère est représenté au niveau de son site de liaison avec les sites *attC* par des ovaux gris, les deux monomères actifs sont en gris foncé). La réaction débute par le clivage de l'ADN. Il y a ensuite un échange du premier brin entre les deux structures et la formation de la jonction de Holliday (JH). La résolution de la JH peut se faire par (i) un mécanisme classique (coupure et transfert du second brin) ou par (ii) un mécanisme répliatif. Les origines de répliation sont représentées par un cercle violet et les brins nouvellement synthétisés sont indiqués par des lignes violettes en pointillés. Les produits de recombinaison sont représentés: le substrat de départ, un co-intégrat dans lequel les deux substrats de départ ont fusionné. D'après (Escudero *et al*, 2015).

3.3. Autres réactions de recombinaison

3.3.1. *attI* X *attI*

La recombinaison entre deux sites *attI* est possible mais avec une fréquence 1000 fois plus faible que la recombinaison entre un site *attI* et un site *attC* (Collis et al., 2001; Hansson et al., 1997). Le processus de recombinaison est quasiment le même : échange d'un premier brin, formation de jonction de Holliday classique qui peut être résolue soit par la voie classique d'isomérisation par le biais d'échange du second brin, soit par un mécanisme réplcatif donnant lieu à un co-intégrat par la fusion des deux substrats (Figure 8) (Escudero et al., 2016). La recombinaison entre deux sites *attI* se produit lorsque plusieurs sites *attI* sont présents dans la bactérie (Escudero* et al., 2015). Cependant l'intérêt biologique de cette réaction n'a pas encore été élucidé.

3.3.2. Recombinaisons sites secondaires

De façon occasionnelle, les sites *attI* et *attC* peuvent recombiner avec des sites secondaires situés en dehors de l'intégron (Hansson et al., 1997; Recchia and Hall, 1995). L'intégrase est capable de reconnaître de façon non spécifique des séquences avec un motif GNT. La recombinaison d'un site *attC* avec un site secondaire a été décrite par l'étude de Recchia et al., dans laquelle la cassette *aadB* a été retrouvée insérée dans un site secondaire sur un plasmide *incQ* juste en aval d'un promoteur (Recchia and Hall, 1995). En l'absence d'un motif GTTRY, l'excision de la cassette est peu probable et donc l'acquisition de la cassette est stable dans le temps. Pour le site *attI*, la recombinaison avec des sites secondaires a été démontrée seulement de façon expérimentale, il n'est donc pas sûr qu'elle soit effective chez la bactérie (Hansson et al., 1997).

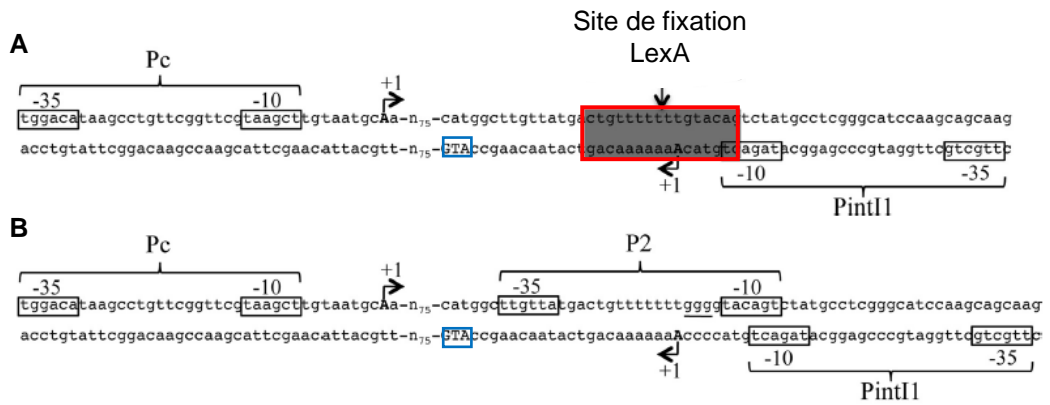


Figure 9 : Séquence et organisation de la région promotrice des IR1

A. Séquence et organisation des promoteurs Pc et PintI1; **B.** Séquence et organisation des promoteurs Pc, P2 et PintI1.

La séquence des différents promoteurs est délimitée par des parenthèses horizontales. Les éléments -35 et -10 de chaque promoteur sont encadrés. Les sites d'initiation de transcription (+1) sont indiqués par une flèche et une lettre en majuscule. Le site de fixation de la protéine LexA est encadré en rouge. Le codon start de l'intégrase est encadré en bleu. Les 3 paires de bases permettant la création du promoteur P2 sont soulignées. Cette insertion inactive le site de fixation de LexA. D'après (Guérin *et al*, 2011).

4. Expression des cassettes de gène

4.1. Régulation transcriptionnelle

Comme vu précédemment, la plupart des cassettes de gène ne possèdent pas de promoteur. Elles sont exprimées à partir du promoteur Pc, parfois associé au promoteur P2 chez les IR 1 (Jové et al., 2017, 2010; Simo Tchuinte et al., 2016). Chez les IR 1, 13 variants de Pc ont été décrits à ce jour sur la base des éléments -35 et -10 et la séquence en amont de l'élément -10 (l'élément 5'-TGN-3') (Jové et al., 2010). L'élément 5'-TGN-3' crée un promoteur -10 étendu appelé TGN-10, il sert de point supplémentaire pour la fixation de l'ARN polymérase augmentant ainsi la force du promoteur (Burr et al., 2000; Nesvera et al., 1998). Un second promoteur de cassettes de gène, P2, est retrouvé en plus du Pc chez environ 10% des IR 1. Il est créé par l'insertion de trois « G » entre deux éléments -10 et -35 potentiels générant ainsi un promoteur actif (Figure 9B). Il est très souvent associé au variant PcW (Collis and Hall, 1995; Jové et al., 2010). A ce jour, 4 variants de P2 et 20 combinaisons Pc-P2 ont été décrites (Jové et al., 2010). Les promoteurs Pc peuvent être classés selon leur prévalence : $PcW-P2 < PcW \approx PcW_{TGN-10} < PcS \approx PcH1$ (d'après une analyse *in silico* de 321 séquences) ou selon leur force (chez *E. coli*) avec du plus faible au plus fort : $PcW < PcH1 < PcW-P2 < PcW_{TGN-10} < PcS$ avec une force supérieur à celle de PcW de 4.5, 7, 15 et 25 fois respectivement (Jové et al., 2010). De façon intéressante, plusieurs études ont rapporté une proportion importante des promoteurs Pc faibles (PcW et PcH1) chez les IR 1 d'origine clinique (Jové et al., 2010; Moura et al., 2012; Vinué et al., 2011). La séquence du promoteur Pc se trouve au sein de la séquence codante de *intl1* par conséquent toute variation dans la séquence du promoteur affecte la séquence en acides aminés de l'intégrase. L'étude de Jové *et al.* a décrit 10 variants de Intl1 à partir des 13 variants de Pc, trois d'entre eux représentent 96% des Intl1 : Intl1_{R32_H39}, Intl1_{R32_N39} et Intl1_{P32_H39} (Jové et al., 2010). De plus, une corrélation inverse entre l'activité d'excision de l'intégrase et la force de promoteur a été mise en évidence : plus le Pc est faible plus l'activité d'excision de l'intégrase est forte (Jové et al., 2010). L'expression d'une cassette de gène dépend de deux facteurs : (i) la force du Pc, plus le Pc est fort, plus important sera le

niveau d'expression de la cassette, et (ii) la position de la cassette au sein du réseau, plus la cassette est proche du promoteur plus son niveau d'expression est élevé et inversement (Collis and Hall, 1995). Il a longtemps été considéré que la structure en tige boucle du site *attC* était responsable de l'atténuation graduelle de l'expression des cassettes de gène selon leur position et qu'elle agirait comme terminateur de transcription Rho-indépendant (Collis and Hall, 1995), mais finalement il s'est avéré que la transcription des cassettes n'est pas affectée par le repliement du site *attC* (Jacquier et al., 2009).

4.2. Régulation traductionnelle

Il a été démontré que des mutations au niveau du site *attC* engendrant une déstabilisation de la structure secondaire, augmentaient l'expression des gènes en 3' au niveau traductionnel plutôt qu'au niveau transcriptionnel (Jacquier et al., 2009). Les auteurs suggèrent que la structure tige boucle du site *attC* empêcherait la progression du ribosome sur le transcrit et par conséquent entraînerait l'interruption de la traduction, ce qui pourrait expliquer l'expression graduelle des cassettes de gène (Jacquier et al., 2009). Il a été aussi établi que la présence au sein du site *attC* d'un cadre ouvert de lecture traduirait augmenterait la traduction du gène en aval, en favorisant la déstabilisation du site *attC* au niveau du transcrit facilitant la progression du ribosome (Jacquier et al., 2009). L'expression des cassettes de gène peut-être aussi influencée par la présence ou l'absence d'une région TIR (translation initiation region) correspondant à un site de fixation du ribosome (RBS) associé à un codon d'initiation de la traduction. Jacquier *et al.* ont aussi montré que 80% des cassettes de gène présentes dans la base de données GenBank possédaient une région TIR (Jacquier et al., 2009). Chez les IR1, il existe une petite orf appelée *orf11* précédée par un RBS fonctionnel se trouvant dans le site *attI1*. Ce RBS est présent dans tous les transcrits générés à partir du promoteur *Pc*, il permet d'améliorer l'expression des cassettes de gène dépourvues de leur propre RBS (Hanau-Berçot et al., 2002).

5. Régulation de l'expression de l'intégrase d'intégron

La transcription du gène de l'intégrase se fait à partir du promoteur P_{intI} qui est orienté en sens inverse du promoteur des cassettes P_c (Figure 1). Plusieurs régulations de l'expression de l'intégrase d'intégron ont été mises en évidence.

5.1. Régulation par la réponse SOS

L'alignement des séquences promotrices des intégrases d'intégrons de résistance de classe 1, 2, 3 et 5 et des intégrases d'intégrons sédentaires chromosomiques (ISCs) chez différentes espèces du genre *Vibrio*, a permis de mettre en évidence l'existence d'un site de fixation de la protéine LexA (boîte LexA) chevauchant la boîte -10 du promoteur P_{intI1} (Figure 9A) (Guerin et al., 2009). LexA est le répresseur transcriptionnel de la réponse SOS, une réponse mise en place par la bactérie lorsque l'ADN est endommagé (La réponse SOS sera abordée dans le chapitre III) (Erill et al., 2007). L'étude de Guérin *et al.* a démontré expérimentalement la régulation de l'intégrase d'intégrons par la réponse SOS : l'utilisation de différents antibiotiques, connus pour induire la réponse SOS (mitomycine, ciprofloxacine et triméthoprime), induit l'augmentation de (i) l'expression de l'intégrase *intI*A chez *V. cholerae* de 37 fois et celle de l'intégrase *intI1* chez *E. coli* de 4,5 fois et (ii) l'activité d'excision de 340 fois pour IntI_A et 141 fois pour IntI₁ (Guerin et al., 2009). Le site de fixation de la protéine LexA est déstructuré lorsque le second promoteur des cassettes P₂ est présent chez les IR1, résultant en une intégrase dont l'expression est constitutive (Figure 9B) (Collis and Hall, 1995; Guérin et al., 2011).

Une analyse *in silico* a démontré la présence d'une boîte LexA potentielle au sein de 624/1103 régions promotrices d'intégrases d'intégrons, soit une fréquence de 56,6%, montrant que ce motif est bien conservé chez les intégrons. Les auteurs ont aussi démontré une corrélation significative entre l'absence de boîte LexA dans la région promotrice de l'intégrase et la perte de fonctionnalité de l'intégrase, suggérant un effet délétère potentiel de l'intégrase lorsque son expression n'est pas régulée (Cambray et al., 2011). Cette observation a ensuite été validée par plusieurs études. Lacotte *et al.* ont en effet montré que bien que les IR1 soient

des structures peu coûteuses chez *E. coli*, leur coût biologique augmente de 2 fois quand l'expression de l'intégrase n'est plus réprimée par LexA (Lacotte et al., 2017). La plupart des IR2 possèdent une intégrase tronquée donc non fonctionnelle, et de façon intéressante, il a été montré que l'expression du gène *intl2* n'est pas régulée par la réponse SOS, malgré la présence d'un site putatif pour la fixation de la protéine LexA (Jové et al., 2017). Il existe néanmoins de rares cas où les IR2 portent une intégrase active ; la rareté de ces intégrons pourrait être expliquée par un coût biologique élevé lié à l'expression de l'intégrase en absence de régulation par la réponse SOS (Jové et al., 2017). Chez le genre *Acinetobacter* qui est dépourvu du répresseur LexA, Starikova *et al.* ont montré que l'acquisition d'un IR1 diminue fortement le « fitness » de *A. bayli* et que des mutations induisant un décalage du cadre de lecture émergent rapidement pour inactiver la protéine Intl1 réduisant ainsi son coût biologique (Starikova et al., 2012). Les auteurs proposent que le coût biologique de l'intégrase soit la conséquence de recombinaisons non spécifiques qu'elle catalyserait avec des sites secondaires très prévalents chez *A. bayli*, entraînant une instabilité génomique (Harms et al., 2013; Starikova et al., 2012). De plus, une analyse *in silico* de 1021 intégrases d'IR1 présentes chez différentes bactéries hôtes, a révélé que *A. baumannii* présente le taux le plus élevé d'intégrases tronquées, de l'ordre de 43,3% (Couvé-Deacon et al., 2019).

La répression de l'expression de l'intégrase d'intégrons par la réponse SOS permettrait à la bactérie de limiter le coût biologique des intégrons au prix de leur activité de recombinaison. En absence de stress, l'intégrase est réprimée et les réarrangements de réseaux limités. La régulation SOS permettrait à la bactérie une « adaptation à la demande » soit par acquisition de nouveau gène de résistance soit par réarrangement du réseau existant ; uniquement quand celle-ci est confrontée à un stress induisant la réponse SOS. De façon intéressante, plusieurs antibiotiques sont connus pour induire la réponse SOS tels que les quinolones et le triméthoprim en ciblant les étapes de réplication de l'ADN et synthèse des nucléotides respectivement, mais aussi les aminosides et les β -lactamines, dont l'action n'engendre pas de dommages à l'ADN habituellement (Escudero* et al., 2015). Dans ce contexte, l'étude de Hocquet et al. a décrit que le traitement d'un patient par ceftazidime et

métronidazole (un antibiotique connu pour induire la réponse SOS) a conduit à l'excision d'une cassette de gène d'un IR1 chez *Pseudomonas aeruginosa* permettant ainsi l'expression de la cassette du gène en aval qui codait une β -lactamase (Hocquet et al., 2012). Une étude *in vitro* a montré que seul le métronidazole était à l'origine du réarrangement du réseau de cassettes, les auteurs suggèrent que la ceftazidime a ensuite permis la sélection de la souche avec l'intégron réarrangé (Hocquet et al., 2012).

Il a aussi été montré que la réponse SOS peut être induite par des mécanismes de transfert horizontal de gènes (THG) tels que la transformation et la conjugaison, source importante d'ADN simple brin (Baharoglu et al., 2012, 2010). Par conséquent, l'induction de la réponse SOS par THG apporte un double avantage pour la bactérie, elle lui permet d'activer l'expression de l'intégrase et lui fournit un potentiel substrat (ADN simple brin) pour la capture de nouvelles cassettes (Escudero* et al., 2015).

5.2. Autres régulations

En plus de la régulation par la réponse SOS, il a été suggéré que deux protéines associées au nucléoïde, HNS (Histone-like Nucleoid Structuring protein) et FIS (Factor for Inversion Stimulation), réprimerait l'expression du gène de l'intégrase de classe *intl1* (Cagle et al., 2011). De plus, chez *V. cholerae*, un site de fixation de la protéine CRP (cAMP receptor protein), régulateur majeur de la répression catabolique, a été identifié au sein de la région promotrice de l'intégrase *IntIA* entre son promoteur *PintIA* et *Pc*; des expériences *in vitro* ont confirmé que CRP contrôlait bien l'expression de *intlA* indépendamment de la réponse SOS (Baharoglu et al., 2012).

5.3. Interférence transcriptionnelle

Chez les intégrons de résistance de classe 1, les deux promoteurs *PintI1* et *Pc*, se trouvent l'un en face de l'autre (Figure 1), suggérant l'existence potentielle d'une interférence transcriptionnelle des promoteurs entre eux. Guérin *et al* ont étudié l'impact des différents variants de *Pc* sur l'activité de *PintI1* et vice-versa, et ont montré que seul le variant fort du promoteur *Pc*, *PcS*, avait un effet négatif sur le niveau d'activité du promoteur *PintI1* de

l'intégrase, même lorsque le site de fixation du répresseur LexA était inactivé i.e. quand l'activité de Pintl1 était constitutive (Guérin et al., 2011). Cette étude montre qu'il existerait une sorte de compromis entre l'expression des gènes codés par les cassettes et l'expression de l'intégrase permettant leur capture (Guérin et al., 2011). Cette régulation va dans le sens de l'équilibre observé entre force du promoteur Pc et efficacité de recombinaison de l'intégrase : plus le Pc est fort moins l'intégrase est efficace (Jove et al. 2010 ; section 4.1 de ce chapitre). Plusieurs études ont montré la forte prévalence du variant faible de Pc (PcW) chez des isolats cliniques et environnementaux suggérant que la plasticité du réseau de cassette est plus importante que le niveau d'expression des cassettes de gène (Escudero et al., 2018; Moura et al., 2012; Vinué et al., 2011).

5.4. Régulation biofilm-spécifique

Dans les écosystèmes naturels, le mode de vie privilégié des bactéries est le biofilm (ce dernier sera développé dans le chapitre II). Plusieurs caractéristiques du biofilm suggèrent qu'il pourrait être un environnement favorable à l'expression de *intl1* : (i) sa récalcitrance vis-à-vis des antibiotiques, (ii) une expression élevée de gènes de réponse au stress et (iii) sa densité favorisant l'échange d'ADN entre les bactéries. Strugeon *et al.* ont donc étudié l'expression de l'intégrase en biofilm. Ils ont ainsi mis en évidence que le niveau d'expression basal de *intl1* était augmenté de plus de 2 fois en biofilm par rapport à des conditions de culture planctonique, et que cette augmentation était corrélée à une augmentation de son activité recombinase (excision) indiquant que le biofilm est un milieu propice pour l'échange de cassettes de résistance (Strugeon et al., 2016). Cette étude a aussi examiné l'implication de différents régulateurs de stress globaux dans l'induction de l'expression de *intl1* en biofilm et a montré que RelA et SpoT, régulateurs de la réponse stringente (réponse à des carences en nutriment, elle sera développée dans le chapitre IV), et la protéase Lon, régulaient l'expression de *intl1* en biofilm. Le modèle de régulation suivant a été proposé : lors de carences nutritives, RelA et SpoT synthétisent l'alarmone (p)ppGpp qui va agir à deux niveaux pour induire l'expression de l'intégrase : (i) par inhibition de l'initiation de la transcription et de la

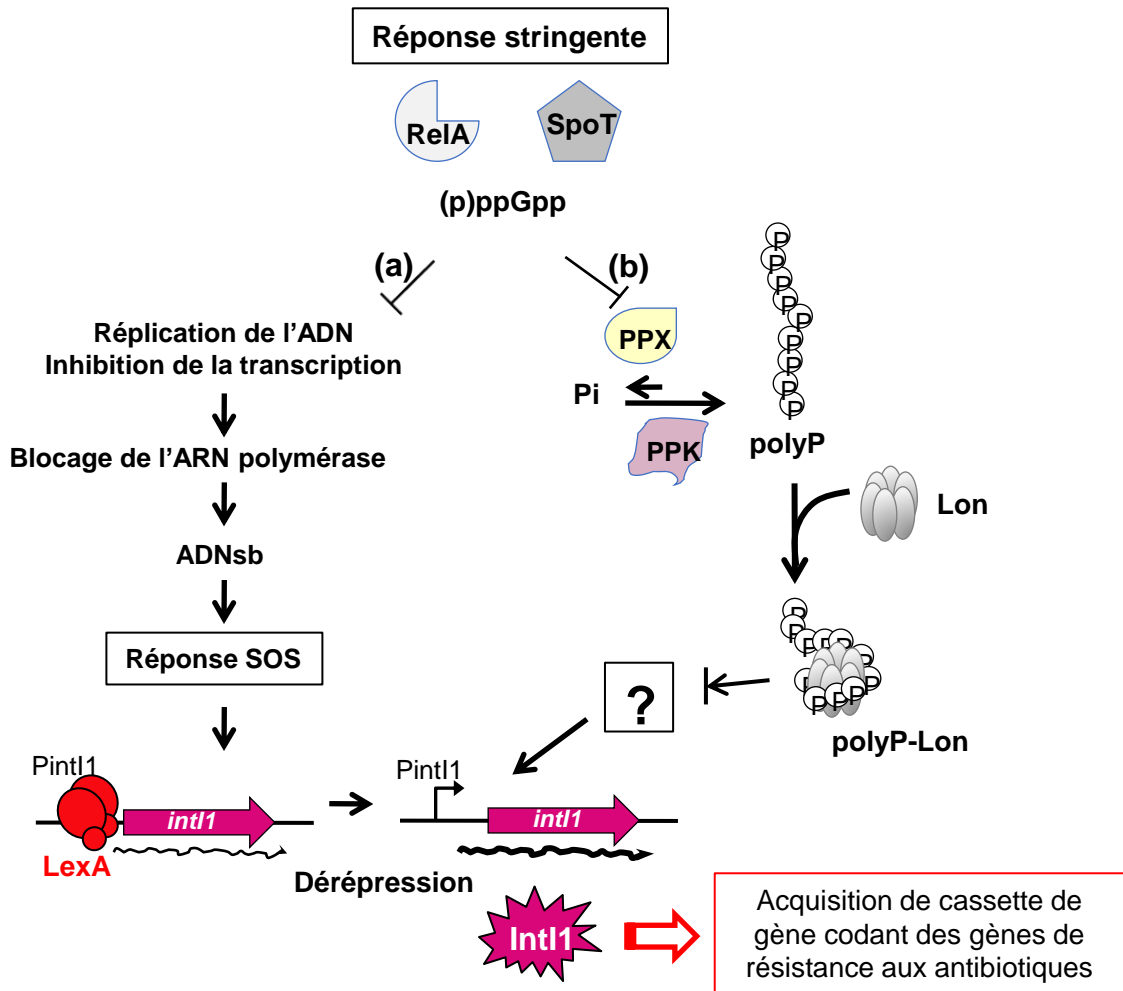


Figure 10 : Modèle proposé pour la régulation de l'expression de l'intégrase *int11* par la réponse stringente en biofilm

En biofilms, lors d'une privation en nutriments, l'alarmone (p)ppGpp, synthétisée par les protéines RelA et SpoT (a) inhiberait l'initiation de la réplication et la transcription de gènes spécifiques, bloquant ainsi l'ARN polymérase et conduisant à la génération d'ADN simple brin (ADNsbs). La conséquence serait une légère induction de la réponse SOS, entraînant l'autoprotéolyse de la protéine LexA liée au promoteur Pint1 et l'expression de *int11*; (b) inhiberait l'activité exopolyphosphatase (PPX), entraînant l'accumulation de polyphosphate inorganique (poly-P) par l'intermédiaire de la polyphosphate kinase (PPK). Le poly-P se lierait alors à la protéase Lon pour former le complexe poly-P-Lon qui régulerait la dégradation d'un régulateur inconnu du promoteur Pint1 déréprimé. D'après (Strugeon *et al*, 2016).

transcription de certains gènes, bloquant ainsi l'ARN polymérase, ce qui génère de l'ADN simple brin (Gan et al., 2011; Kingston et al., 1981; Krohn and Wagner, 1996) et par conséquent peut induire la réponse SOS (ii) par un mécanisme indépendant de la réponse SOS qui met en jeu la protéase Lon et un autre régulateur encore non identifié (Figure 10) (Strugeon et al., 2016).

Une étude récente portant sur l'expression de l'intégrase *intl1* dans un modèle *in vivo* murin menée au laboratoire, a révélé que (i) le niveau d'expression basal de l'intégrase *intl1* dans le tractus digestif était 7,6 fois supérieur à celui en culture planctonique ; (ii) cette expression reste toujours sous le contrôle de la réponse SOS *in vivo* ; (iii) une concentration sub-inhibitrice de ciprofloxacine induit *in vivo* une augmentation du niveau d'expression de la réponse SOS (avec retour progressif au niveau basal) et du niveau d'activité de Intl1 (thèse Murielle Baltazar, Université de Limoges, 2016). Cette étude indique donc que le tube digestif (dans lequel les bactéries vivent sous forme de biofilm) est un environnement favorable à l'acquisition et l'échange de cassettes de gène via les intégrons.

6. Les différents types d'intégrons

6.1. Les intégrons de résistances (IR)

6.1.1. Les intégrons de résistance de classe 1 (IR 1)

Les IR1 jouent un rôle essentiel dans la dissémination de l'antibiorésistance, c'est la classe d'intégron la plus décrite en clinique et du fait de leur prévalence, les plus étudiés. La base de données « INTEGRALL » qui répertorie les intégrons et les annote, compte plus de 6000 séquences d'IR1 à ce jour (juin 2021 ; <http://integrall.bio.ua.pt>) (Moura et al., 2009). Ils sont essentiellement trouvés chez les bactéries à Gram négatif (Leverstein-van Hall et al., 2003; Martinez-Freijo et al., 1998). Les IR1 sont souvent associés au transposon Tn402 lui-même souvent porté par une autre famille de transposon Tn3 (Tn21, Tn1696) assurant ainsi leur dissémination (Mazel, 2006). En aval du réseau de cassettes, les IR1 possèdent une région appelée segment conservé 3' (3'CS), elle est constituée d'un gène *qacEΔ1* conférant

la résistance aux ammoniums quaternaires suivi d'un gène *sul1* codant la résistance aux sulfamides et d'un cadre ouvert de lecture *orf5* codant une protéine de fonction inconnue (Partridge et al., 2009). Bien que considérée comme une région conservée des IR1, certains auteurs considèrent que l'utilisation de la région 3'CS pour détecter la présence d'IR1 peut entraîner des faux négatifs car cette région est parfois incomplète ou absente (Betteridge et al., 2011).

Le réseau de cassettes des IR1 est très dynamique, plus de 174 gènes conférant la résistance aux antibiotiques et environ 200 gènes de fonction inconnue ont été décrits. Les cassettes codant des gènes de résistance pour les aminoglycosides (*aad* et *aac*) et pour le triméthoprim (*dfr*) sont les plus retrouvées (<http://integrall.bio.ua.pt>).

6.1.2. Les intégrons de résistance de classe 2 (IR 2)

Les IR 2 sont souvent décrits en clinique mais leur prévalence reste beaucoup moins importante que celles des IR 1. Ils sont quasi exclusivement associés au transposon Tn7 et ses dérivés, leur assurant une mobilité importante (Hansson et al., 2002). Le gène *intl2* code pour une protéine de 325 aa, Intl2, mais la majorité des gènes *intl2* codent pour une intégrase présentant une mutation non-sens en position 179 (TAA) donnant lieu à une protéine Intl2 tronquée, non fonctionnelle de 178 aa (Hansson et al., 2002). L'intégrase Intl2 partage moins de 50 % d'identité avec Intl1 (Hall et al., 1999). Le réseau de cassettes des IR2 est très stable et se compose en général des cassettes de gène : *dfrA1* (résistance au triméthoprim), *sat2* (résistance à la streptothricine), *aadA1* (résistance à la spectinomycine et à la streptomycine) et *orfX* aussi appelée *ybeA* (protéine de fonction inconnue) (Hansson et al., 2002). La faible diversité des réseaux de cassettes des IR2 peut être expliquée par la forte prévalence de gènes *intl2* dont la séquence codante est interrompue par un codon stop. Une étude a aussi montré que les rares intégrases Intl2 actives étaient associées à des promoteurs de cassettes faibles, à l'inverse les intégrases inactives étaient associées à des promoteurs de cassette forts, montrant une corrélation inverse entre activité de l'intégrase et l'expression des cassettes (Jové et al., 2017) un phénomène analogue à celui décrit chez les IR1 (Jové et al.,

2010) (voir section 4.1 de ce chapitre). L'activité de recombinaison de *IntI2* a été démontrée après substitution du codon stop par un triplet GAG codant un acide glutamique permettant la production d'une intégrase fonctionnelle (Hansson et al., 2002). Quelques années plus tard, des IR2 avec une intégrase *IntI2* ayant une séquence fonctionnelle ont été décrits. Le premier chez une souche de *Providencia stuartii* isolée de fèces de bovin, contenant un gène *intl2* sans codon stop associé à un réseau de cassettes contenant 9 cassettes de gène de fonction inconnue ; il s'agissait aussi du premier cas décrivant un IR2 ne portant aucun gène de résistance aux antibiotiques (Barlow and Gobius, 2006). Un autre IR2 dont l'intégrase semble fonctionnelle a été identifié chez des souches isolées de patients atteints d'infection urinaire en Uruguay avec un réseau de cassettes atypique : une cassette *dfrA14* habituellement retrouvée chez les IR1 et une nouvelle cassette de gène qui coderait pour une putative « peptidase lipoprotéine signal » (Márquez et al., 2008). En 2014, l'analyse d'une collection de souches cliniques de *Proteus* (*P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. penneri*) isolées dans un hôpital chinois a montré que 66% (101/153) des souches portaient un IR2 (Wei et al., 2014). Chez 38 de ces souches, un nouvel IR2 a été identifié avec une intégrase fonctionnelle et un réseau de cassettes contenant le gène *dfrA14* et trois cassettes de gène de fonction inconnue (Wei et al., 2014). Plus récemment, une souche de *Morganella morganii*, qui appartient au genre *Proteae*, a été isolée au laboratoire. Cette souche portait un IR 2 avec une intégrase active associée à une nouvelle cassette de gène codant un nouvel allèle de *dfrA1* (Mendes Moreira et al., 2019). Les résultats de cette étude indiquaient que le genre *Proteae* serait un réservoir important d'IR2 (Mendes Moreira et al., 2019). Comme on peut le voir, lorsqu'un IR2 contient une intégrase fonctionnelle, le réseau de cassettes est différent de celui couramment retrouvé chez les IR2 dont l'intégrase est tronquée. Ces nouveaux réseaux de cassettes d'IR2 combinent des cassettes de gène appartenant à des IR1 et IR2, suggèrent des échanges de cassettes de gènes entre IR1 et IR2 qui sont souvent retrouvés dans les mêmes isolats (Mendes Moreira et al., 2019).

6.1.3. Les intégrons de résistance de classe 3 (IR 3)

Les IR3 sont très peu décrits dans la littérature (32 publications). Ils sont essentiellement retrouvés dans des échantillons issus de l'environnement (Stalder et al., 2014). L'intégrase *IntI3* partage plus de 50% d'identité avec *IntI1* (Table 1) (Hall et al., 1999). Comme les IR1, ils sont souvent associés au transposon *Tn402* (Collis et al., 2002a; Xu et al., 2007). La première description d'un IR3 remonte à 1995 au Japon chez une souche de *Serratia marcescens*, son réseau de cassette était composé de deux cassettes de gène: *bla_{IMP-1}* et *aac(6')-Ib* conférant une résistance aux carbapénèmes et aux aminoglycosides respectivement (Arakawa et al., 1995). Il a été démontré que l'intégrase *IntI3* est fonctionnelle et qu'elle est capable de catalyser des réactions d'intégration et d'excision (elle aussi capable de catalyser des recombinaisons avec des sites secondaires) (Collis et al., 2002a; Hall et al., 1999). Deux promoteurs putatifs *PintI3* (1) et *PintI3* (2) pour l'expression de l'intégrase *intl3* et 4 variants du promoteur *PintI3*(1) ont été décrits (Collis et al., 2002b; Simo Tchuinte et al., 2016), mais une doctorante au laboratoire a montré que seul le promoteur *PintI3* (1) était capable d'assurer l'expression du gène *intl3* (Thèse Pierrette Tchuinte, Université de Limoges, 2016). Elle a aussi montré que la protéine LexA se fixait à la boîte LexA présente dans le promoteur *PintI3* (1) indiquant que l'expression de *intl3* serait régulée par la réponse SOS (Thèse Pierrette Tchuinte, Université de Limoges, 2016).

Les réseaux de cassettes des IR3 sont essentiellement composés de gènes codant une résistance aux β -lactamines et aux aminosides (<http://integrall.bio.ua.pt>). L'impact clinique des IR3 est très faible car très peu de cas ont été rapportés (Correia et al., 2003; Papagiannitsis et al., 2015; Pavelkovich et al., 2014; Poirel et al., 2010). Cependant, des études montrent que les IR3 sont particulièrement présents dans l'environnement (Jones-Dias et al., 2016; Moura et al., 2010; Stalder et al., 2014; Valdezate et al., 2015; Xu et al., 2007). Ils semblent jouer un rôle dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques d'intérêt clinique, notamment des gènes d'oxcillinase, dans l'environnement (Simo Tchuinte et al., 2016).

6.1.4. Les intégrons de résistance de classe 4 (IR 4), 5 (IR 5) et 6 (IR6)

Le premier IR4 a été identifié chez *V. cholerae*, localisé sur le chromosome au sein d'un élément intégratif et conjugatif (ICE). Son réseau de cassettes était composé d'une cassette de gène de type *dfp* conférant la résistance au triméthoprim et 4 cassettes de gène de fonction inconnue (Hochhut et al., 2001). Depuis 8 autres IR4 ont été identifiés chez des souches de *V. cholerae* (<http://integrall.bio.ua.pt>)

De même, le premier IR5 a été décrit chez une souche de *Vibrio salmonicida*, il était associé au plasmide pRSV1 et contenait une cassette de gène de type *dfp* (résistance au triméthoprim) (numéro d'accès Genbank : AJ277063.1). Deux autres IR5 sont répertoriés dans la base de données Integrall, un chez *Enterobacter hormaechei* et un chez *V. mimicus*.

Au laboratoire, Thomas Jové (curateur de la base de données Integrall) a identifié dans le génome d'une souche clinique d'*E. coli* isolée au Pérou (Tamariz et al., 2018) une nouvelle classe d'intégron fonctionnelle et qu'il a baptisé classe 6. Cet intégron contient 9 cassettes de gène dont 3 codant des résistances aux antibiotiques et 6 de fonction inconnue (Jové, 2021). Depuis, il a identifié 14 IR6 potentiels dans la GenBank.

6.2. Les intégrons sédentaires chromosomiques (ISC)

Le premier ISC a été décrit en 1998 sur le chromosome 2 du génome de *V. cholerae*, il comportait une intégrase *VchIntIA* semblable aux intégrases portées par les IRs (Heidelberg et al., 2000; Mazel et al., 1998). Trois caractéristiques différenciaient cet intégron des IRs : (i) il était localisé sur le chromosome, (ii) il possédait un nombre important de cassettes de gène et (iii) les sites *attC* des cassettes présentaient plus 80% d'identité entre eux (Mazel et al., 1998). Aujourd'hui, les ISCs sont décrits comme partie intégrante des génomes de plusieurs γ -protéobactéries (Vibrionaceae, Xanthomonadaceae, Pseudomonadaceae...), β -protéobactérie et δ -Protéobactérie (Mazel, 2006). Les ISCs ont été largement étudiés chez le genre *Vibrio*, leurs réseaux de cassettes comportent généralement entre 39 et 219 cassettes et ils représentent entre 0,7% et 3,1% du génome des souches qui les portent (Gillings, 2014). Les cassettes de gène portées par les ISCs codent généralement pour des protéines de

fonction inconnue, néanmoins il a été décrit chez des souches de *Vibrio* des cassettes impliquées dans des fonctions métaboliques ou encore dans la virulence (Barker et al., 1994; Ogawa and Takeda, 1993) et quelques rares cas de cassettes conférant une résistance aux antibiotiques (Mazel, 2006). De façon intéressante, les ISC's portent plusieurs cassettes de gène codant des systèmes Toxines-antitoxines (TA) possédant leurs propres promoteurs. Il semblerait que ses systèmes TA jouent un rôle important dans le maintien du large réseau de cassettes chez les ISC's car leur perte aurait un effet délétère pour le génome de la bactérie. Une comparaison des cassettes de gène entre différentes espèces du genre *Vibrio* a aussi montré que la majorité des cassettes sont spécifiques de leurs hôtes (Mazel, 2006).

7. Epidémiologie des intégrons de résistance

Les IRs constituent aujourd'hui un acteur majeur de la dissémination de la résistance aux antibiotiques (Leverstein-van Hall et al., 2003). Ils sont particulièrement retrouvés chez les bactéries à Gram négatifs (BGN), et sont un bon marqueur prédictif de résistance aux antibiotiques chez des patients atteints de septicémie à germes Gram négatifs (Barraud et al., 2014). Les IR1, les plus prévalents, sont identifiés dans 22% à 59% des isolats cliniques de BGN (Deng et al., 2015). Les IR1 sont aussi la première classe impliquée dans la dissémination de gènes de résistance chez les Enterobacteriaceae. Ils ont été décrits dans tous les genres de cette famille, on les retrouve essentiellement chez des bactéries entériques incluant tous les pathogènes comme *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* et *Yersinia* (Kaushik et al., 2018). Les IR2 sont communément décrits chez des souches de *Shigella* (Gassama Sow et al., 2010; Kaushik et al., 2018) ou encore des souches appartenant au genre Proteae (Barlow and Gobius, 2006; Mendes Moreira et al., 2019; Wei et al., 2014). Les IR3 ont rarement été identifiés chez des souches d'origine clinique : *Serratia*, *Klebsiella*, *E. coli*, et on les retrouve essentiellement chez des souches environnementales : *Delftia* et *Enterobacter* (Kaushik et al., 2018; Simo Tchuinte et al., 2016). De plus, les BGNs non fermentaires comme *Acinetobacter baumannii* (Pagano et al., 2016) et *Pseudomonas aeruginosa* (Botelho et al., 2019) sont des hôtes fréquents d'intégrons. Les IRs ont été rapportés aussi dans d'autres

BGNs comme *Stenotrophomonas* (Barbolla et al., 2004), *Vibrio* (Rajpara et al., 2009), *Campylobacter* (Lee et al., 2002) et *Aeromonas* (Barraud et al., 2020).

Les IRs sont très peu décrits chez les bactéries à Gram positif (BGP). Ils ont été identifiés pour la première fois dans une souche de *Mycobacterium fortuitum* (Martin et al., 1990), et ont ensuite été essentiellement retrouvés chez des BGP avec un pourcentage en GC élevé : *Corynebacterium* (Barraud et al., 2011; Nesvera et al., 1998), *Arthrobacter* (Agersø and Sandvang, 2005), *Arcanobacterium* (Liu et al., 2009) et *Actinotignum* (Barraud et al., 2016).

7.1. Chez l'homme

De nombreuses études ont décrit les IRs dans différents isolats bactériens provenant de différents types de prélèvements biologiques. De plus en plus d'études soulignent une forte prévalence des intégrons chez des bactéries commensales de la flore intestinale (Bailey et al., 2010; Copur-Cicek et al., 2014; Kheiri and Akhtari, 2016). Une étude récente a estimé un taux de portage digestif d'IRs de 43.8% (majoritairement des IR1) chez des sujets sains et de 52.7 % chez des patients d'unité de soins intensifs (Chainier et al., 2017). D'autres études s'intéressant à la colonisation du tractus digestif chez les nouveaux nés par des bactéries porteuses d'intégrons, ont rapporté que l'acquisition de ces bactéries se fait très rapidement après la naissance, dès la première semaine (Barraud et al., 2018; Ravi et al., 2015).

7.2. Chez l'animal

Les différentes classes d'intégrons, essentiellement IR1 et IR2 ont été rapportées chez des bactéries pathogènes ou commensales animales (Cocchi et al., 2007; Kaushik et al., 2018). De plus, une étude a montré une corrélation positive entre la prévalence d'IR1 chez les animaux et l'activité humaine (Skurnik et al., 2006). Les IR1 et IR2 sont retrouvés particulièrement chez des animaux d'élevage (bovins, porcins, ovins, volailles, poissons), mais aussi chez des animaux de compagnies comme les chiens et les chats (Cocchi et al., 2007; Goldstein et al., 2001; Zhang et al., 2009). Ils ont aussi été décrits chez des animaux sauvages

tels que des chauves-souris et des manchots (Lundbäck et al., 2021; McDougall et al., 2019). Les IRs chez ces différentes espèces animales sont souvent retrouvés dans des souches de *Salmonella* ou *E. coli* (Kaushik et al., 2018), mais ils ont aussi été décrits chez des BGP (Agersø and Sandvang, 2005; Nandi et al., 2004). De nombreuses études menées dans plusieurs pays ont aussi révélé la présence d'IRs dans de la viande destinée à la vente (Abdel-Rhman, 2020; Meng et al., 2011; Miko et al., 2005; Soufi et al., 2009; White et al., 2001). Cette observation est très inquiétante car elle sous-entend un réel risque de transfert de gènes de résistance de l'animal au consommateur. Il devient très urgent de rationaliser l'utilisation des antibiotiques chez les animaux et d'intensifier la surveillance des viandes mises sur le marché.

7.3. Dans l'environnement

L'environnement joue un rôle important dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Les IRs ont été décrits dans différents écosystèmes terrestres et aquatiques (lacs, rivières, estuaires) (Stalder et al., 2012). La prévalence des intégrons dans les sols est quant à elle peu documentée ; une étude sur des sols agricoles non traités a révélé une prévalence d'IR1 de l'ordre de 0,0036%, avec une augmentation de celle-ci lorsque le sol était traité par des biocides (Gaze et al., 2011). Une étude récente a analysé des échantillons de sols provenant d'Australie et d'Antarctique et a rapporté la présence de 4 000 à 18 000 cassettes de gène par 0,3 g de sol (Ghaly et al., 2019).

La prévalence des IRs dans les milieux aquatiques naturels est estimée entre 1 % et 25 % selon les études (Dolejská et al., 2009; Gillings et al., 2008; Laroche et al., 2009). Elle a été aussi largement documentée dans les effluents, où les IRs sont retrouvés plus particulièrement dans les effluents hospitaliers en comparaison aux effluents urbains (Buelow et al., 2020; Stalder et al., 2014). La plupart des cassettes de gène trouvées dans les effluents de l'hôpital confèrent une résistance aux antibiotiques fréquemment utilisés en milieu hospitalier, ce qui suggère que la pression de sélection antibiotiques aide à maintenir les bactéries portant des IRs dans les effluents (Buelow et al., 2020; Stalder et al., 2014). Cependant, l'impact des effluents hospitaliers sur la dissémination des IRs dans

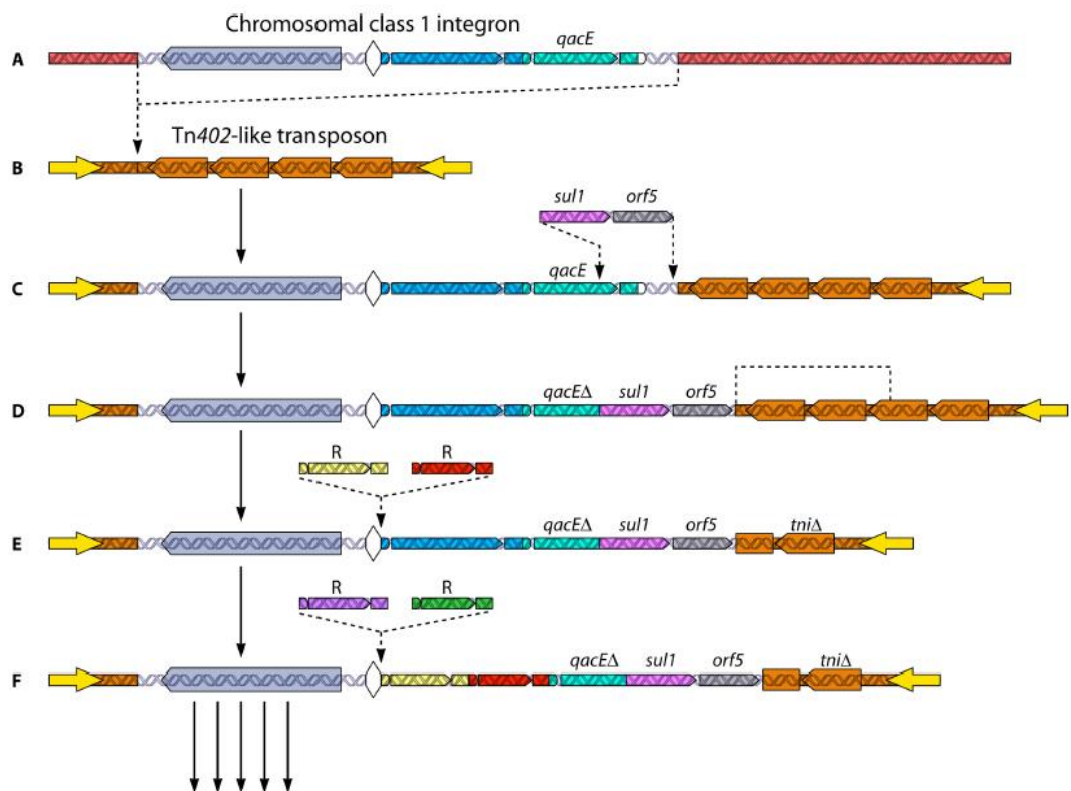


Figure 11 : Modèle illustrant l'origine des intégrons de classe 1

- A. L'ancêtre commun de tous les intégrons clinique de classe 1 aurait été situé sur le chromosome des β -protéobactéries.
- B. Cet intégron de classe 1 chromosomique a été capturé par le transposon Tn402.
- C. Création d'un transposon/intégron hybride portant la cassette *qacE*, codant pour la résistance aux désinfectants
- D. Un gène de résistance aux sulfonamides, *sul1*, une cassette *orf5*, ont ensuite été capturés, supprimant une partie de la cassette *qacE*, générant ainsi le segment 3' conservé (3'CS).
- E. Des délétions et des insertions au sein du module *tni* ont rendu le Tn402 non fonctionnel. Au même moment, l'acquisition d'autres cassettes de résistance aux antibiotiques a eu lieu élargissant ainsi la gamme des phénotypes de résistance aux antibiotiques conférés par les intégrons.
- F. L'acquisition de nouvelles cassettes a continué, et le Tn402-intégron hybride s'est déplacé sur divers plasmides et d'autres transposons, tels que ceux de la famille Tn21. Ces événements ont généré encore plus de diversité et accéléré l'insertion des intégrons de classe 1 chez une grande variété de bactéries pathogènes et commensales. D'après (Gillings *et al*, 2014).

l'environnement n'a pas encore été démontré. En effet, la prévalence des IRs dans l'eau des rivières après déchargement des effluents hospitaliers traités est relativement faible (Buelow et al., 2020; Stalder et al., 2012).

Tout comme chez l'animal, la prévalence des intégrons dans l'environnement a été corrélée avec l'activité humaine (Stalder et al., 2012). Les IRs sont ainsi peu retrouvés dans des zones n'ayant pas eu de contact avec l'homme (Gaze et al., 2005; Gillings et al., 2008; Wright et al., 2008). Dans ce contexte, il a été proposé d'utiliser le gène *intl1* comme indicateur de pollution anthropique car ce gène est (i) relié à des gènes conférant la résistance aux antibiotiques et aux désinfectants, (ii) retrouvé dans une large variété de bactéries pathogènes et non pathogènes, (iii) son abondance peut changer rapidement en réponse aux pressions environnementales et (iv) sa séquence nucléotidique unique chez les différents hôtes permet de le détecter facilement (Gillings et al., 2015).

8. Origine et évolution des intégrons

Il est communément admis que les IRs ont évolué à partir des ISCs (Mazel, 2006). Plusieurs observations et études soutiennent cette hypothèse : (i) les ISCs et les IRs partagent une structure et une organisation similaire, (ii) les ISCs semblent être des entités plus anciennes que les IRs (Mazel, 2006), (iii) certaines cassettes portées par des IR1 possèdent des sites *attC* très similaires à ceux localisés chez des ISCs de *Xanthomonas* et *Vibrio* (Rowe-Magnus et al., 2001) et (iv) l'intégrase *Int1* reconnaît et recombine des sites *attC* de ISCs (Mazel, 2006; Mazel et al., 1998). L'identification d'un intégron de classe 1 chromosomique chez des β -protéobactéries environnementales (Gillings et al., 2008; Stokes et al., 2006) a fait émerger la théorie suivante : des intégrons de classe 1 chromosomiques dérivés d'ISC auraient été capturés par un transposon *Tn402* via une recombinaison site-spécifique générant un transposon-intégron hybride, une série de recombinaisons et délétions aurait ensuite abouti à la formation de la région 3'CS et à l'inactivation de la fonction de transposition du transposon *Tn402* (Figure 11) (Gillings, 2014). L'insertion du transposon-intégron hybride au sein d'autres transposons et plasmides lui aurait permis de disséminer chez une grande

variété d'hôtes. Il a récemment été démontré que cette insertion a eu lieu avant l'inactivation de la fonction de transposition du Tn402 (Ghaly et al., 2017). De plus, Ghaly *et al.* suggèrent que la migration des IR1 de l'environnement à l'homme aurait eu lieu par la voie alimentaire, un transposon-intégron hybride ayant été isolé à partir de jeunes pousses d'épinard (Ghaly et al., 2017). En plus d'être les ancêtres des IRs, les cassettes des ISCs sont aussi considérées comme un réservoir de cassettes pour les IRs. En effet, une étude expérimentale a démontré qu'un IR1 était capable d'intégrer dans sa région variable, une cassette de gène codant un gène de résistance aux antibiotiques provenant d'un ISC hébergé par une souche de *V. cholerae* (Rowe-Magnus et al., 2002).

Un transposon-intégron hybride a été trouvé dans le chromosome d'une souche de *Pseudomonas* provenant d'un échantillon du permafrost sibérien âgé de 15 000 à 40 000 ans ; il portait une cassette de gène *aadA2* codant la résistance streptomycine et spectinomycine (Petrova et al., 2011). Cette découverte montre que des intégrons portant des cassettes codant des gènes de résistance aux antibiotiques sont apparus avant l'ère antibiotique, ce qui contredit la théorie émise par Gillings *et al.* en 2008 sur le fait que l'acquisition des gènes de résistances au sein des intégrons s'est produite lorsque les antibiotiques ont commencé à être largement utilisés en clinique (Gillings et al., 2008).

L'origine des cassettes de gène reste quant à elle l'une des questions majeures dans l'histoire évolutive des IRs, qui demeure, encore aujourd'hui, sans réponse. La seule théorie qui existe à ce jour suggère que les cassettes de gène seraient issues de la rétrotranscription d'un ARNm ; cette hypothèse est basée sur l'absence de promoteur dans la plupart des cassettes de gène (Léon and Roy, 2009; Recchia and Hall, 1997)

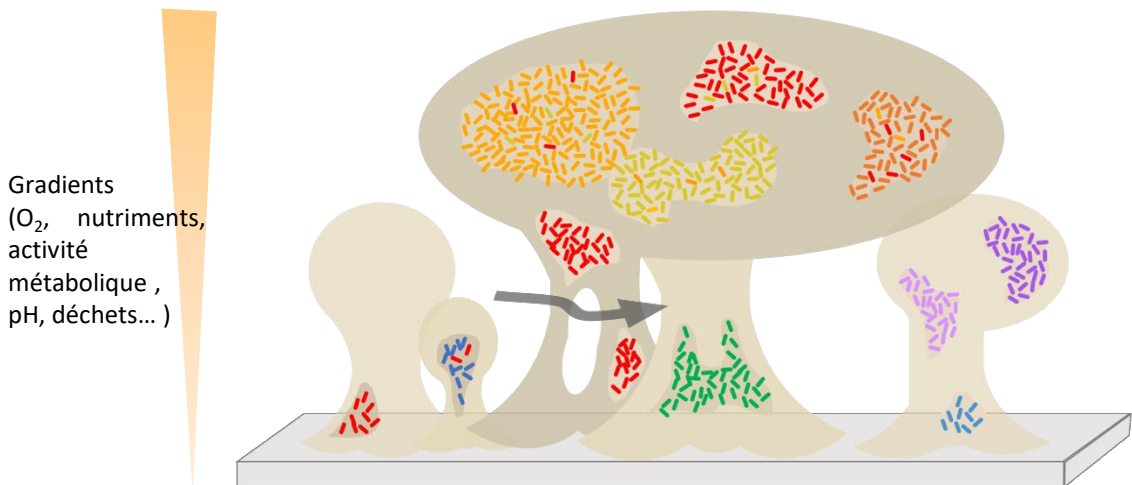


Figure 12 : Représentation schématique de la structure tridimensionnelle d'un biofilm bactérien

Des bactéries dans différents états physiologiques situées dans des microniches du biofilm sont représentées en différentes couleurs. La flèche grise représente le fluide circulant à l'intérieur des canaux hydriques.

Chapitre II. Le biofilm

En 1683, Anthony van Leeuwenhoek en utilisant un microscope de sa fabrication sur des matières provenant du grattage de sa propre surface dentaire, a été le premier à observer et à décrire les biofilms sans le savoir, ce qu'il a appelé « animalcules ». Il déclara alors: « The number of these animalcules in the scurf of a man's teeth are so many that I believe they exceed the number of men in a kingdom. » Ce fut la première déclaration officielle reportant l'existence de biofilm. Il faudra attendre 3 siècles avant d'entendre reparler de biofilm dans la littérature avec Henrici en 1933 et Zobell en 1943. Ce n'est qu'en 1978 que Jean William (Bill) Costerton a observé et décrit des bactéries piégées dans une matrice extracellulaire en utilisant un microscope électronique à transmission et a proposé le terme de « biofilm » pour définir ces communautés microbiennes (Lappin-Scott et al., 2014). Ce fut le début d'une nouvelle ère car jusque-là les chercheurs étudiaient les bactéries de manière isolées en suspension sous forme planctonique (cultures en milieux liquides et agités).

1. Le mode de vie biofilm

1.1. Définition et ubiquité des biofilms

Le biofilm est une communauté de microorganismes attachés à une surface et entre eux, englobés dans une matrice extra cellulaire auto-produite (Costerton et al., 1978). La matrice extracellulaire est composée de polysaccharides, d'ADN extracellulaire, de protéines, de lipides et d'eau. Le biofilm présente une architecture complexe formée de structures tridimensionnelles hétérogènes, dans lesquelles les agrégats de microorganismes sont séparés par des espaces libres, dépourvus de bactéries et parcourus par des courants aqueux (Figure 12). Ces « canaux hydriques » sont essentiels pour la circulation des fluides à l'intérieur du biofilm et permettent l'apport en nutriments et en oxygène, ainsi que l'évacuation des produits de dégradation (Stewart, 2003). Le biofilm est le mode de vie privilégié des microorganismes dans la nature ; il a été estimé que 80 % de la biomasse microbienne

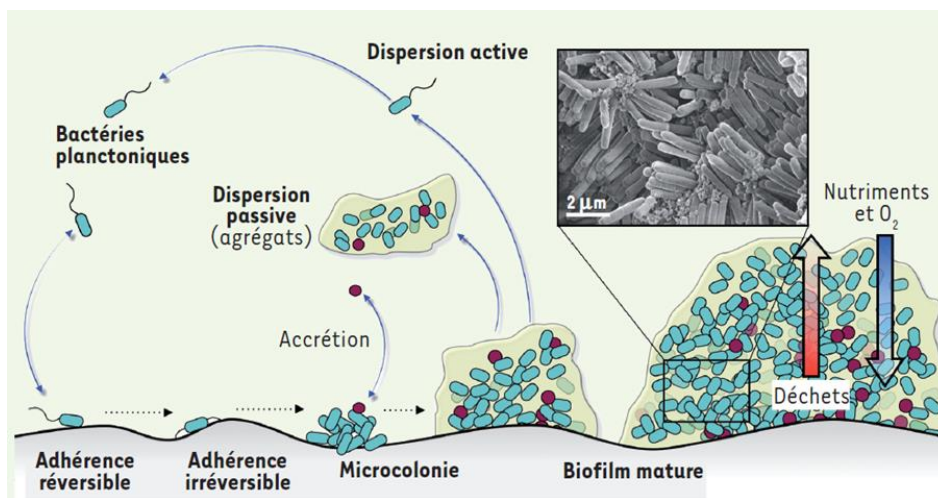


Figure 13 : Développement et structure d'un biofilm bactérien

Après les phases d'adhérence réversible puis irréversible, les bactéries forment une microcolonie dans laquelle elles produisent une matrice extracellulaire (en jaune), qui peut accueillir d'autres espèces microbiennes par accrétion. Le biofilm mature est le site de gradients inverses en nutriments (flèche bleue, concentrations décroissantes de la surface vers la base) et en déchets (flèche rouge) définissant des niches physiques et chimiques. Le biofilm peut se disperser en libérant soit des bactéries mobiles (dispersion active) soit des agrégats bactériens entourés de matrice (dispersion passive). Une photographie de microscopie électronique d'un biofilm d'*E. coli* développé *in vivo* sur cathéter est présentée en insert (© Benjamin Le Quéré, unité de génétique des biofilms, institut Pasteur et Brigitte Arbeille et Claude Lebos, LBCME, Faculté de médecine de Tours). D'après (Lebeaux et Ghigo, 2012).

Table 2 : Déterminants de surface impliqués dans la formation de biofilm chez *E. coli*
(D'après Van Houdt et Michiels, 2005)

	Etape de développement du biofilm	Déterminants de surface
1	Contact avec la surface et attachement réversible	Flagelle et motilité
2	Attachement irréversible	Fimbriae de type 1
		Curli
3	Formation de microcolonie et développement précoce du biofilm	Polyglucosamine (exopolysaccharides; matrice extracellulaire)
		Curli
		Antigène 43
		Acide colanique (exopolysaccharides ; matrice extracellulaire)
4	Maturation	Polyglucosamine (exopolysaccharides; matrice extracellulaire)
		Acide colanique (exopolysaccharides ; matrice extracellulaire)
		Curli
5	Dispersion	Pili conjugatif
		Flagelle et motilité

terrestre réside sous forme de biofilms (Richards and Melander, 2009). Les bactéries peuvent adhérer à des surfaces biotiques ou abiotiques, et les biofilms sont ainsi retrouvés sur divers types de surfaces telles que des surfaces minérales, végétales, dans des tuyaux de canalisations, sur des dispositifs médicaux,.... Les bactéries font parties de la flore endogène (microbiote) de l'Homme, elles sont retrouvées sous forme de biofilm et jouent un rôle important dans la protection de l'hôte contre les microorganismes pathogènes. On les retrouve aussi à la surface de la peau, dans la bouche (plaque dentaire) ou encore au sein des appareils des grandes fonctions biologiques tel que les systèmes digestif, respiratoire et urogénital.

1.2. Etapes de formation des biofilms

Le passage des bactéries de la forme planctonique à la forme sessile communautaire ou biofilm, est un processus dynamique. Ce passage s'accompagne d'un changement radical de la physiologie et du métabolisme des bactéries, ceci est le résultat d'un profond remaniement du profil d'expression génique (Beloin et al., 2004; Whiteley et al., 2001). De nombreuses études s'accordent pour dire que la di-guanosine monophosphate cyclique (di-GMPc) constitue un messenger secondaire central régulant la transition entre vie planctonique et établissement d'un biofilm (Tolker-Nielsen, 2015). Bien que les mécanismes mis en jeu diffèrent en fonction des espèces et des conditions environnementales, les principaux stades de développement d'un biofilm sont consensuels et se résument en 5 étapes (Figure 13) : (1) attachement initial réversible, (2) attachement irréversible, (3) formation de microcolonie, (4) maturation (structure 3D) et (5) dispersion ou détachement (Lappin-Scott et al., 2014; Lebeaux and Ghigo, 2012; Stoodley et al., 2002). L'état physiologique des bactéries diffère de manière importante en fonction du stade du développement du biofilm (Sauer et al., 2002; Stoodley et al., 2002). Brièvement, les bactéries libres reconnaissent et adhèrent d'abord de façon transitoire la surface qu'elles vont coloniser (attachement initial réversible). Les flagelles, présents chez certaines bactéries comme *E. coli*, favorisent le contact initial des bactéries avec la surface (Beloin et al., 2008) (Table 2). Puis les bactéries se fixent de façon irréversible et spécifique au substrat grâce à des structures de surfaces telles que les pili et les curlis, et

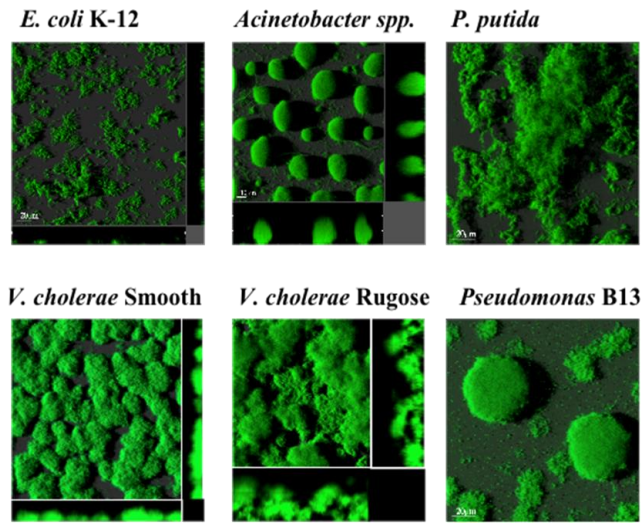


Figure 14 : Différentes architectures de biofilm

Images de microscopie confocale de biofilms de bactéries Gram négatifs cultivés en flow-cell. (from Soeren Molin, DTU Denmark).

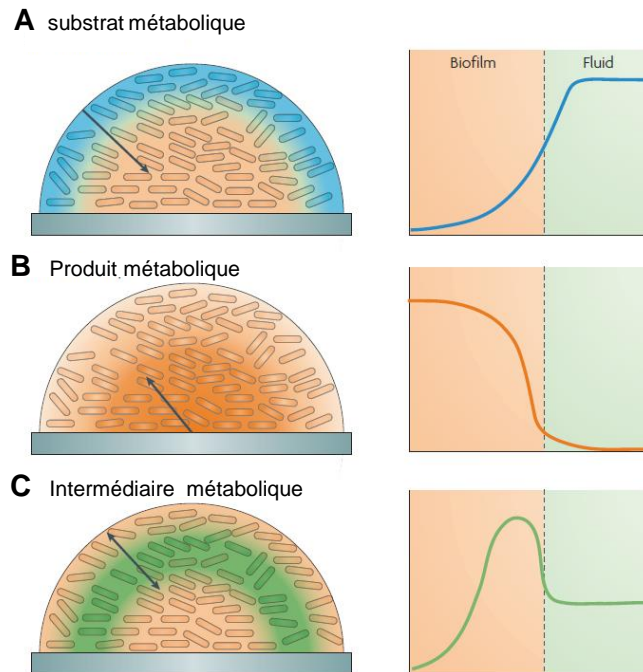


Figure 15 : Hétérogénéité chimique au sein du biofilm

Trois modèles qualitativement distincts d'hétérogénéité chimique apparaissent dans les biofilms en raison des interactions réaction-diffusion pour un substrat métabolique (bleu; **A**), un produit métabolique (orange; **B**) et un intermédiaire métabolique (vert; **C**). La concentration d'un substrat qui est consommé dans le biofilm diminue avec la profondeur dans le biofilm et la distance de la source (**A**). Inversement, un produit métabolique est plus concentré à l'intérieur du biofilm (**B**). Un intermédiaire métabolique qui est à la fois produit et consommé dans le biofilm peut présenter des profils de concentrations maximales locales (**C**). D'après (Stewart et Franklin, 2008).

synthétisent une matrice extracellulaire (Table 2). Cette étape d'attachement irréversible met en jeu des interactions de forte énergie (interactions moléculaires et cellulaires spécifiques) (Van Houdt and Michiels, 2005). Une fois les bactéries solidement attachées à la surface, la croissance du biofilm se poursuit, les bactéries forment alors des microcolonies. La taille de ces dernières augmente par la division cellulaire et la production de la matrice extracellulaire, c'est l'étape de maturation qui aboutit à la structure tridimensionnelle et complexe du biofilm. Le biofilm mature peut avoir différentes structures en fonction de l'espèce bactérienne et des conditions environnementales (Figure 14). Par exemple *P. aeruginosa* développe des biofilms avec des structures dites en « champignon » (Tolker-Nielsen, 2015). Les bactéries vont finalement se détacher du biofilm afin de fuir un environnement défavorable ou bien de coloniser de nouvelles niches. La dispersion des bactéries à partir du biofilm peut être active (les bactéries du biofilm modifient l'expression de leurs gènes afin d'échapper à celui-ci) ou passive (des forces externes appliquées au biofilm provoquent le détachement de petits amas de bactéries du biofilm) (McDougald et al., 2012).

2. Hétérogénéité du biofilm

Le biofilm du fait de sa structure tridimensionnelle complexe est un environnement hétérogène. Stewart et Franklin ont défini trois catégories d'hétérogénéité chimique : (i) hétérogénéité de concentration d'un substrat (exemple : oxygène, nutriments), (ii) hétérogénéité de concentration d'un produit (exemple : déchets) et (iii) hétérogénéité de concentration d'un produit intermédiaire (rejeté dans le milieu puis consommé par d'autres bactéries) (Figure 15). Ces hétérogénéités conduisent ainsi à l'apparition de gradients de différents paramètres tels que la concentration en oxygène, en nutriments, en déchets, le pH... (Stewart and Franklin, 2008). Plusieurs études ont mesuré à l'aide de microélectrodes la concentration en oxygène au sein de biofilms formés par différentes espèces bactériennes et dans différentes conditions environnementales ou expérimentales. Ces études ont montré que la concentration en oxygène est plus élevée à la surface du biofilm et tend à diminuer à l'intérieur de celui-ci jusqu'à devenir nulle (de Beer et al., 1994; Okabe et al., 1999; Pabst et

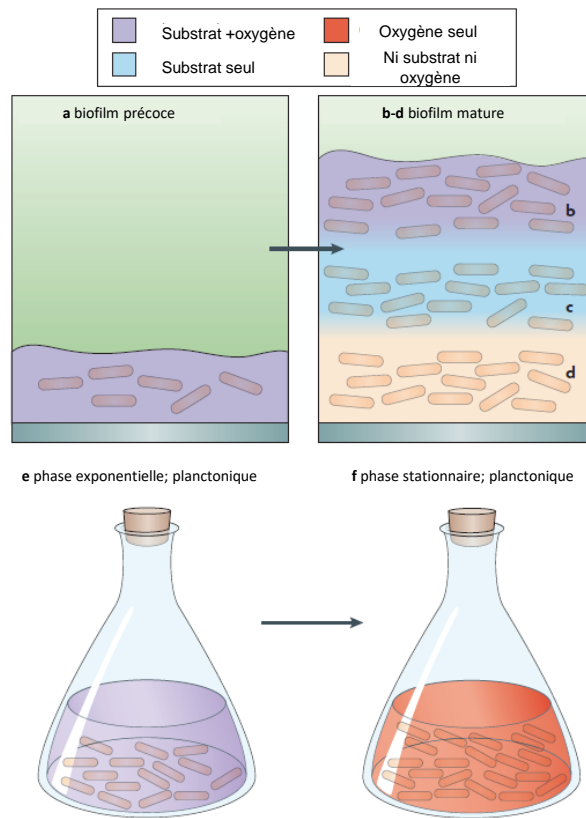


Figure 16 : Les différentes microniches probables au sein d'un biofilm mono-espèce

Un biofilm fin, à un stade précoce de développement (a) est riche en substrats et en oxygène. Dans le biofilm mature, différents environnements peuvent se produire : environnements contenant à la fois substrat et l'oxygène (b), du substrat mais pas d'oxygène (c) et ni substrat, ni oxygène (d). Dans une culture planctonique en phase exponentielle, le substrat et l'oxygène sont tous deux présents (e), alors que dans une culture en phase stationnaire, le substrat peut être épuisé mais l'oxygène reste toujours présent (f). D'après (Stewart et Franklin, 2008).

al., 2016; Ramsing et al., 1993; Rani et al., 2007; Schramm et al., 1996; Wessel et al., 2014; Xu et al., 1998). De même, les bactéries dans les couches profondes du biofilm ont accès à de faibles concentrations de nutriments (Huang et al., 1998; Petroff et al., 2011). La faible concentration en oxygène et nutriments à l'intérieur du biofilm n'est en général pas due à un problème de diffusion, mais plutôt au fait que les bactéries à la surface du biofilm les consomment et par conséquent les bactéries présentes dans les profondeurs ont moins de substrats disponibles (Stewart, 2003; Stewart and Franklin, 2008).

L'hétérogénéité chimique au sein du biofilm résulte en une hétérogénéité physiologique. Les variations environnementales que rencontrent les bactéries au sein du biofilm aboutissent à la formation de microniches. Les bactéries du biofilm ne sont donc pas seulement physiologiquement différentes des bactéries planctoniques, elles peuvent aussi être physiologiquement différentes les unes par rapport aux autres au sein du biofilm. La Figure 16 présente une illustration des différentes microniches et des états physiologiques qui pourraient être retrouvés au sein d'un biofilm mono-espèce formé par des bactéries aérobies facultatives (Stewart and Franklin, 2008). Ainsi, dans un biofilm fin, nouvellement formé, les bactéries ont accès à l'oxygène et aux nutriments en quantité suffisante. Lorsque le biofilm devient mature et adopte sa structure tridimensionnelle, trois microniches distinctes peuvent être anticipées : (i) les bactéries localisées à la surface du biofilm ont toujours accès à l'oxygène et aux nutriments, (ii) l'oxygène étant peu soluble c'est le premier métabolite à être épuisé et par conséquent on retrouve une microniche à l'intérieur du biofilm où les bactéries ont toujours accès aux nutriments mais pas à l'oxygène, et finalement (iii) les bactéries présentes dans les profondeurs du biofilm n'ont accès ni à l'oxygène, ni aux nutriments. Il est intéressant de noter que le biofilm est communément comparé à la culture planctonique en phase stationnaire de croissance (présence d'oxygène et absence de nutriments) alors qu'aucun des états physiologiques du biofilm décrits ci-dessus ne lui correspond (Stewart and Franklin, 2008). Les bactéries au sein des microniches du biofilm vont répondre localement aux conditions qu'elles rencontrent. Plusieurs études menées par l'équipe de Michael Franklin ont montré que l'expression des gènes diffère en fonction de la localisation des bactéries dans

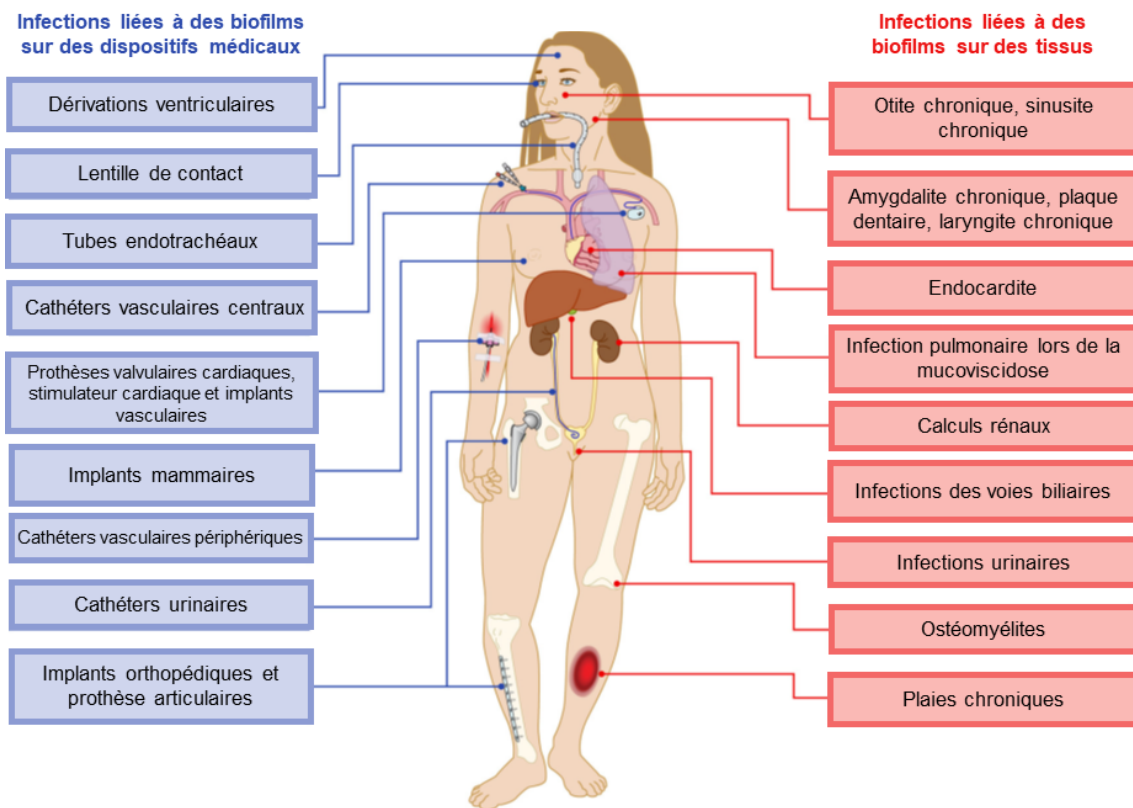


Figure 17 : Différents types d'infections liées aux biofilms qui peuvent être contractées chez l'Homme

Il existe deux types d'infections liées aux biofilms chez l'homme: les infections liées à des biofilms sur des dispositifs médicaux (en bleu) et les infections liées à des biofilms sur des tissus (en rouge). D'après (Lebeaux *et al.*, 2014).

le biofilm (à la surface, à l'intérieur ou dans les profondeurs du biofilm) (Lenz et al., 2008; Pérez-Osorio et al., 2010; Williamson et al., 2012). L'une de ces études a aussi montré que le niveau d'expression de plusieurs gènes (y compris des gènes de ménage) diffère de plusieurs ordres de grandeur entre des populations bactériennes situées à proximité les unes des autres (Lenz et al., 2008). L'étude de Ito *et al.* a exploré l'hétérogénéité d'expression du gène *rpoS* (régulateur de la réponse générale au stress chez *E. coli*) en biofilm et a montré qu'au début du développement du biofilm toutes les bactéries exprimaient le gène *rpoS*, et que lorsque le biofilm devenait mature, l'expression *rpoS* devenait hétérogène ; seules les bactéries présentes à l'interface air-liquide exprimait *rpoS* (Ito et al., 2009a). Une étude originale récente a développé une nouvelle technique : la par-seqFISH (parallel sequential fluorescence *in situ* hybridization). Cette méthode à haut débit capture les profils d'expression de gènes de bactéries individuelles par microscopie confocale par spinning-disk tout en préservant leur contexte physique dans des environnements spatialement structurés (biofilm). Cette approche a révélé que des états physiologiques distincts peuvent coexister au sein du même biofilm à quelques micromètres de distance, soulignant l'importance du microenvironnement (Dar et al., 2021). L'hétérogénéité du biofilm joue aussi un rôle important dans la récalcitrance de ce dernier aux antibiotiques (voir section 4.2).

3. Les biofilms, un problème de santé publique

Les biofilms posent un réel problème en santé humaine, ils sont à l'origine d'infections qui sont difficiles à éradiquer avec les traitements antibiotiques existants. Aux États-Unis, le National Institutes of Health (NIH) a estimé que les biofilms sont responsables de plus de 80 % des infections bactériennes chez l'homme (Davies, 2003). Les biofilms sont responsables d'infections sur matériels implantés et d'infections dans les tissus (Figure 17).

L'implication du biofilm dans les infections sur matériel implanté a été rapportée pour la première fois en 1982 après la visualisation par microscopie électronique d'un stimulateur cardiaque qui venait d'être retiré chez un patient hospitalisé pour une bactériémie à répétition (Marrie et al., 1982). Depuis, les biofilms ont été impliqués dans la colonisation de surface de

nombreux dispositifs médicaux : implants orthopédiques, prothèses artificielles, sondes urinaires, cathéters, canules d'intubation ou encore lentilles de contact (Donlan, 2001; Donlan and Costerton, 2002; Lebeaux et al., 2014). Les biofilms formés sur les dispositifs médicaux sont difficiles à traiter avec les antibiotiques, les médecins sont souvent obligés de retirer le dispositif et de le remplacer, ce qui augmente le coût du traitement et met en danger la vie du patient.

Les biofilms peuvent aussi être à l'origine d'infections chroniques des tissus (Bjarnsholt, 2013). Par exemple, *P. aeruginosa* cause des infections chroniques des poumons chez les patients atteints de mucoviscidose, *E. coli*, est elle souvent impliquée dans les infections urinaires récurrentes. Les bactéries au sein du biofilm sont moins sensibles à la réponse immunitaire de l'hôte (Bjarnsholt, 2013; Watters et al., 2016). En effet, la taille du biofilm constitue un frein important pour la phagocytose. De plus, la matrice extracellulaire empêche la pénétration des cellules immunitaires à l'intérieur du biofilm ainsi que la reconnaissance des antigènes bactériens par les anticorps. En plus de ces phénomènes passifs liés à la matrice, les bactéries en biofilm sont capables de réagir et de moduler l'expression de leurs gènes pour lutter contre l'accumulation de cellules immunitaires. Ainsi, *P. aeruginosa* est capable de détecter la présence de granulocytes et de répondre en synthétisant les rhamnolipides, des glycolipides qui provoquent une nécrose des cellules immunitaires recrutées (Alhede et al., 2009; Jensen et al., 2007). En outre, des concentrations élevées d'antibiotiques (10 à 1000 fois supérieur à la Concentration minimale inhibitrice) sont nécessaires pour éradiquer les bactéries en biofilms (Ceri et al., 1999; Macia et al., 2014). De façon intéressante, une fois resuspendues les bactéries du biofilm redeviennent sensibles tout comme celles en culture planctonique montrant que c'est le mode de vie lui-même et ses caractéristiques qui permet aux bactéries du biofilm de survivre aux traitements antibiotiques et que ce phénomène est réversible (Lebeaux and Ghigo, 2012; Williams et al., 1997).

La résistance, la tolérance et la persistance sont des phénomènes différents qui contribuent à la survie des bactéries en biofilm face aux antibiotiques. Plusieurs revues ont utilisé le terme « récalcitrance » pour regrouper ces différents phénomènes et faire référence

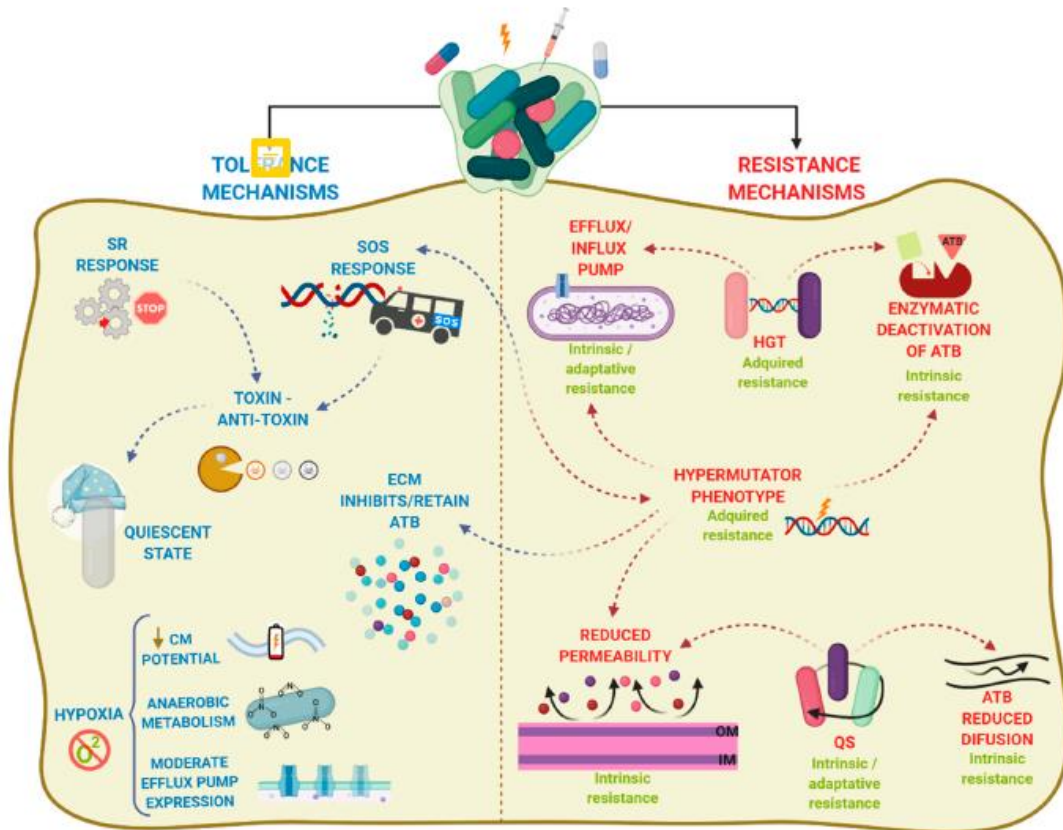


Figure 18 : La récalcitrance des biofilms aux antibiotiques est multifactorielle

La récalcitrance des biofilms aux antibiotiques comprend une combinaison de mécanismes de résistance aux antibiotiques (ATB) (partie droite de la figure) et de mécanismes de tolérance aux antibiotiques (partie gauche de la figure). Les mécanismes de résistance confèrent aux bactéries la capacité de survivre et de se répliquer à des concentrations élevées en antibiotiques pendant de longues périodes et impliquent le transfert horizontal de gènes (HGT), l'hypermutation, le quorum sensing (QS), conduisant au transport d'antibiotiques par des pompes d'efflux, à la réduction de la perméabilité de la membrane externe, ou la production d'enzymes qui inactivent l'ATB. Cependant, les mécanismes de tolérance permettent aux bactéries de survivre à des concentrations élevées d'antibiotiques de façon temporaire et impliquent l'activation des réponses aux stress (réponse SOS, réponse stringente) et de l'hypoxie, conduisant à l'activation d'un état quiescent, d'un métabolisme anaérobie, d'une diminution du potentiel membranaire et à une augmentation modérée de l'expression des pompes d'efflux. Les flèches indiquent les connexions entre les différents mécanismes. (D'après Uruén *et al.* 2020).

à la sensibilité réduite du biofilm vis-à-vis des antibiotiques (Hall and Mah, 2017; Lebeaux et al., 2014; Uruén et al., 2020).

Un microorganisme est dit résistant à un antibiotique s'il est capable de se multiplier en présence de cet antibiotique (bactéricide ou bactériostatique). Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine de cette résistance : efflux de l'antibiotique à l'extérieur de la bactérie, perméabilité réduite de la bactérie pour l'antibiotique, sécrétion d'enzymes inactivant l'antibiotique ou modification de la cible de l'antibiotique par la bactérie. Bien que les mécanismes de résistance soient multiples, ils aboutissent généralement au même résultat : une diminution de la liaison entre l'antibiotique et sa cible, ce qui permet aux bactéries de se développer. La résistance est héréditaire et donc transmise à la descendance, ou bien acquise par transfert horizontal de gène. Un microorganisme est dit tolérant à un antibiotique s'il est capable de survivre transitoirement et sans se multiplier en présence de fortes doses d'antibiotique bactéricide. La survie de ces bactéries tolérantes est dite transitoire car elles finissent par mourir mais le temps nécessaire à l'antibiotique pour les tuer est plus long que pour des bactéries sensibles. La tolérance concerne la capacité de toute la population à survivre aux traitements antibiotiques, elle peut être due à des mutations ou à des conditions environnementales entraînant l'arrêt de croissance des bactéries. Lorsqu'une seule fraction de la population est capable de survivre à un antibiotique, les bactéries sont dites persistantes (Balaban et al., 2019). Lorsque ces dernières sont isolées, repiquées en milieu sans antibiotique puis réexposées au même traitement antibiotique, la même réponse hétérogène au traitement que celle de la population d'origine sera observée i.e. division de la population en sous-populations persistantes et en sous-populations sensibles (Balaban et al., 2019; Brauner et al., 2016).

4. La récalcitrance du biofilm vis-à-vis des antibiotiques est multifactorielle

Il est aujourd'hui admis que la récalcitrance des biofilms vis-à-vis des antibiotiques est multifactorielle (Figure 18), et que les mécanismes de résistance et de tolérance varient en fonction de l'antibiotique, de la souche et de l'espèce bactérienne, de l'âge et du stade de

développement du biofilm et des conditions de croissance du biofilm (Hall and Mah, 2017; Lebeaux et al., 2014; Uruén et al., 2020). Dans cette section seuls certains facteurs participant à la récalcitrance des biofilms vis-à-vis des antibiotiques seront développés.

4.1. Diffusion des antibiotiques dans le biofilm

La matrice extracellulaire, englobant les bactéries du biofilm, a longtemps été considérée comme une barrière empêchant les antibiotiques de pénétrer à l'intérieur du biofilm et donc responsable de la récalcitrance du biofilm vis-à-vis des antibiotiques (Hall and Mah, 2017; Lebeaux et al., 2014). Bien qu'aucune étude à ce jour n'ait décrit que la matrice extracellulaire du biofilm empêchait la diffusion des antibiotiques, plusieurs études ont montré que les propriétés mécaniques et physico-chimiques de la matrice extracellulaire du biofilm peuvent réduire ou retarder la pénétration de différentes molécules y compris les antibiotiques (Gordon et al., 1988; Stewart, 2003). En effet, les aminosides semblent diffuser lentement à travers la matrice extracellulaire. Ce retard de diffusion est dû au fait que les aminosides chargés positivement interagissent avec des composants de la matrice extracellulaire chargés négativement comme l'ADN extracellulaire (ADNe) (Chiang et al., 2013; Tseng et al., 2013). L'ADNe aurait aussi une forte affinité pour la vancomycine, ce qui entraverait l'accès de cette dernière aux bactéries englobées dans les biofilms de *Staphylococcus epidermidis* (Doroshenko et al., 2014).

D'autres facteurs peuvent interférer avec les antibiotiques et donc retarder leur pénétration dans le biofilm. Les β -lactamases, enzymes inactivant les β -lactamines, sont habituellement secrétées dans l'espace périplasmique, mais peuvent être relarguées dans le milieu extracellulaire et par conséquent dégrader et inactiver les β -lactamines avant qu'elles n'atteignent leur cible (Anderl et al., 2000; Ciofu, 2003). Un autre exemple chez *P. aeruginosa*, la glycosyltransférase NdvB, est responsable de la production du β -(1 \rightarrow 3)-glucane qui est sécrété dans le périplasme et dans la matrice extracellulaire ; ce glucane interfère physiquement avec la pénétration des aminosides au sein du biofilm (Mah et al., 2003; Sadovskaya et al., 2010). Cependant, la diffusion réduite des antibiotiques dans le biofilm ne

peut pas expliquer à elle seule la difficulté d'éradiquer les bactéries au sein de ce dernier. En effet, il a été rapporté que des antibiotiques qui pénètrent aisément le biofilm (fluoroquinolones, β -lactamines, rifampicine...) sont incapables de tuer 100% des bactéries du biofilm (Anderl et al., 2000; Rodríguez-Martínez et al., 2007; Stone et al., 2002; Zheng and Stewart, 2002). Une approche originale permettant de suivre la diffusion de la tétracycline dans un biofilm d'*E. coli* par fluorescence a montré que la tétracycline pénétrait dans un biofilm de 48h en 10 min sans affecter la viabilité des cellules (Stone et al., 2002). De même, l'ampicilline (en absence de β -lactamases) et la ciprofloxacine pénètrent rapidement le biofilm de *K. pneumoniae* mais ne parviennent pas à éradiquer les bactéries après 24h de traitement (Anderl et al., 2000). Il a aussi été proposé que la diffusion lente des antibiotiques dans le biofilm donnerait aux bactéries le temps de s'adapter ce qui pourrait augmenter leurs tolérance (Doroshenko et al., 2014; Jefferson et al., 2005). La diffusion de l'antibiotique dans le biofilm dépend aussi de différents paramètres tels que le microorganisme, le type d'antibiotique, le stade de développement du biofilm et le modèle d'étude utilisé (Hall and Mah, 2017; Lebeaux et al., 2014).

4.2. Hétérogénéité du biofilm : hypoxie et limitation en nutriments

Plusieurs études ont démontré que la tolérance des bactéries aux antibiotiques dans le biofilm diffère en fonction de leur localisation dans celui-ci (Walters et al., 2003; Williamson et al., 2012). Comme dit précédemment, le biofilm est un environnement très hétérogène où les bactéries sont confrontées à des gradients de plusieurs paramètres notamment les nutriments et l'oxygène (Stewart and Franklin, 2008). Ces gradients sont créés par le fait que les cellules situées près de la surface du biofilm utilisent l'oxygène et les nutriments disponibles avant que ces derniers puissent pénétrer plus profondément et atteindre les bactéries dans le biofilm.

4.2.1. Hypoxie

Les faibles concentrations en oxygène rencontrées dans la profondeur des biofilms protègent les bactéries du biofilm de l'action des antibiotiques (Walters et al., 2003; Werner et

al., 2004). En effet, les bactéries présentes dans les couches du biofilm dépourvues en oxygène ont une activité métabolique réduite alors que les antibiotiques sont en général plus efficaces contre des bactéries métaboliquement actives (Hall and Mah, 2017). Walters *et al.* ont ainsi montré que la faible teneur en oxygène dans la profondeur des biofilms de *P. aeruginosa* réduisait les effets bactéricides de la tobramycine et de la ciprofloxacine (Walters et al., 2003). Une autre étude a montré que des biofilms traités par des antibiotiques en conditions anaérobies étaient plus tolérants que ceux traités de façon similaire en condition aérobie (Borriello et al., 2004). Le rôle de l'hypoxie dans la contribution à la récalcitrance des biofilms aux antibiotiques est également renforcé par une étude récente qui a démontré que l'exposition de biofilms à l'oxygénothérapie hyperbare (OHB) améliorait l'activité bactéricide des quinolones (Kolpen et al., 2017; Lerche et al., 2017).

D'autres mécanismes pourraient également contribuer à expliquer comment l'hypoxie confère une tolérance aux antibiotiques dans les biofilms. Des systèmes de pompes d'efflux comme MexCDoprJ ou encore MexEF-OprN sont surexprimés dans des conditions de faible teneur en oxygène favorisant la survie des bactéries en présence d'antibiotique (Schaible et al., 2012; Tata et al., 2016). Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont suspectées de jouer un rôle dans la mort cellulaire induite par les antibiotiques (Dwyer et al., 2015). Or la production de ROS nécessite la présence d'oxygène, l'hypoxie pourrait favoriser la survie des bactéries dans le biofilm lors de l'exposition aux antibiotiques, ces derniers ne pouvant plus induire la production de ROS. Cependant cette hypothèse n'a pas été explicitement étudiée dans la littérature (Hall and Mah, 2017).

4.2.2. Limitation en nutriments

La nature hétérogène du biofilm a pour conséquence que certaines microniches du biofilm sont privées de nutriments. Certaines études ont montré que la privation en nutriments contribue à la tolérance des bactéries du biofilm aux antibiotiques (Amato and Brynildsen, 2014; Anderl et al., 2000; Bernier et al., 2013; Nguyen et al., 2011; Roberts and Stewart, 2004). A l'inverse, la complémentation des biofilms en nutriments permet d'augmenter leur sensibilité

aux antibiotiques (Borriello et al., 2006; Zheng and Stewart, 2004). La réponse stringente est une réponse au stress hautement conservée qui assure la survie des bactéries dans des conditions où les nutriments (acides aminés, sources de carbone...) sont limités. La réponse stringente jouerait un rôle important dans la survie des bactéries face aux antibiotiques en biofilm (Amato and Brynildsen, 2014; Bernier et al., 2013; Nguyen et al., 2011), et aujourd'hui différents mécanismes par lesquels elle favoriserait la formation de bactéries tolérantes aux antibiotiques ont été décrits (et seront développé dans le chapitre IV section 3).

4.3. Le transfert horizontal de gènes

Le transfert horizontal de gènes (THG) peut se faire de différentes façons, par transformation naturelle ou par conjugaison. L'ADNe, composant essentiel de la matrice extracellulaire, est une source importante pour l'acquisition de gènes de résistance par transformation naturelle pour les bactéries du biofilm. Une étude a montré que *Campylobacter jejuni*, bactérie à Gram négative et agent pathogène d'origine alimentaire, transfère plus fréquemment (de l'ordre de 6 fois plus) des gènes de résistances aux antibiotiques en biofilm qu'en culture planctonique par transformation naturelle (Bae et al., 2014). La colonisation de nasopharynx de souris (modèle biofilm) par des souches de *Streptococcus pneumoniae* a montré une fréquence beaucoup plus élevée de transformation naturelle (de l'ordre de 10^7 fois plus) par rapport à celle observée dans un modèle de sepsis (bactéries libres dans le sang) (Marks et al., 2012). Ces études suggèrent que le mode de vie biofilm est un milieu favorable pour les échanges génétiques y compris des gènes de résistances aux antibiotiques. Le THG peut également se faire par transfert de plasmides entre les bactéries du biofilm *via* la conjugaison. Les travaux de plusieurs groupes ont montré que le transfert de plasmides par conjugaison est plus efficace en biofilm qu'en cultures planctoniques favorisé par la proximité des bactéries dans le biofilm (Hennequin et al., 2012; Król et al., 2013; Madsen et al., 2012; Molin and Tolker-Nielsen, 2003; Savage et al., 2013). Cook et Dunny ont décrit, dans un biofilm d'*Enterococcus faecalis*, une augmentation du nombre de copies de certains plasmides entraînant l'augmentation de l'expression des gènes de résistance qu'ils portent. Ces auteurs

ont aussi montré que l'augmentation du nombre de copies de plasmide était restreinte à certaines microniches du biofilm (Cook and Dunny, 2013). Une autre étude a elle montré que l'efficacité du transfert du plasmide de multirésistance pB10 dans un biofilm d'*E. coli* était plus importante chez les bactéries situées à la surface du biofilm *i.e.* à l'interface air-liquide (région riche en oxygène) qu'en profondeur du biofilm (Król et al., 2011). Cette étude est un contraste intéressant avec les études présentées dans la section 4.2.1 qui montraient que les régions pauvres en oxygène favorisaient la récalcitrance du biofilm aux antibiotiques, démontrant ainsi une fois de plus que les biofilms sont hétérogènes et que les bactéries dans différentes microniches du biofilm ont différents mécanismes de résistance aux antibiotiques (Hall and Mah, 2017). Au laboratoire il a été montré qu'en biofilm, l'expression du gène de l'intégrase de classe 1 (*intl1*) est augmentée de plus de 2 fois et l'activité d'excision de l'intégrase est augmenté de 100 fois, par rapport à une culture planctonique (voir chapitre I) (Strugeon et al., 2016), un autre exemple confirmant que le mode de vie biofilm favorise l'acquisition des gènes de résistance par transfert horizontal de gènes.

4.4. Les bactéries persistantes

Comme dit précédemment, les bactéries persistantes représentent une fraction d'environ 1% de la population capable de survivre transitoirement à des doses élevées d'antibiotiques bactéricides (Balaban et al., 2019). Ces bactéries sont suspectées être à l'origine de la récurrence des infections impliquant des biofilms (Hall and Mah, 2017; Lebeaux et al., 2014; Uruén et al., 2020). Les bactéries persistantes sont présentes dans les biofilms mais aussi en cultures planctoniques, et certaines études montrent même que la proportion des bactéries persistantes serait plus importante dans les cultures planctoniques qu'en biofilm (Spoering and Lewis, 2001). L'implication de ces bactéries persistantes dans la récurrence des infections à biofilm viendrait plutôt du fait qu'elles seraient protégées par la matrice extracellulaire du biofilm et échapperaient au système immunitaire et donc une fois le traitement antibiotique arrêté, elles se multiplieraient à nouveau (Lewis, 2001). L'origine et l'état physiologique de ces bactéries sont encore sujet à controverses. Plusieurs facteurs et

mécanismes ont été décrits comme jouant un rôle important dans l'apparition des bactéries persistantes (Wood et al., 2013). La plupart des études sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de ces bactéries ont été menées essentiellement avec des bactéries en culture planctonique (Hall and Mah, 2017; Lebeaux et al., 2014; Uruén et al., 2020). La présence des bactéries persistantes est liée à des mécanismes à la fois passifs et actifs. Les quelques études qui se sont intéressées aux mécanismes moléculaires impliqués dans la formation bactéries persistantes en biofilm ont décrit différents modèles. Harisson et al. ont montré que chez *E. coli*, la toxine YafQ, du couple toxine-antitoxine de type II, YafQ-DinJ, est responsable de la formation de bactéries persistantes pour certains antibiotiques uniquement en biofilm mais pas en culture planctonique (Harrison et al., 2009). Chez *P. aeruginosa*, il a été décrit que la persistance en biofilm dépendait des molécules signal du *quorum sensing* (Bjarnsholt et al., 2005; Möker et al., 2010). De plus, plusieurs études dont celles réalisées en biofilm soulignent le rôle de la réponse stringente dans la formation des bactéries persistantes. Nguyen *et al.* ont démontré que la réponse stringente induisait la formation de bactéries persistantes chez *P. aeruginosa* et *E. coli* à différentes classes d'antibiotiques en augmentant d'une part les défenses antioxydantes (production de la catalase et superoxyde dismutase), et en diminuant d'autre part la production de métabolites pro-oxydants (Nguyen et al., 2011). Une autre étude chez *E. coli* a rapporté que la persistance des bactéries à l'ofloxacine en biofilm dépendait totalement de l'activation de la réponse SOS et partiellement de la réponse stringente mais ne dépendait pas des systèmes Toxines-antitoxines (Bernier et al., 2013). Amato *et al.* ont décrit que dans la formation de bactéries persistantes en biofilm dépendait de la réponse stringente et de protéines associées au nucléoïde (Amato and Brynildsen, 2014). Ils ont aussi souligné une différence entre les protéines associées au nucléoïde nécessaires pour la formation des bactéries persistantes en biofilm et en cultures planctonique (Amato et al., 2013; Amato and Brynildsen, 2014). Ces travaux montrent qu'il est important de ne pas extrapoler au biofilm les données sur les bactéries persistantes obtenues en culture planctonique, et qu'il faut intensifier la recherche

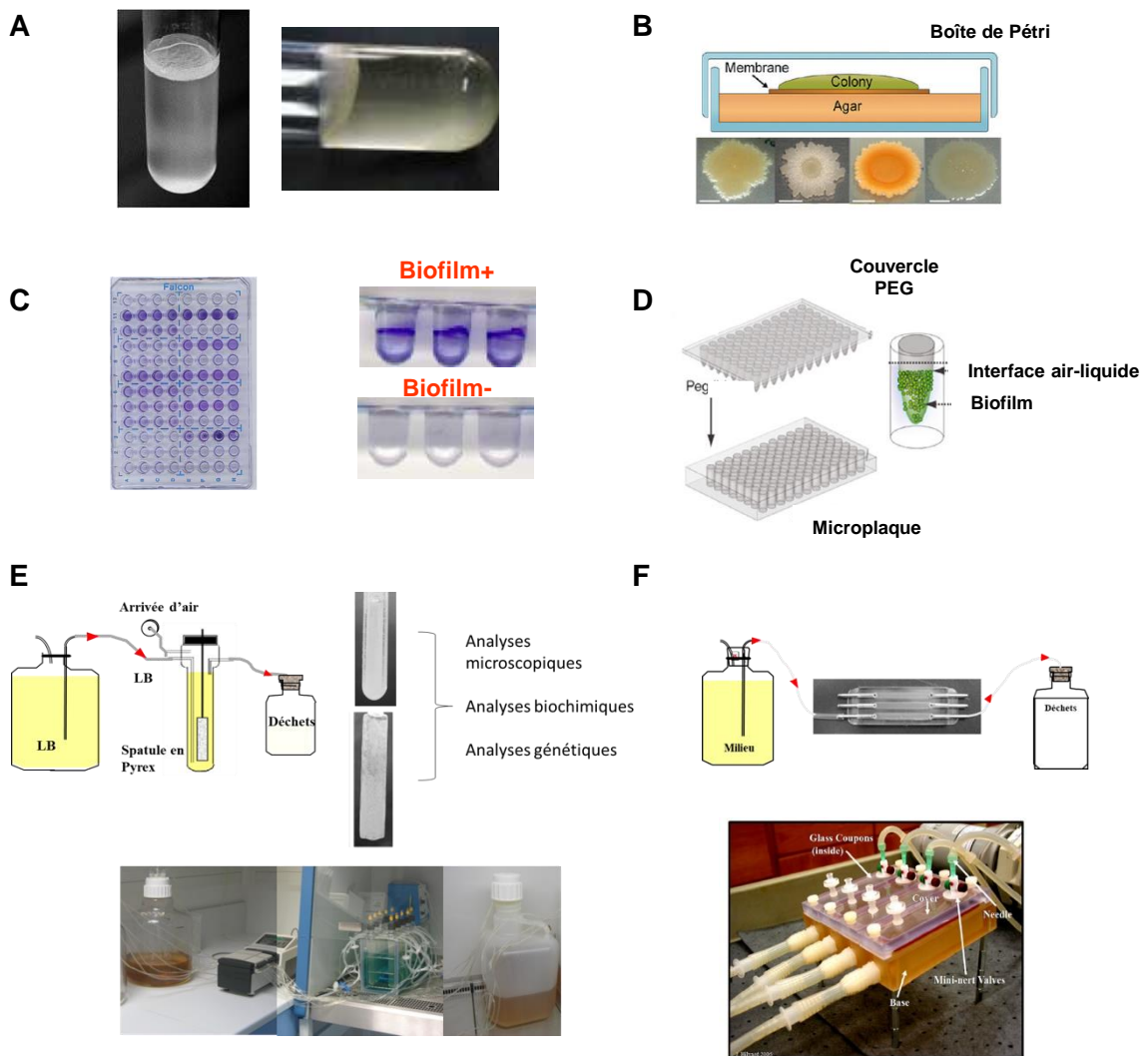


Figure 19 : Modèles utilisés pour la culture des biofilms

Exemples de modèles statiques de culture de biofilm. **A.** Biofilm à l'interface air-liquide cultivé en tube en verre statique. **B.** Biofilm en colonie. **C.** Biofilm cultivé en microplaque 96 puits et coloré avec du cristal violet. **D).** Modèle de culture de biofilm sur couvercle PEG plongé dans une microplaque 96 puits.

Exemples de modèles de culture de biofilm en continu. **E.** Schéma de culture de biofilm en microfermenteur contenant une spatule en pyrex amovible sur laquelle se développe le biofilm (Ghigo, 2001). **F.** Schémas de systèmes dits de cuves à flux continu ou « flow-cell », permettant l'observation de la formation du biofilm par microscopie confocale. En bas un exemple du système « Drip-Flow ». Les images B, D et celle du système « drip-flow » sont extraites de (Magana et al. 2018). Les images A, C et F viennent du laboratoire de génétique bactérienne (JM. Ghigo, Institut Pasteur).

des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des bactéries persistantes en biofilm.

5. Modèles de culture du biofilm

Il existe deux types de systèmes permettant la culture des biofilms : des modèles statiques (pas de renouvellement du milieu de culture) et des modèles de culture en continue (Figure 19).

5.1. Modèles statiques

Parmi les modèles statiques de culture de biofilm on retrouve : culture en tube statique (Figure 19A), les colonies sur boîte de pétri, culture sur filtre déposé sur boîte de pétri (Figure 19B), culture en microplaque (Figure 19C), culture en « Calgary Biofilm Device » (couvercle PEG plongé dans une microplaque) (Figure 19D), culture en système ibidi sur lame ou lamelle. La culture de biofilm en microplaque est devenue la technique de référence permettant l'identification de gènes impliqués dans la formation de biofilm (FRANKLIN et al., 2015; Magana et al., 2018). Les biofilms en colonie se forment sur un filtre déposé dans une boîte de pétri, et permet d'obtenir un biofilm assez dense qui peut ensuite être récupéré pour différents types d'analyses. Ce modèle a été utile pour déterminer l'expression hétérogène de gènes en biofilm par microdissection laser (Lenz et al., 2008; Williamson et al., 2012). Les cultures sur lames permettent la visualisation du développement du biofilm en microscopie.

5.2. Modèles de culture en continue

Contrairement aux modèles statiques, les modèles de biofilm en culture en continue, permettent comme leur nom l'indique, le renouvellement continu du milieu et l'évacuation des bactéries planctoniques et des déchets. Ils existent de nombreux modèles tels que les microfermenteurs (Ghigo, 2001) (Figure 19E), « Kadouri System », « Robbins device », réacteur à disque tournant, les cuves à flux continu, « Drip-Flow system » ou réacteur à flux goutte à goutte (Figure 19F), les flow-cell microfluidique (FRANKLIN et al., 2015; Magana et al., 2018). L'un des avantages des modèles de culture en continu est la possibilité de comparer

les effets que différents milieux, concentrations d'oxygène et changements de température exercent sur un biofilm à toutes les phases de son développement (FRANKLIN et al., 2015; Magana et al., 2018). Les microfermenteurs (MF, Figure 19E), développés à l'Institut Pasteur de Paris, sont des grands tubes en verre ayant une arrivée d'air, une arrivée de milieu et une sortie pour l'évacuation du milieu et contenant une spatule en pyrex amovible sur laquelle les bactéries vont adhérer et pousser (Ghigo, 2001). Ce modèle de culture, utilisé au laboratoire, permet d'obtenir un biofilm avec une quantité suffisante pour permettre différentes analyses génétiques ou biochimiques. L'utilisation des microfermenteurs a permis de fournir des informations sur la capacité de souches à former du biofilm (Da Re et al., 2007; Ghigo, 2001), d'étudier la régulation de certains gènes en biofilm (Beloin et al., 2004; Strugeon et al., 2016), identifier des molécules à action d'inhibition de formation du biofilm (Valle et al., 2006). Les cuves à flux continu (Figure 19F) contiennent généralement une « fenêtre », composée d'une lamelle couvre-objet qui permet l'observation des biofilms par microscopie. L'imagerie de ces biofilms par microscopie confocale à balayage laser (MBCL) donne des informations sur l'architecture 3D des biofilms et l'étude de l'expression hétérogène des gènes en biofilm (FRANKLIN et al., 2015; Magana et al., 2018).

Il existe aussi des modèles *ex-vivo* et des modèles animaux permettant l'étude de la colonisation de tissus ou encore de matériels implantés par des biofilms et de l'évaluation de l'effet des antibiotiques et de nouvelles molécules pour l'éradication des bactéries en biofilm dans des conditions proches de ce qui se passe chez le patient (Lebeaux et al., 2013; Magana et al., 2018).

6. Méthodes permettant l'étude de l'expression hétérogène des gènes en biofilm

Les premières études de caractérisation des biofilms ont utilisé des approches globales telles que la transcriptomique pour évaluer l'expression différentielle des gènes entre culture biofilm et culture planctonique (Beloin et al., 2004; Whiteley et al., 2001). Pour ce type d'analyses, le biofilm entier est généralement resuspendu afin d'obtenir suffisamment de

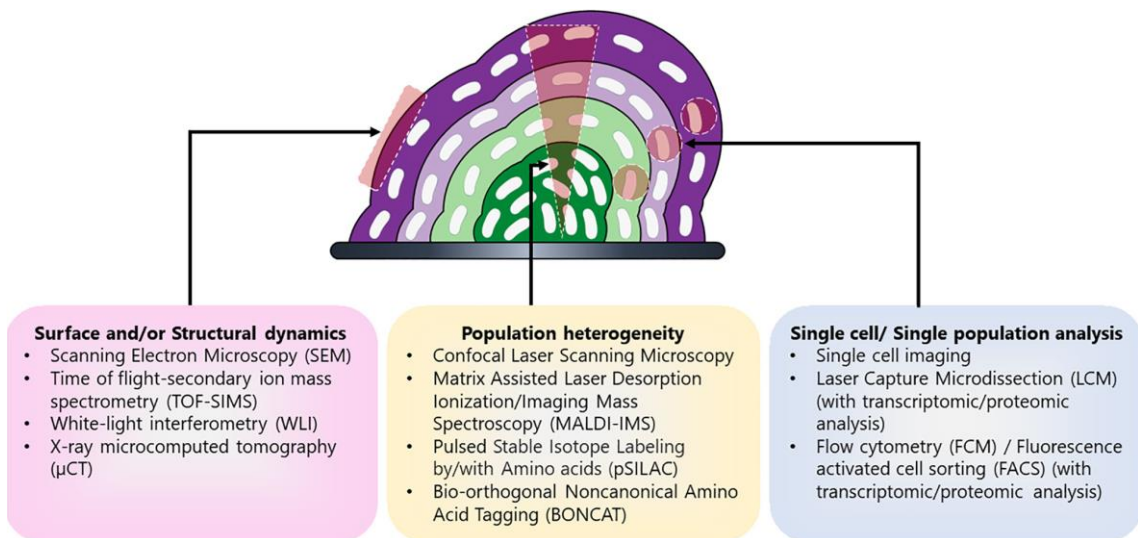


Figure 20 : Techniques utilisées pour la caractérisation détaillée des différents composants du biofilm

Le biofilm est une communauté complexe de microorganismes qui englobe plusieurs sous-populations (représentées en violet et en vert). Par conséquent, de multiples techniques ont été utilisées pour caractériser les différents aspects du biofilm: sa formation, son développement et son hétérogénéité. Cette figure présente les diverses techniques en fonction des informations qu'elles peuvent fournir. D'après (Bisht et Wakeman, 2019).

matériel cellulaire ; cependant, les biofilms étant hétérogènes, ces approches fournissent des informations sous forme de moyenne pour l'ensemble de la population du biofilm (An and Parsek, 2007; Stewart and Franklin, 2008). Aujourd'hui, de plus en plus d'études s'intéressent à l'étude des sous-populations du biofilm et particulièrement à la localisation de l'expression des gènes dans le biofilm, pour lesquelles différentes techniques ont été développées (Figure 20) (Bisht and Wakeman, 2019; Davis and Isberg, 2016; FRANKLIN et al., 2015; Stewart and Franklin, 2008).

6.1. Techniques basées sur la détection de fluorescence

6.1.1. La microscopie

La MCBL est l'une des avancées les plus importantes dans l'étude de la structure, de la fonction et de la dynamique des biofilms car elle a permis de visualiser les biofilms vivants en trois dimensions au cours du temps (FRANKLIN et al., 2015; Neu and Lawrence, 2014; Wilson et al., 2017). Les premières images 3D de biofilms ont été obtenues par MCBL il y a environ 30 ans (Lawrence et al., 1991). Contrairement à la microscopie conventionnelle ou à épifluorescence, la MBCL utilise un diaphragme variable, appelé « pinhole » pour filtrer et récupérer uniquement la lumière qui se trouve dans le bon plan focal, par conséquent le flou dû à la fluorescence émise hors focus est éliminé. Avec la MBCL une série d'images 2D focalisées dans les plans X et Y est obtenue à des intervalles inférieurs à un micromètre dans le plan Z. Les piles d'images 2D permettent de reconstruire ensuite une image 3D avec une très bonne résolution (Neu and Lawrence, 2014; Nwaneshiudu et al., 2012). Un des avantages majeurs de la microscopie lorsque le biofilm est cultivé en flow-cell, est d'analyser les biofilms sans avoir à les récolter et à les remettre en suspension, ce qui permet de conserver les structures naturelles. La visualisation des biofilms avec la MBCL est couramment associée à l'utilisation de colorants fluorescents, anticorps fluorescents ou encore protéines fluorescentes. L'utilisation de bactéries exprimant une protéine fluorescente comme la GFP (la GFP est exprimée à partir d'un promoteur constitutif) permet la visualisation de l'architecture

3D des cellules du biofilm pendant le développement de ce dernier (FRANKLIN et al., 2015). Les gènes codant des protéines fluorescentes peuvent aussi être utilisés comme gènes rapporteurs. Ces derniers combinés à la MBCL, sont particulièrement utiles pour examiner l'hétérogénéité de l'expression des gènes dans les biofilms et pour étudier l'expression stochastique de certains gènes (FRANKLIN et al., 2015). Par exemple, l'étude de Bagge et al. a montré que lors de l'exposition de *P. aeruginosa* à des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques (imipénème et ceftazidime), le gène *ampC* codant pour une β -lactamase était exprimé uniquement par les bactéries présentes à l'interface air-liquide du biofilm, bien que les bactéries au centre du biofilm étaient physiologiquement actives (Bagge et al., 2004).

6.1.2. La cytométrie en flux

La cytométrie en flux (CMF) a été largement utilisée dans des domaines tels que l'immunologie, l'hématologie ou encore la cancérologie pour identifier des populations cellulaires exprimant différents marqueurs de surface. En CMF, les cellules d'une suspension vont passer l'une après l'autre devant des faisceaux laser ce qui va permettre d'obtenir des données sur la taille, la forme, la granulosité et l'intensité de fluorescence émise par chacune d'elles. Cette technique permet, en choisissant des critères de sélection précis, de distinguer différentes sous-populations de cellules au sein de la même suspension cellulaire. De plus, certains cytomètres (appelés communément trieurs cellulaires ou FACS) sont capables de séparer physiquement (trier) les cellules sur la base de différents critères. Une fois que ces populations sont séparées par FACS, elles peuvent être caractérisées indépendamment par des techniques moléculaires à haut débit et ou à l'aide d'analyses protéomiques ou transcriptomiques (Ambriz-Aviña et al., 2014; Bisht and Wakeman, 2019; Trip et al., 2011). Avec le FACS, les bactéries peuvent aussi être récupérées vivantes pour être remises en culture et analysées. Aujourd'hui, la CMF est de plus en plus utilisée en microbiologie, notamment avec les biofilms afin de permettre l'analyse des sous-populations bactériennes présentant des états physiologiques différents (Ambriz-Aviña et al., 2014). Par exemple, elle a été récemment utilisée pour évaluer la distribution des bactéries du biofilm *P. aeruginosa*

selon leurs états métaboliques (bactéries métaboliquement actives, mi-actives ou non actives) (Wojciech et al., 2018). Si la CMF permet de quantifier, elle ne fournit pas d'informations quant à la localisation des sous-populations dans le biofilm, c'est pour cela qu'il est intéressant de la combiner avec la MBCL. Malgré un intérêt certain, cette technique reste encore très peu utilisée pour la caractérisation des sous-populations dans le biofilm.

6.1.3. Le choix des protéines fluorescentes

Les protéines fluorescentes comme la GFP (fluorescence verte) ou la mcherry (dérivée de la DsRed, fluorescence rouge) sont fréquemment utilisées pour marquer les bactéries du biofilm et suivre ainsi son développement ou encore pour suivre l'expression d'un gène au sein du biofilm. Ces protéines nécessitent une étape de maturation post-traductionnelle pour acquérir la propriété de fluorescer, cette maturation requiert de l'oxygène (Craggs, 2009; Strack et al., 2010). Dans le biofilm, comme dit précédemment il existe certaines microniches complètement dépourvues d'oxygène qui ne permettent pas la maturation des protéines fluorescentes, ce qui pose un problème lors de leur utilisation dans le suivi d'expression de gène en biofilm. D'autres protéines fluorescentes de type FbFPs (Flavin-based fluorescent proteins) comme l'Evoglow® dont la maturation est indépendante de l'oxygène ont été développées (Drepper et al., 2007; Mukherjee et al., 2015; Wingen et al., 2014). Malheureusement, l'intensité de fluorescence de ces protéines est relativement faible par rapport à celle de la GFP ou de la mCherry (Mukherjee et al., 2013). Néanmoins, il a été démontré que des protéines dérivées de la GFP et de la DsRed peuvent rester dans un état intermédiaire immature jusqu'à ce qu'elles subissent une maturation post-traductionnelle lors de l'exposition à l'air (Line et al., 2014; Ransom et al., 2015; Scott et al., 1998; Zhang et al., 2005). Pinilla-Redondo et al. ont utilisé cette observation pour développer l'« aerobic fluorescence recovery » (AFR), une méthode permettant de récupérer la fluorescence de la GFP et de la mCherry, produites par des bactéries lors de leur croissance dans un milieu dépourvu en oxygène tel que le biofilm ou le tractus gastro-intestinal, en les exposant à l'air pendant quelques heures (Pinilla-Redondo et al., 2018). Récemment, une petite protéine

« Tag », appelée FAST (Fluorescence-Activating and absorption-Shifting Tag) a été développée. Lorsqu'elle se lie un hydroxybenzylidène rhodanine (HBR) fluorogénique (molécule initialement non fluorescente), FAST augmente le rendement quantique de la molécule et décale son spectre d'absorption ce qui la fait fluorescer (Plamont et al., 2016). Une étude a démontré l'intérêt d'utiliser cette protéine en biofilm car elle ne nécessite pas d'oxygène (Monmeyran et al., 2018).

6.2. La microdissection laser

La microdissection laser a été initialement développée pour isoler des cellules eucaryotes des tissus (Bonner et al., 1997; Emmert-Buck et al., 1996). Plus tard, cette technique a été utilisée afin d'isoler et de capturer des sous-populations bactériennes à partir de différentes régions du biofilm (Bisht and Wakeman, 2019). L'avantage de cette technique est que seule la cellule ou la sous-population capturée est retenue et conservée pour des analyses ultérieures, évitant ainsi les autres débris cellulaires. Cette technique peut être couplée à des approches de transcriptomique ou de protéomique afin de comprendre des processus qui sont localisés uniquement dans certaines microniches (Bisht and Wakeman, 2019; Stewart and Franklin, 2008; Williamson et al., 2012). L'équipe de Michael Franklin a combiné la microdissection laser à la RT-qPCR multiplex afin de quantifier l'expression de plusieurs gènes dans différentes régions du biofilm (Lenz et al., 2008; Pérez-Osorio et al., 2010; Williamson et al., 2012). Cette approche a permis de quantifier les transcrits d'ARNm de faible abondance sans qu'il soit nécessaire de manipuler génétiquement les bactéries ou de les exposer à des substrats marqués (Lenz et al., 2008). Lenz et *al.* ont ainsi montré que le niveau d'expression des gènes (même des gènes de ménage) diffère de plusieurs ordres de grandeur entre des populations bactériennes situées à proximité les unes des autres (Lenz et al., 2008). De plus, l'étude de Williamson et *al.* a démontré que les cellules présentes dans les profondeurs du biofilm de *P. aeruginosa* ont une croissance lente et sont tolérantes aux antibiotiques (ciprofloxacine et tobramycine) contrairement aux cellules situées à la surface du biofilm qui ont une croissance rapide et sont peu tolérantes aux antibiotiques (Williamson et

al., 2012). Cependant, cette technique a deux inconvénients majeurs : (i) elle est complexe à mettre en place et nécessite un vrai savoir-faire et (ii) une fois utilisé le biofilm est détruit, et donc ne permet pas un suivi et une analyse en continue des processus (Bisht and Wakeman, 2019; Stewart and Franklin, 2008). Une nouvelle technique « Single prokaryotic cell isolation and total transcript amplification protocol for transcriptomic analysis » a été développé en 2015 permettant d'obtenir des résultats de transcriptomique très sensibles à partir d'une seule cellule (Kang et al., 2015). Cette technique a été utilisée pour évaluer le transcriptome de petites sections du biofilm (plus petites que celles obtenues avec la microdissection laser) et a permis d'avoir des résultats sur le niveau d'expression des gènes plus précis (Heacock-Kang et al., 2017).

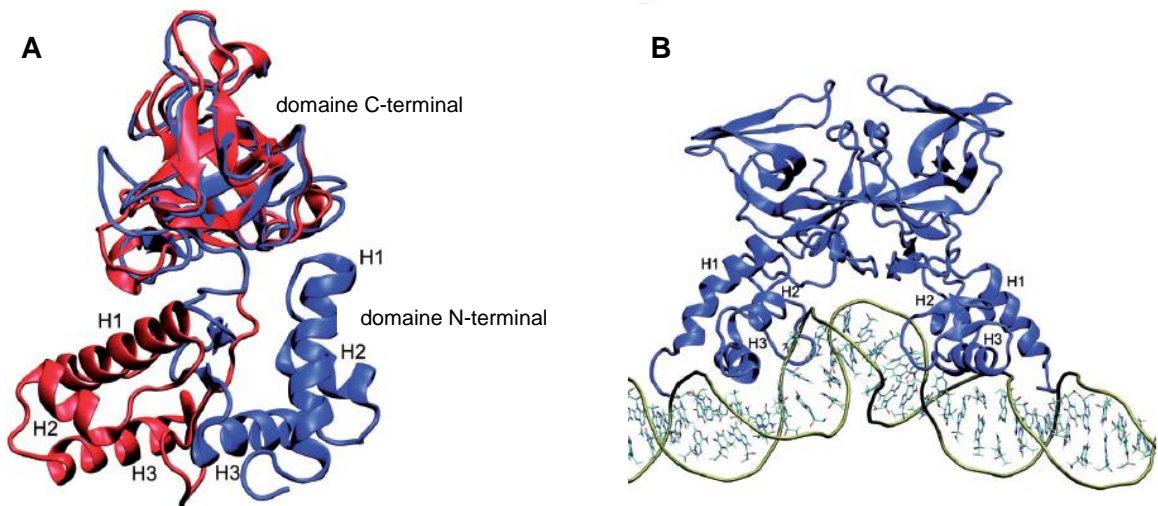


Figure 21 : Structure de la protéine LexA

A. Structure d'un monomère de LexA

La forme libre du monomère de LexA est représentée en rouge, la modélisation du monomère de LexA lié à l'ADN est représentée en bleu. Les deux structures se superposent au niveau des régions C-terminales. H1,H2 et H3 : hélices alpha constituant le domaine N-terminal. D'après (Butala *et al*, 2008)

B. LexA sous forme dimérique liée à une région promotrice

Le dimère de protéine LexA (bleu) est fixé à l'ADN (vert) au niveau de sa région N-terminale grâce à un motif Hélice-Tour-Hélice. La dimérisation de LexA se fait au niveau des domaines C-terminaux. D'après(Butala *et al*, 2008).

Chapitre III. La réponse SOS

En 1945, Evelyn Witkin, doctorante de l'institut Cold Spring Harbor à New York, a observé que certaines bactéries étaient capables de survivre à des doses élevées de rayons UV. Elle fut la première à émettre l'hypothèse que les bactéries pouvaient avoir un mécanisme de réparation de l'ADN qui les rendait résistantes aux UV. L'hypothèse de la réponse SOS a été élaborée sur la base de plusieurs observations chez des souches d'*E. coli* traitées aux UVs : induction du prophage Lambda (Hertman and Luria, 1967), filamentation cellulaire (Green et al., 1969) et induction de mutation (Weigle, 1953). En 1967, Evelyn Witkin émit l'hypothèse que la filamentation cellulaire et l'induction du prophage Lambda étaient contrôlées par un répresseur qui était inactivé par un processus complexe induit par la présence de lésions bloquant la réplication dans l'ADN (Bridges, 2005; Janion, 2008). Ces différentes données ont conduit Miroslav Radman à conclure en 1970 que, chez *E. coli*, i) il existe un système de réparation de l'ADN dépendant des protéines LexA et RecA, qui est induit lorsque l'ADN est gravement endommagé et sa synthèse arrêtée ; ii) l'induction de ce système est liée à l'apparition de mutations. Il a nommé ce mécanisme « SOS-replication » en référence au signal de détresse de l'alphabet Morse SOS (Save Our Souls). Il a d'abord partagé son hypothèse avec quelques chercheurs en rédigeant un mémorandum « phenomenology of an inducible mutagenic SOS replication », avant la publication officielle décrivant la réponse SOS en 1974 (Radman, 1974).

1. Les acteurs de la réponse SOS

1.1. La protéine LexA

La protéine LexA (locus for X-ray sensitivity A) est composée de 202 acides aminés (22 kDa) et se structure en deux domaines : un domaine N-terminal (NTD ; aa 1-69) et un domaine C-terminal (CTD ; aa 75-202), séparés par une petite région charnière flexible (Figure 21) (Butala et al., 2008; Luo et al., 2001; Zhang et al., 2010). La protéine LexA peut se trouver

sous forme monomérique ou dimérique. Sous sa forme dimérique, LexA peut se lier à une séquence spécifique d'ADN (Mohana-Borges et al., 2000) et est aussi capable d'auto-protéolyse (Luo et al., 2001). Le NTD est composé d'hélices α , il permet la liaison de la protéine à l'ADN grâce à un motif hélice-tour-hélice (HTH) (Zhang et al., 2010). La région charnière (Gln70 à Gln 74) joue aussi un rôle important dans cette interaction spécifique LexA/ADN (Butala et al., 2008; Maslowska et al., 2019). Le CTD est composé de feuilletts β , il permet la dimérisation de la protéine et contient le site catalytique d'auto-protéolyse (Butala et al., 2008; Luo et al., 2001; Maslowska et al., 2019). Les résidus responsables de l'activité d'auto-protéolyse de la protéine LexA sont la Sérine 119 et la Lysine 156, qui catalysent le clivage du lien entre les résidus Alanine 84 et Glycine 85 situés dans la boucle d'un même monomère, cette boucle existant sous deux conformations : à proximité du site catalytique « forme clivable » ou éloignée du site catalytique « forme non clivable » (Little, 1991; Giese et al., 2008). Ce clivage expose alors des résidus cibles qui seront reconnus par les protéases ClpXP et Lon, permettant la dégradation de LexA (Little and Gellert, 1983; Neher et al., 2003). La présence de la co-protéase RecA est nécessaire pour stimuler l'activité d'auto-clivage de LexA (Little, 1991).

La protéine LexA est le répresseur transcriptionnel de la réponse SOS, elle réprime l'expression des gènes du régulon SOS en se fixant au sein de leur région promotrice (voir section 2 de ce chapitre) (Baharoglu and Mazel, 2014; Erill et al., 2007). Il a été estimé qu'à l'état basal, *E. coli* contient environ 1 300 molécules de LexA (Sassanfar and Roberts, 1990), qui se trouvent majoritairement liées à l'ADN, seules 20% étant sous forme libre (Butala et al., 2008).

1.2. La protéine RecA

La protéine RecA est une recombinase composée de 352 acides aminés (38kDa). Chez *E. coli* environ 7 200 molécules de RecA sont présentes à l'état basal (Sassanfar and Roberts, 1990). La structure de la protéine RecA a été élucidée en 1992 par Story et Steitz (Story and Steitz, 1992). Elle est constituée d'un grand domaine cœur et de deux petits

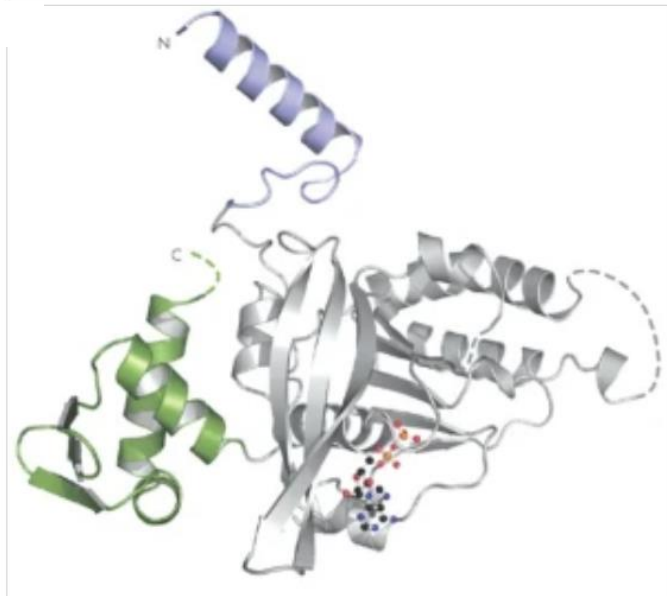


Figure 22 : Structure de la protéine RecA

La structure de RecA a été élucidée par Story et Steitz en 1992 et de multiples structures de RecA et de ses homologues ont été déterminées depuis. La structure d'une sous-unité de filament unique contient un grand domaine central (représenté en gris) et deux domaines plus petits aux extrémités N et C (représentés respectivement en violet et en vert). Le domaine central est le prototype d'un motif connu sous le nom de « pli RecA », qui est commun à une série d'autres protéines, y compris des protéines motrices comme l'ATPase F1, de multiples hélicases, des protéines de transport de l'ADN et certains autres transporteurs. L'ADP lié est représenté dans une structure en « boules et bâtonnets ». D'après (Cox *et al.* 2007).

domaines NTD et CTD (Figure 22). Le domaine cœur contient un motif appelé « pli RecA » qui partage des similitudes avec d'autres protéines telles que des hélicases, protéines motrices et protéines de transport de l'ADN (Cox, 2007; Story and Steitz, 1992). Le domaine cœur est composé d'un site de fixation de l'ATP, d'un site de fixation d'ADN simple brin (site I) et d'un site de fixation de l'ADN double brin (site II) (Del Val et al., 2019). La protéine RecA a deux activités : recombinaise et co-protéase. Ces deux activités nécessitent la fixation de deux effecteurs : l'ADN simple brin (ADNsb) et un nucléoside triphosphate (NTP) (Craig and Roberts, 1981; Shibata et al., 1981). La protéine RecA est une ATPase dépendante de l'ADN, cependant son activité de co-protéase nécessite la fixation de l'ATP mais pas son hydrolyse (Gruenig et al., 2008). La protéine RecA joue un rôle essentiel dans la réparation des dommages à l'ADN. Elle est impliquée dans l'un des mécanismes de réparation de l'ADN, la recombinaison homologue : la protéine RecA liée à un ADNsb (provenant de cassure d'ADN double brin) initie la recherche de séquences homologues pouvant servir de matrice pour réparer la lésion et procède à l'échange des brins entre ADN lésé et matrice (Del Val et al., 2019). De plus, la protéine RecA est l'un des acteurs majeurs de la réponse SOS; elle stimule l'auto-clivage de la protéine LexA (activation de la réponse SOS) (Little, 1991) et de la protéine UmuD (la forme clivée de la protéine UmuD se lie avec la protéine UmuC pour former la polymérase translésionnelle V) (Jiang et al., 2009; Schlacher et al., 2006). Lors de l'induction de la réponse SOS le niveau de RecA peut atteindre 70 000 monomères par cellule (Sommer et al., 1998).

2. Mécanisme de régulation par la réponse SOS

La réponse SOS est une réponse bactérienne aux dommages de l'ADN, qui permet l'expression de gènes impliqués dans divers processus pour réparer l'ADN lésé et tolérer les dommages (Erill et al., 2007). Comme mentionné précédemment, la réponse SOS est gouvernée par deux régulateurs : RecA (activateur) et LexA (répresseur). En condition normale de croissance, la protéine LexA, répresseur transcriptionnel, est fixée à une séquence dite « LexA box » (boîte LexA) présente dans la région promotrice d'un ensemble de gènes

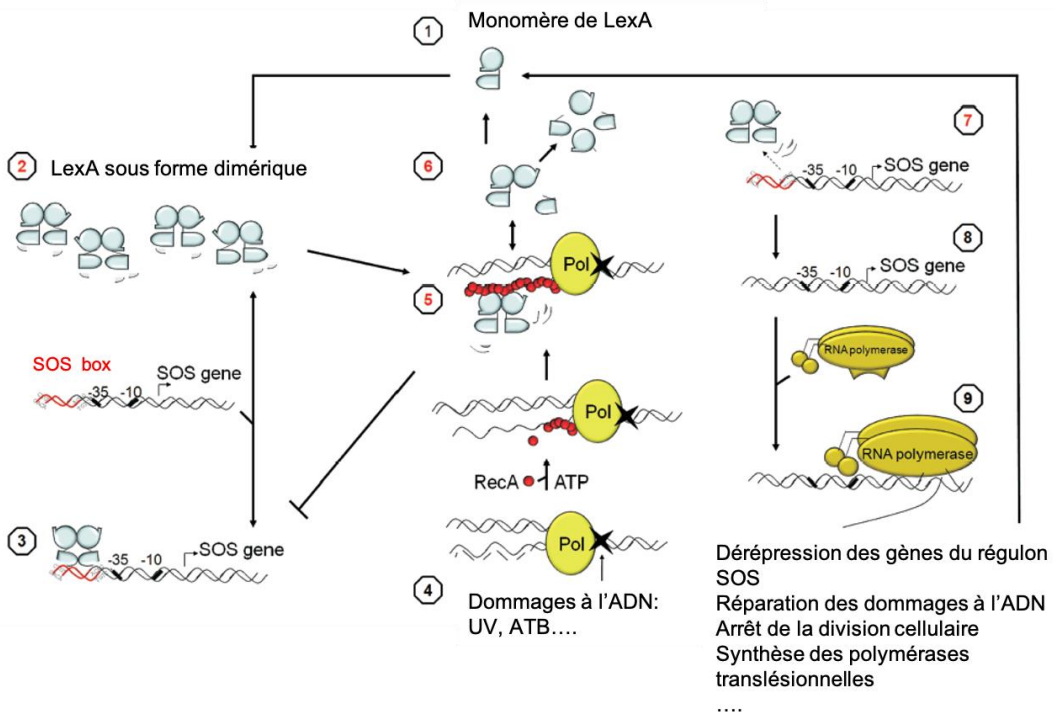


Figure 23 : La réponse SOS chez *E. coli*

(1) La concentration des monomères de LexA augmente; (2) Les monomères de LexA forment des dimères; (3) La répression des gènes SOS se produit lorsque les dimères de LexA se lient spécifiquement aux boîtes LexA situées dans les régions promotrices des gènes SOS et empêchent leur transcription par encombrement stérique; (4) Lorsque l'ADN est endommagé générant des fragments d'ADN simple brin (ADNsb), RecA se lie à l'ADNsb en présence d'ATP formant le filament nucléoprotéique (RecA*); (5) RecA* induit l'auto-clivage des protéines LexA libres (non liées à une boîte LexA) mais elle est incapable de stimuler l'auto-clivage des protéines LexA liées à l'ADN; (6) Les protéines LexA clivées sont rapidement dégradées par les protéases ClpXP et Lon; (7) Diminution de la concentration intracellulaire des protéines LexA. Les protéines LexA liées spécifiquement à une région promotrice se dissocient (8) aboutissant à la dérégulation des gènes SOS; (9) La cadence de dissociation des protéines LexA de leur site de fixation dépend de la séquence de ce dernier, ainsi la dérégulation des gènes SOS va suivre une dynamique particulière. D'après (Butala *et al*, 2011).

appelés « régulon SOS » (développé dans la section 4 de ce chapitre) réprimant ainsi leur expression. La boîte LexA est une séquence palindromique de 16 bp et de consensus 5'-TACTGTATATATACAGTA-3' chez *E. coli* (Baharoglu and Mazel, 2014; Erill et al., 2007). Elle est constituée de deux sites de liaison symétriquement inversés permettant de lier chacun une des 2 sous-unités du dimère de LexA (Thliveris et al., 1991). La boîte LexA est située généralement à proximité du site de liaison de l'ARN polymérase (ARNP), la protéine LexA empêche la fixation de l'ARNP à la région promotrice par encombrement stérique engendrant un blocage de la transcription des gènes du régulon SOS. Néanmoins, certains gènes du régulon SOS ont un niveau basal d'expression comme c'est le cas pour *recA* et *lexA*, niveau d'expression basal nécessaire pour que les deux protéines puissent assurer leurs rôles régulateur de la réponse SOS (Figure 23) (Courcelle et al., 2001).

Lorsque la bactérie subit un stress endogène ou exogène induisant la formation d'ADNsb, la réponse SOS est alors activée. L'ADNsb est reconnu et fixé par la co-protéase RecA formant un filament nucléoprotéique. Ce dernier va induire l'auto-clivage des protéines LexA libres (non liées à l'ADN) par interaction directe, cependant le mécanisme par lequel le filament nucléoprotéique interagit avec la protéine LexA n'est pas encore bien caractérisé (Hostetler et al., 2020; Kovačič et al., 2013). La concentration intracellulaire de protéine LexA diminue alors fortement ce qui entraîne la dissociation des protéines LexA dimériques fixées au niveau des séquences promotrices des gènes du régulon SOS. Par conséquent, l'ARNP peut initier la transcription des gènes jusque-là réprimés (Figure 23) (Butala et al., 2011; Sassanfar and Roberts, 1990).

Lors de l'induction de la réponse SOS, l'expression des différents gènes du régulon SOS (gènes SOS) n'est pas induite au même moment et au même niveau. En effet, la dérégulation des gènes SOS suit une dynamique bien particulière, elle est synchronisée en fonction du degré des dégâts subis et du temps écoulé depuis la détection des dommages (Butala et al., 2011; Courcelle et al., 2001; Henestrosa et al., 2000; Maslowska et al., 2019). Le niveau, le moment et la durée de l'induction des différents gènes SOS dépend de différents facteurs : (i) l'affinité et la force de liaison du répresseur LexA à son site de fixation, (ii) le

nombre et la localisation des sites LexA au niveau des régions promotrices et (iii) la force intrinsèque du promoteur (Butala et al., 2011; Maslowska et al., 2019). Les premiers gènes induits sont les gènes *uvr* permettant la réparation de l'ADN endommagé par le système NER (réparation par excision des nucléotides endommagés), suivi par les gènes codant des protéines impliquées dans la recombinaison homologue (*recA*, *recN*, *ruvAB*). Ensuite, les gènes *polB* et *dinB* codant respectivement les ADN polymérase II et IV sont exprimés. Le gène *sulA* aussi appelé *sfiA*, inhibiteur de la division cellulaire, est alors induit pour laisser à la bactérie le temps de terminer les réparations (Maslowska et al., 2019). Enfin, si les dommages ne sont toujours pas complètement réparés, l'expression de l'ADN polymérase de basse fidélité V codée par les gènes *umuC* et *umuD* est induite permettant de continuer la réplication même en présence de dommages. Cependant, cette enzyme est capable d'incorporer un bon comme un mauvais nucléotide au sein de l'ADN (elle est moins sélective), elle est aussi incapable de corriger ces erreurs favorisant une augmentation du taux de mutations spontanées (Courcelle et al., 2001; Henrikus et al., 2018; Maslowska et al., 2019). Le niveau d'expression des gènes SOS diffère. Par exemple certains gènes comme *sfiA*, *umuC* et *umuD*, sont exprimés faiblement à l'état basal mais sont induits fortement après les dommages de l'ADN, alors que d'autres, comme le gène *uvrB*, sont modérément induits suite aux dommages de l'ADN (Courcelle et al., 2001). Une fois le stress terminé et les réparations de l'ADN effectuées, le nombre d'ADNsb diminue, ce qui entraîne une diminution des taux de filaments nucléoprotéiques et de protéines LexA clivées. En même temps les stocks de dimères de LexA augmentent permettant de réprimer à nouveau les gènes SOS (Figure 23). De même que pour la dérèpression, la répression des gènes SOS une fois le stress terminé semble suivre une dynamique bien particulière (Ronen et al., 2002)

3. Facteurs déclenchant la réponse SOS

La réponse SOS est induite par la présence d'ADNsb. De façon spontanée chez la bactérie, des cassures d'ADN double brin aboutissant à la formation d'ADNs peuvent survenir

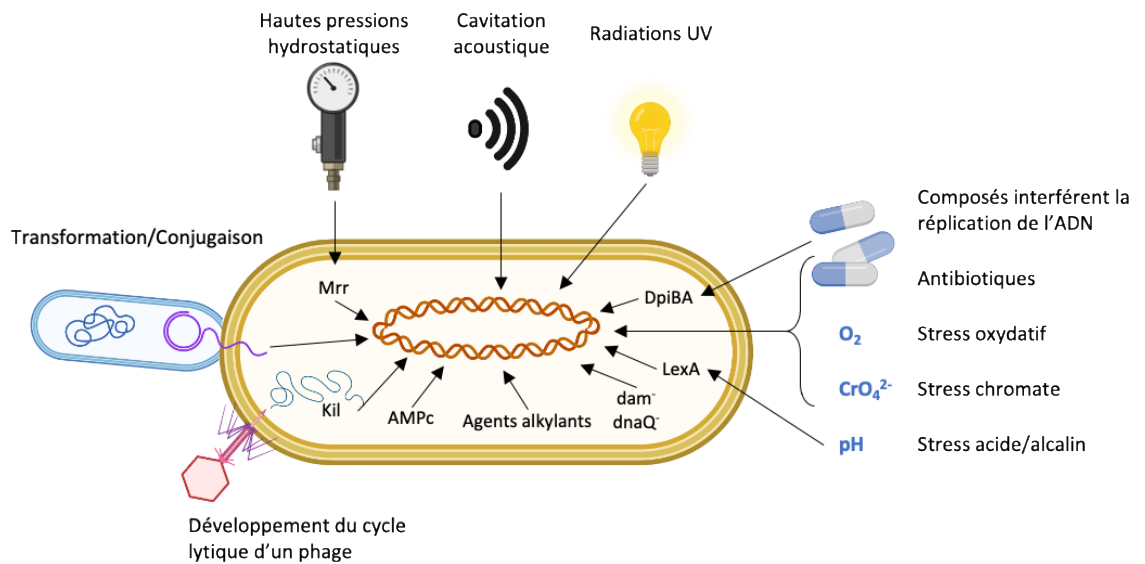


Figure 24 : Signaux induisant la réponse SOS

Liste des principaux inducteurs directs et indirects de la réponse SOS. Pour l'activation indirecte, les molécules intermédiaires impliquées dans l'induction de la réponse SOS sont montrées dans leur voie respective (vérifiées expérimentalement). Les mécanismes d'activation endogènes sont désignés par des noms de molécules/mutations sans flèches externes. Inspirée de (Erill *et al.* 2007) et réalisée par Ana Catalina Hernandez .

lors de la réplication, soit par arrêt de la fourche de réplication, soit par interférence entre les processus de réplication et de transcription (Baharoglu and Mazel, 2014). Ces lésions peuvent aussi avoir lieu lors de l'arrêt de la transcription et la formation de structures R-loops, des hybrides ARN-ADN qui se forment lors de la transcription (McGlynn et al., 2012). Différents stress exogènes peuvent aussi être à l'origine d'ADNsb (Figure 24). Les radiations UV sont les premières à être décrites comme inducteurs de la réponse SOS chez *E. coli* (Erill et al., 2007; Witkin, 1976). Les radiations gamma aussi ont été rapportées comme des inducteurs efficaces de la réponse SOS (Kuzminov, 1999; Wadhawan et al., 2013). D'autres stress tels que certains stress environnementaux (exposition aux polluants industriels tels que chromates) (Ackerley et al., 2006), les ultrasons (Vollmer et al., 1998) ou la pression hydrostatique (Aertsen et al., 2004; Aertsen and Michiels, 2005) ont été décrits comme inducteurs indirects de la réponse SOS.

Les antibiotiques peuvent aussi déclencher directement ou indirectement la réponse SOS. La mitomycine C (MMC), substance antinéoplasique, est l'une des molécules la plus connue, comme induisant la réponse SOS en provoquant directement des lésions de l'ADN. Certains antibiotiques peuvent déclencher la réponse SOS en provoquant l'arrêt de la réplication de l'ADN en perturbant la synthèse des purines et des pyrimidines (triméthoprim) (Lewin and Amyes, 1991) ou en bloquant l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (les fluoroquinolones) (Pohlhaus and Kreuzer, 2005). Il a aussi été rapporté que les β -lactamines (inhibiteur de la synthèse du peptidoglycane) sont capables d'induire indirectement la réponse SOS en perturbant la synthèse de la paroi bactérienne *via* le système à deux composants DpiAB. La protéine DpiB détecte le stress engendré par les β -lactamines au niveau de la paroi et phosphoryle le régulateur DpiA. La protéine DpiA phosphorylée va se lier à l'origine de réplication du chromosome empêchant la fixation des protéines de la réplication DnaA et DnaB. Par conséquent, la réplication est interrompue ce qui conduit à l'induction de la réponse SOS (Miller et al., 2004, 2003). De même, la norfloxacine (fluoroquinolones) et l'ampicilline (β -lactamines) induiraient indirectement la réponse SOS en stimulant la production d'espèces

réactives de l'oxygène communément appelées ROS provoquant un stress oxydatif chez la bactérie ce qui engendre des dommages de l'ADN et par conséquent l'induction de la réponse SOS (Kohanski et al., 2010). De plus, il a été montré que les aminosides, la tétracycline et le chloramphénicol, des antibiotiques ayant pour cible la traduction des protéines, peuvent aussi induire la réponse SOS chez *V. cholerae* mais pas chez *E. coli* (Baharoglu and Mazel, 2011). Il a aussi été montré que les aminosides induisent la réponse SOS chez *K. pneumoniae* et *Photobacterium luminescens* (Baharoglu et al., 2013). La réponse SOS peut être induite par des doses d'antibiotiques létales ou inférieures à la concentration minimale inhibitrice (CMI) dites concentrations « sub-inhibitrices ». Plusieurs études ont décrit l'induction de la réponse SOS chez différentes espèces bactériennes telles que *Salmonella enterica*, *V. cholerae* ou encore *E. coli*, exposées à des concentrations d'antibiotiques sub-inhibitrices (Yim et al., 2011; Baharoglu and Mazel, 2011; Gullberg et al., 2011). De plus en plus d'études rapportent aujourd'hui le rôle important des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques dans l'apparition et la dissémination de bactéries résistantes aux antibiotiques (Gullberg et al., 2011). Ceci est d'autant plus préoccupant que dans l'environnement, les antibiotiques sont retrouvés sous leurs formes natives et à de faibles concentrations.

Des molécules autres que des antibiotiques peuvent aussi induire directement ou non la réponse SOS. C'est le cas du triclosan, un biocide couramment retrouvé dans les produits cosmétiques, qui est capable d'induire chez *E. coli* un stress oxydatif conduisant à l'expression des gènes SOS (Lu et al., 2018), ou encore certaines molécules utilisées dans les traitements lors de chimiothérapies anticancéreuses (Meunier et al., 2019). C'est aussi le cas de messagers secondaires bactériens tels que certains nucléotides. Une étude a montré que la réponse stringente, réponse déclenchée par les bactéries lors de carence en nutriments (cette réponse sera développée dans le chapitre IV), augmente l'expression des gènes du régulon SOS (*recA*, *ruvA*, *smbC*, *sulA*, *umuD*, *yebG* et *lexA*) chez *E. coli* (Durfee et al., 2008). En effet, l'alarmone (p)ppGpp, médiateur de cette réponse, augmente le temps de pause dans l'élongation de la transcription ce qui provoque la formation de R-loops, des structures connues pour induire la réponse SOS (Kingston et al., 1981; Krohn and Wagner, 1996; Gan et al.,

Table 3 : Liste de gènes appartenant au régulon SOS chez *E. coli* (D'après Maslowska, 2019)

Gènes	Fonctions
<i>cho (ydjQ)</i>	Endonucléase de réparation par excision
<i>dinB</i>	ADN polymérase translésionnelle IV
<i>dinD</i>	Fonction inconnue
<i>dinF</i>	Fonction inconnue, gène immédiatement en aval de <i>lexA</i>
<i>dinG</i>	ADN hélicase
<i>dinI</i>	Activateur et répresseur de la protéine RecA (en fonction de la concentration cellulaire de la protéine)
<i>dinQ</i>	Toxine localisée au niveau de la membrane
<i>dinS</i>	Fonction inconnue
<i>ftsK</i>	Protéine intervenant dans la division cellulaire
<i>hokE</i>	Polypeptide toxique
<i>lexA</i>	Répresseur transcriptionnelle de la réponse SOS
<i>molR</i>	Régulateur du métabolisme de molybdate
<i>polB</i>	ADN polymérase translésionnelle II avec une activité de correction des erreurs
<i>recA</i>	Recombinase, induit l'auto-clivage de LexA
<i>recN</i>	Recombinaison et réparation de l'ADN
<i>recX</i>	Inhibiteur de RecA, gène immédiatement en aval de <i>recA</i>
<i>rmuC</i>	Protéine limitant les recombinaisons (Prédiction)
<i>ruvAB</i>	Hélicase (sous unité A et B), se lie aux jonctions de Holliday
<i>sbmC</i>	Inhibiteur de l'activité de l'ADN gyrase
<i>ssb</i>	Se lie à l'ADN simple brin, impliqué dans différents processus de réparation
<i>sulA (sfiA)</i>	Inhibiteur de la division cellulaire en se liant à FtsZ
<i>umuDC</i>	ADN polymérase translésionnelle V
<i>uvrA</i>	Nucléase, excision des nucléotides (sous unité A)
<i>uvrB</i>	Nucléase, excision des nucléotides (sous unité B)
<i>uvrD</i>	Hélicase impliquée dans la réparation des mésappariements
<i>ybfE</i>	Fonction inconnue
<i>ydjM</i>	Protéine de la membrane interne
<i>yebG</i>	Fonction inconnue
<i>symE</i>	Toxine, endoribonucléase impliqué dans la dégradation des ARNs endommagé
<i>tisAB</i>	Peptide toxique

2011). De plus, il a été démontré chez une souche de *E. coli* privée de nutriments, que l'induction de la réponse SOS dépendait du niveau d'AMP cyclique intracellulaire (Taddei et al., 1995).

En plus des dommages de l'ADN, certains mécanismes de transfert horizontal de gènes comme la conjugaison (transfert d'ADN plasmidique d'une bactérie donneuse vers une bactérie receveuse) et la transformation (acquisition d'ADN libre par une bactérie compétente) génèrent de l'ADNsb. En effet, le transfert de l'ADN lors de la conjugaison ou de la transformation se fait sous forme de simple brin, ADNsb qui pourra être reconnu par la protéine RecA pour former un filament nucléoprotéique qui activera la réponse SOS. Les travaux de Baharoglu *et al* ont ainsi démontré que la transformation chez *V. cholerae* (bactérie naturellement compétente), et la conjugaison chez *V. cholerae* et *E. coli* induisent la réponse SOS (Baharoglu et al., 2012, 2010).

4. Le régulon SOS

Il est difficile de définir précisément le régulon SOS chez une espèce bactérienne, les gènes induits sont différents en fonction du type et de la dose des dommages subis ainsi que d'autres critères physiologiques. Storz *et al* ont comparé trois études d'analyse par microarray, deux après traitement aux UV et une après un traitement à la mitomycine C (Courcelle et al., 2001; Khil and Camerini-Otero, 2002; Quillardet et al., 2003), et ils ont observé que seulement 5 gènes communs sont induits dans les trois études : *sfiA*, *recA*, *recN*, *dinD* et *dinB*. (Storz and Hengge, 2011). Une étude comparant l'expression de gènes à la suite de dommages causés par sept agents différents (UV, rayons ionisants, quinolones...) a mis en évidence un réseau de gènes induits par chacun des stress testés, appelé « module LexA » comprenant les gènes : *recA*, *recN*, *recX*, *dinI*, *dinF*, *lexA*, *polB*, *ruvAB*, *ssb*, *sfiA*, *umuDC*, *uvrAB* et *ydjM* (Hong et al., 2009). Mais il est aujourd'hui admis que chez *E. coli*, le régulon SOS regroupe plus de 50 gènes impliqués dans différents processus cellulaires en réponse aux dommages de l'ADN comme la recombinaison homologue, l'inhibition de la division cellulaire, la réparation et la réplication de l'ADN (Table 3) (Maslowska et al., 2019). Bien que la réponse SOS soit un

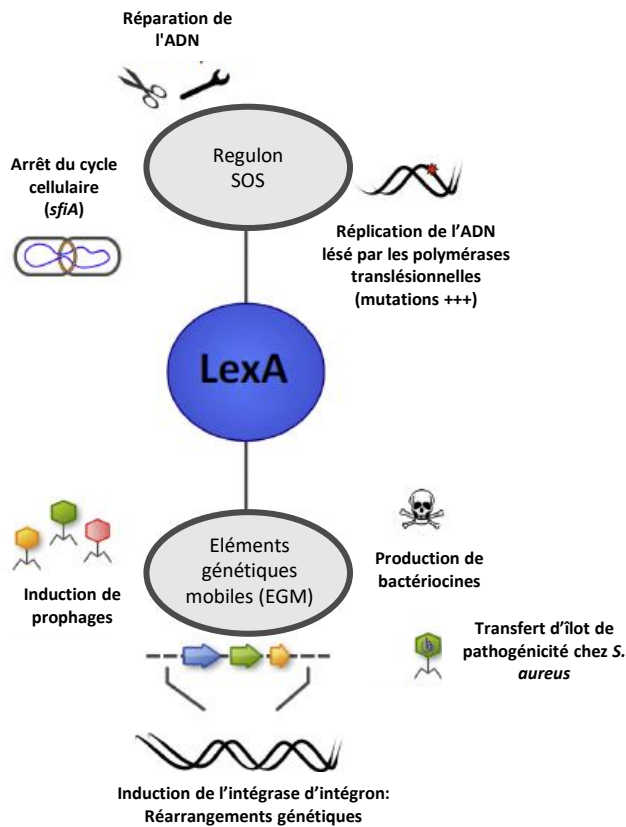


Figure 25 : Vue d'ensemble des processus régulés par la réponse SOS

La protéine LexA réprime les gènes du régulon SOS impliqués dans la réparation de l'ADN et l'arrêt du cycle cellulaire. Elle module également l'expression des gènes codés par des éléments génétiques mobiles (EGM), dont l'induction peut entraîner des réarrangements génétiques, le transfert des EGMs, l'induction de prophages, la production de bactériocines et le transfert d'îlots de pathogénicité chez *S. aureus*. D'après (Fornelos et al. 2016).

système bactérien quasi universel, le régulon SOS diffère d'une espèce bactérienne à une autre en nombre et type de gènes induits. En effet, les gènes induits par la réponse SOS chez des bactéries comme *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* et *P. aeruginosa* sont assez semblables, cependant certaines divergences existent par rapport à ceux induits chez *E. coli*, ces divergences concernent même des gènes impliqués dans la réparation et la tolérance des dommages à l'ADN (Au et al., 2005; Cirz et al., 2006, 2005; Courcelle et al., 2001; Kreuzer, 2013). La fonction des gènes induits par la réponse SOS semble donc être finement ajustée par rapport à la biologie de l'organisme hôte (Kreuzer, 2013).

Les gènes du régulon SOS sont en général caractérisés par la présence dans leur région promotrice, d'une boîte LexA à laquelle se fixe la protéine LexA. La séquence consensus de cette dernière varie en fonction des espèces bactériennes (Baharoglu and Mazel, 2014). Cependant, il existe certains gènes (*dinJ*, *yigN*, *intl2*) possédant une boîte LexA putative au sein de leur région promotrice, mais qui ne sont pas régulés par la réponse SOS (Henestrosa et al., 2000; Jové et al., 2017). De plus, il existe chez *E. coli* un ensemble de 19 gènes qui ne possèdent pas de boîte LexA canonique dans leur région promotrice, mais qui semblent pouvoir lier la protéine LexA *in vitro* probablement par l'intermédiaire de facteurs additionnels (Wade et al., 2005).

5. La réponse SOS, acteur majeur de la survie des bactéries aux traitements antibiotiques

Au-delà de son rôle dans la réparation des dommages à l'ADN, la réponse SOS est aujourd'hui impliquée dans différents processus permettant aux bactéries de s'adapter et de survivre à différents stress. La réponse SOS est aujourd'hui reconnue comme acteur majeur de l'acquisition et de la dissémination de la résistance aux antibiotiques (Figure 25) (Baharoglu and Mazel, 2014; Fornelos et al., 2016). Les ADN-polymérases translésionnelles font partie des gènes du régulon SOS (Table 3). Ces polymérases (Pol IV et Pol V) sont incapables de corriger leurs erreurs lors de l'incorporation de mauvais nucléotides (activité de « proof-reading »), ce qui favorise l'apparition de mutations parmi lesquelles des mutations de

résistances aux antibiotiques (Baharoglu and Mazel, 2014; Maslowska et al., 2019). Une étude a ainsi montré une étroite corrélation entre quantité de la forme clivée de la protéine UmuD (UmuD clivée se lie avec à la protéine UmuC pour former la polymérase translésionnelle UmuD₂C ou V), et fréquence d'apparition de mutations chez une souche d' *E. coli* (Ni et al., 2008). Meunier *et al.* ont récemment décrit que l'induction de la réponse SOS par des molécules utilisées en chimiothérapies anticancéreuses (dacarbazine, azacitidine ou streptozotocinone) a conduit chez différentes espèces bactériennes à l'augmentation de la fréquence de mutants résistants *in vitro*: augmentation de la fréquence de *P. aeruginosa* résistants à l'imipénème, de *S. aureus* résistants à la ciprofloxacine et d'*E. cloacae* résistants à la céfotaxime (Meunier et al., 2019). Il a aussi été montré dans un modèle d'infection *in vivo* chez le lapin par une souche d' *E. coli* enteropathogène, une augmentation de la fréquence de mutants résistants à la rifampicine et la fosfomycine après induction de la réponse SOS par la ciprofloxacine ou la zidovudine (Crane John K. et al., 2021).

La réponse SOS peut aussi jouer un rôle direct dans la régulation de l'expression de certains gènes de résistances et de systèmes permettant la dissémination des gènes de résistances. En effet, une étude a montré que le gène *qnrB2*, appartenant à la famille des gènes *qnr* qui protègent l'ADN gyrase de l'inhibition par les quinolones (Jacoby et al., 2008), est régulé par la réponse SOS : il possède une boîte LexA dans sa région promotrice et est induit après un traitement à la ciprofloxacine de façon LexA et RecA dépendante (Da Re et al., 2009). Ainsi, la résistance aux quinolones est induite par les quinolones elles-mêmes ou d'autres antibiotiques activant la réponse SOS. De ce fait, la réponse SOS est un outil puissant permettant à la bactérie de retourner les agressions qu'elle peut rencontrer en sa faveur (Baharoglu and Mazel, 2014). Une autre étude menée au laboratoire en collaboration avec l'équipe du Pr Didier Mazel à l'institut Pasteur, a montré que chez *E. coli* la réponse SOS active l'expression de *intl1*. L'intégrase d'intégron de classe 1 est alors capable de catalyser la capture et le réarrangement de cassettes de gène (codant essentiellement des gènes de résistances aux antibiotiques) (Guerin et al., 2009). Une étude *in vivo* a apporté la preuve de la contribution de la réponse SOS dans l'acquisition et l'expression des gènes de résistances

aux antibiotiques *via* les intégrons. En effet, l'étude de Hocquet *et al.* a montré chez un patient souffrant d'infection pulmonaire qu'un traitement au métronidazole a induit l'expression du gène de l'intégrase *via* la réponse SOS conduisant à un réarrangement des cassettes de gène et à l'expression de résistance aux β -lactamines chez une souche de *P. aeruginosa* (Hocquet *et al.*, 2012).

La réponse SOS permet aussi la dissémination des gènes de résistance en induisant le transfert horizontal de gène. L'induction de la réponse SOS entraîne l'augmentation de la fréquence de transfert de l'élément intégratif conjugatif SXT (élément mobile retrouvé chez *V. cholerae* contenant des gènes conférant la résistance au chloramphénicol, au sulfaméthoxale, au triméthoprim et à la spectinomycine) entre bactéries (Beaber *et al.*, 2004). Lors de l'induction de la réponse SOS, le filament nucléoprotéique RecA-ADNsb va entraîner, comme pour LexA, l'auto-clivage de la protéine SetR qui réprime les promoteurs des gènes *setC* et *setD*, activateurs transcriptionnels des gènes impliqués dans le transfert de l'élément SXT (Beaber *et al.*, 2004). Une autre étude a montré qu'à la suite de l'exposition d'une souche de *Salmonella* aux fluoroquinolones, la réponse SOS a induit l'excision d'un prophage du chromosome de la bactérie favorisant ainsi le transfert par transduction d'un plasmide portant des gènes de résistances aux antibiotiques (Bearson and Brunelle, 2015).

Enfin, la réponse SOS participe aussi à la formation de bactéries persistantes. Ces bactéries sont capables de survivre transitoirement à un traitement antibiotique bactéricide à fortes doses (Balaban *et al.*, 2019; Brauner *et al.*, 2016). Contrairement à la résistance, la persistance est un phénomène réversible, la survie des bactéries aux antibiotiques étant généralement due au ralentissement de leurs fonctions métaboliques. En effet, les travaux de Dörr *et al.* ont montré que l'activation de la réponse SOS induit l'expression de la toxine TisB du couple toxine-antitoxine *tisAB/istR*. Cette toxine se lie à la membrane interne, perturbe la force proton-motrice, faisant chuter le niveau d'ATP dans la cellule ce qui conduit au ralentissement du métabolisme de la bactérie la rendant insensible à l'activité de l'antibiotique (Dörr *et al.*, 2009, 2010). De plus, une étude récente a montré qu'une réponse SOS active était nécessaire à la formation de bactéries persistantes en biofilm à la suite d'un traitement

par l'ofloxacine (fluoroquinolones). Les auteurs ont montré que, contrairement à l'étude de Dörr *et al.*, la réponse SOS est induite lors de la formation du biofilm lui-même et non pas lors de l'ajout de l'antibiotique et que le mécanisme de formation des bactéries persistantes est indépendant des systèmes toxines-antitoxines (Bernier *et al.*, 2013) En plus de son rôle majeur dans la formation de bactéries persistantes, la réponse SOS permet aussi d'accélérer le développement de bactéries résistantes à partir de bactéries persistantes. En effet, l'étude de Barrett *et al.* a montré que des bactéries persistantes aux fluoroquinolones avaient plus de chance de devenir résistantes à différentes classes d'antibiotiques que la souche sauvage. Les auteurs rapportent que cette accélération de développement de bactéries résistantes était due à l'induction de la réponse SOS et à l'activation de la polymérase translésionnelle V (Barrett *et al.*, 2019).

6. La réponse SOS : une cible prometteuse pour le développement de nouvelles stratégies antibactériennes.

La résistance des bactéries aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique. Bien que beaucoup d'efforts aient été mis en œuvre pour développer de nouveaux antibiotiques capables d'éviter les mécanismes de résistance connue à ce jour, l'histoire a montré que ces stratégies seules étaient insuffisantes pour résoudre le problème de l'antibiorésistance (Fischbach and Walsh, 2009). Les antibiotiques utilisés actuellement en médecine humaine ciblent des fonctions essentielles à la survie des bactéries. Ces dernières décennies de nouvelles stratégies visant à atténuer la virulence bactérienne ou encore à potentialiser l'effet d'antibiotiques existants ont été proposées et sont en cours d'étude (Baker *et al.*, 2018).

La réponse SOS semble être une cible prometteuse pour développer de nouvelles stratégies adjuvantes pour renforcer notre arsenal antibiotique. L'inactivation de la réponse SOS aurait en effet un triple avantage : (i) augmenter la sensibilité des bactéries aux antibiotiques connus pour endommager l'ADN ; (ii) diminuer la capacité de la bactérie à acquérir et disséminer les gènes de résistance ; (iii) cibler de nombreuses bactéries (système

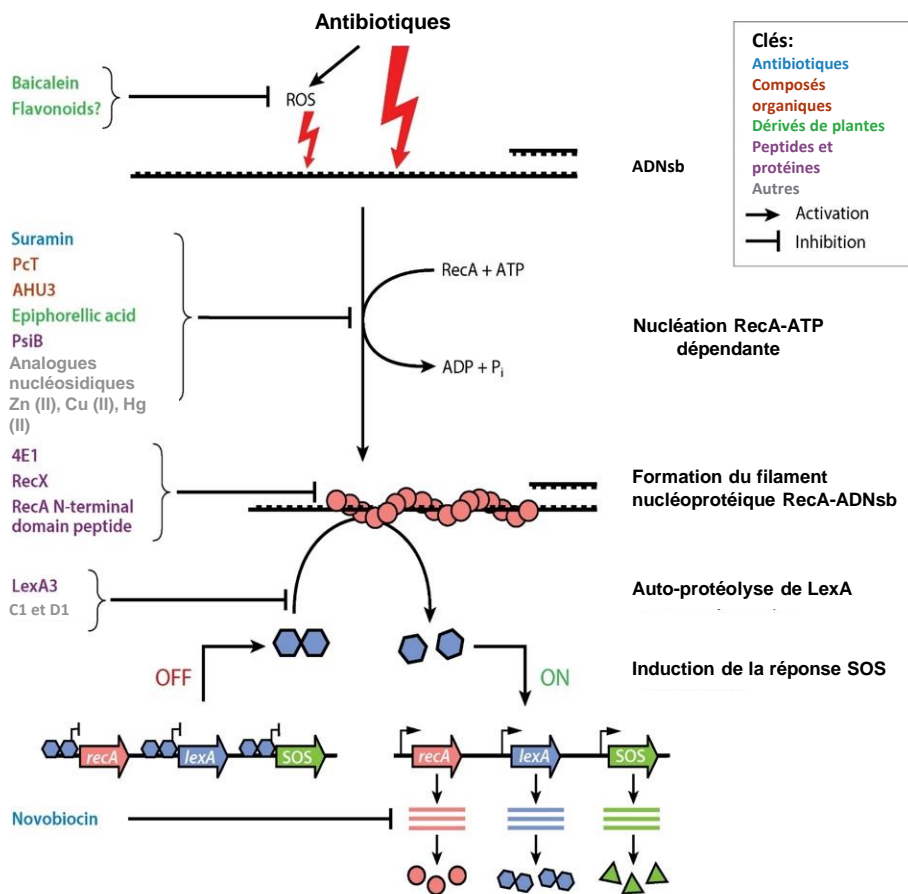


Figure 26 : Stratégies thérapeutiques développées pour inhiber la réponse SOS

Certains antibiotiques causent des dommages à l'ADN (symbolisés par la « foudre » en rouge), soit directement, soit par l'induction de ROS, et génèrent de l'ADN simple brin (ADNsb), qui forme avec RecA (cercles roses) le filament nucléoprotéique RecA-ADNsb. Ce dernier catalyse l'autoprotéolyse de LexA (hexagones bleus) ce qui permet l'induction de l'expression des gènes du régulon SOS.

Plusieurs composés qui inhibent l'induction de la réponse SOS sont représentés sur le schéma en fonction de l'étape de la réponse SOS qu'ils ciblent. Ils sont aussi codés par couleur selon la classe à laquelle ils appartiennent (boite clés sur le schéma). D'après (Blazquez *et al.*, 2018).

de réparation de l'ADN plutôt très conservé). Déjà, des études menées dans les années 70 rapportaient que des mutations dans les gènes *recA* ou *lexA* augmentaient la sensibilité des bactéries à des agents endommageant l'ADN comme les UVs (Mount et al., 1972; Witkin, 1976). Plus récemment il a été démontré que l'inactivation de l'activité d'auto-protéolyse de LexA chez une souche d'*E. coli* réduisait la capacité de la souche à muter *in vivo* et donc d'acquérir des mutations de résistance à la ciprofloxacine ou à la rifampicine (Cirz et al., 2005). De même, Thi *et al.* ont montré que la délétion du gène *recA* chez une souche d'*E. coli* rendait la souche incapable de muter et augmentait sa sensibilité à certains antibiotiques (Thi et al., 2011). Une étude originale récente a testé l'effet de l'inactivation de la réponse SOS (délétion du gène *recA*) chez des souches d'*E. coli* résistantes aux fluoroquinolones *via* différents mécanismes (mutation chromosomique dans les gènes *gyrA* et *parC*, en combinaison ou non avec un plasmide portant le gène *qnrS*). Ces souches avaient des niveaux de résistance allant de faible à fort. Les auteurs ont montré qu'en inactivant la réponse SOS, l'activité de différentes fluoroquinolones sur ces souches était restaurée avec une diminution de la CMI d'au moins 8 fois par rapport à la souche sauvage (*recA+*), faisant parfois passer une souche de la catégorie clinique résistante à la catégorie sensible, ou intermédiaire selon les recommandations de l'EUCAST (Recacha et al., 2017). De plus, dans un modèle de sepsis péritonéal murin, l'inactivation de la réponse SOS chez une souche initialement résistante aux fluoroquinolones augmentait significativement l'efficacité du traitement par la ciprofloxacine (Recacha et al., 2017). Ainsi ces auteurs ont démontré que l'inactivation de la réponse SOS permettait de resensibiliser les bactéries résistantes au traitement antibiotique.

Aux vues de ces différents résultats prometteurs, il n'est pas surprenant qu'une multitude d'études ait exploré l'inhibition de la réponse SOS comme cible thérapeutique pour limiter le développement de la résistance aux antibiotiques. Certaines études ont ciblé la protéine RecA et d'autres la protéine LexA (Figure 26), les différentes molécules identifiées sont regroupées sous le nom DISARMERs (drugs that inhibit SOS activation to repress mechanisms enabling resistance) (Blázquez et al., 2018; Merrikh and Kohli, 2020; Yakimov et al., 2021). Parmi les approches visant la protéine LexA, Lu et Collins ont développé un

bactériophage capable de surexprimer un variant non clivable de la protéine LexA. L'infection de souches d' *E. coli* par ce prophage a inhibé l'induction de la réponse SOS et a potentialisé l'activité de la norfloxacin dans un modèle d'infection murin augmentant considérablement la survie des souris infectées (Lu and Collins, 2009). *Mo et al.* ont eux réalisés un criblage à haut débit de collections de composés chimiques, et ont identifié des molécules « leads » capables de bloquer l'auto-protéolyse de LexA (Mo et al., 2018). L'une de ces molécules, après optimisation, a permis l'inhibition de l'auto-protéolyse de LexA chez *E. coli* et *P. aeruginosa* tout en réduisant l'acquisition de résistance *in vivo* après exposition aux antibiotiques (Selwood et al., 2018). La recherche de molécules inhibant l'activité ATPase de RecA a elle aussi donné lieu à de nombreux composés potentiellement intéressants (Bellio et al., 2017; Peterson et al., 2012; Wigle et al., 2009; Wigle and Singleton, 2007). Par exemple, les composés PcT (phthalocyanine tetrasulfonates) potentialisent l'activité bactéricide de plusieurs antibiotiques (quinolones, aminosides et β -lactamines) tout en réduisant le nombre de mutants après un traitement à la ciprofloxacine, à la fois *in vitro* et dans un modèle murin d'infection (Alam et al., 2016; Blázquez et al., 2018). L'étude de Alam *et al.* est la première dans laquelle l'activité d'un inhibiteur de la réponse SOS a été démontrée *in vivo*, soulignant les avantages potentiels de l'inhibition de la réponse SOS comme cible thérapeutique et ouvrant la voie à de futures études.

Malgré le potentiel thérapeutique des inhibiteurs de RecA, il convient de souligner que des homologues de RecA ont été trouvés dans des cellules eucaryotes, notamment la protéine Rad51 humaine (Kawabata et al., 2005). Le développement d'inhibiteurs de RecA à des fins thérapeutiques doit donc être entrepris avec soin pour cibler sélectivement la protéine procaryote. À l'inverse, LexA est une cible potentiellement sûre, car aucun homologue eucaryote n'a été trouvé (Blázquez et al., 2018; Merrikh and Kohli, 2020). Cependant LexA n'est pas présent chez les bactéries du genre *Acinetobacter* (Hare et al., 2012) et des espèces *Streptococcus pneumoniae* (Gasc et al., 1980; Prudhomme et al., 2006), *Legionella pneumophila* (Charpentier et al., 2011), des bactéries qui causent aujourd'hui des infections

sérieuses en clinique. Une approche adjuvante visant LexA ne pourra donc pas être utilisée pour toutes les infections bactériennes.

Chapitre IV. La réponse stringente

En 1952, Sands et Robert ont observé une diminution de la concentration des ARN stables (ARNt et ARNr) chez *E. coli* lors de carences en acides aminés (aa) dans le milieu de culture (Cashel and Gallant, 1969). L'étude de mutants dans lesquels la concentration d'ARN stables ne diminuait pas lors de carences en aa a permis d'identifier le gène *relA* (Alfoldi et al., 1962). En 1969, Cashel et Gallant ont comparé le profil nucléotidique de souches d'*E. coli* *relA*⁺ et *relA*⁻ soumises à une carence en aa par chromatographie en couche mince, et ont visualisé deux tâches qu'ils ont surnommées « magic spots » (Cashel and Gallant, 1969). Ces derniers ont été identifiés plus tard comme étant des dérivés hyperphosphorylés de la guanosine : guanosine tétraphosphate « ppGpp » et guanosine pentaphosphate « pppGpp » appelés collectivement (p)ppGpp, ou alarmones (Cashel and Kalbacher, 1970; Haseltine and Block, 1973). En 1971, Lazzarini *et al.* ont constaté que des souches *relA*⁺ étaient capables de produire du (p)ppGpp lors de carences autres qu'en aa (Lazzarini et al., 1971). Quelques années plus tard, SpoT a été identifié comme étant capable de synthétiser du (p)ppGpp en réponse à différents stimuli (voir section 1.3 de ce chapitre).

Des études ultérieures vont révéler que le (p)ppGpp est responsable de l'activation de la réponse stringente, une réponse au stress hautement conservée chez les bactéries. Cette réponse, régulée par les protéines RelA et SpoT, est induite lors de la privation en nutriments. Elle permet de réorganiser le métabolisme et la physiologie des bactéries afin d'économiser de l'énergie et d'assurer leur survie jusqu'à la fin du stress (Irving et al., 2021; Ronneau and Hallez, 2019). Depuis sa découverte, le (p)ppGpp a aussi été impliqué dans différents processus comme la virulence, la tolérance et la résistance aux antibiotiques.

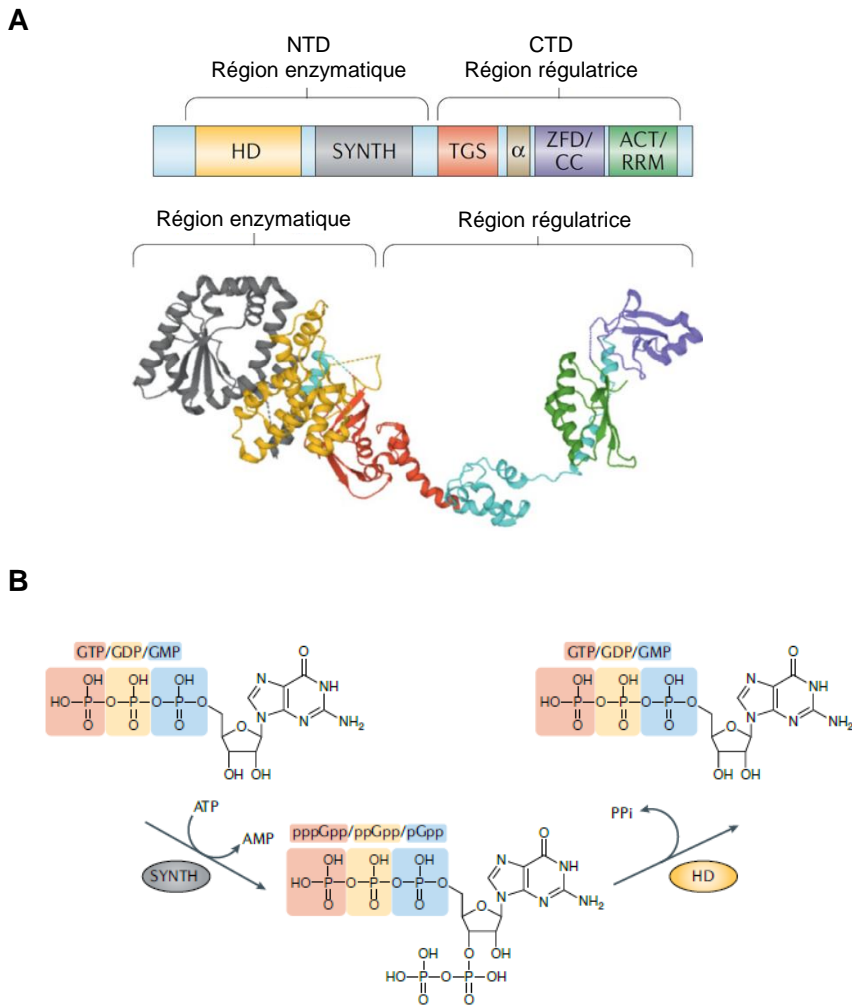


Figure 27 : Architecture des enzymes RSH, synthèse et hydrolyse du (p)ppGpp

A. Architecture et structure des domaines de l'enzyme RSH longue (RelA) d'*Escherichia coli*.

Représentation schématique des domaines de la protéine RelA constituée d'un domaine N-terminal (NTD) ou région enzymatique, et d'un domaine C-terminal (CTD) ou région régulatrice. Le NTD est constitué des domaines hydrolase, HD (orange ; inactif dans RelA) et synthétase, SYNTH (gris). La CTD contient quatre domaines : la région TGS (ThrRS, GTPase et SpoT ; rouge), un domaine α -hélicoïdal (α ; taupe), le domaine ZFD/CC (zinc-finger/cystéine conservé; violet) et le domaine ACT/RRM (aspartate kinase, chorismate et TyrA/motif de reconnaissance de l'ARN; vert). En dessous on trouve la structure cristallographique de RelA (Protein Data Bank ID 5KPX) avec les différents domaines représentés selon le code couleur ci-dessus. D'après (Irving, 2021).

B. Synthèse et hydrolyse du (p)ppGpp.

Le domaine synthétase (SYNTH) des enzymes RSH (RelA/SpoT homologue) catalyse le transfert d'un groupe pyrophosphate de l'ATP à la partie ribose du GTP, GDP ou GMP pour produire de la guanosine pentaphosphate (pppGpp), de la guanosine tétraphosphate (ppGpp) ou de la guanosine 5'-monophosphate 3'-diphosphate (pGpp), respectivement. Cette réaction génère également une molécule d'AMP. A l'inverse, le domaine hydrolase (HD) est responsable de l'élimination du groupe pyrophosphate (PPI) pour récupérer du GTP, du GDP ou du GMP. D'après (Irving, 2021).

1. Régulateurs de la réponse stringente

1.1. Architecture et distribution des enzymes RSH

Il est aujourd'hui bien connu que les enzymes de la famille RSH (pour RelA/SpoT Homologs) sont responsables de la synthèse et de la dégradation du (p)ppGpp. Il existe trois classes d'enzymes RSH en fonction de leurs tailles et des domaines qui les composent. On retrouve des enzymes RSH dites longues « Long RSH », qui sont constituées de deux régions : une région enzymatique N-terminale constituée de deux domaines catalytiques, un domaine synthétase (SD) et un domaine hydrolase (HD), et d'une région régulatrice C-terminale qui contient deux domaines régulateurs (TGS et ACT), un domaine doigts de zinc (ZDF) et un domaine α -helical (Figure 27A) (Atkinson et al., 2011; Brown et al., 2016, 2016; Irving et al., 2021; Ronneau and Hallez, 2019) (Brown et al., 2016). Il existe des enzymes RSH longues bifonctionnelles (SD⁺, HD⁺) et d'autres monofonctionnelles (SD⁺, HD⁻). Il existe aussi des enzymes RSH dites courtes avec un domaine unique, les « Short monodomain RSH » dont il existe deux classes : les SASs (small alarmone synthetases) possédant uniquement un domaine synthétase, SD, et les SAHs (small alarmone hydrolases) possédant uniquement un domaine hydrolase, HD (Atkinson et al., 2011; Irving et al., 2021). Les enzymes RSH ayant un domaine SD actif sont responsables de la synthèse du (p)ppGpp par transfert d'un groupement pyrophosphate de l'ATP au GMP, GDP ou GTP en position 3' OH du ribose (Figure 27B) (Lipmann and Sy, 1976). Les enzymes RSH ayant un domaine HD sont capables de dégrader le (p)ppGpp en clivant le 3'pyrophosphate (PPi) ce qui libère du GMP, GDP ou GTP (Figure 27B) (Sy, 1977).

E. coli, comme la plupart des organismes appartenant aux classes des Beta-protéobactéries et des Gamma-protéobactéries, contient deux enzymes RSH longues : une enzyme monofonctionnelle RelA et une enzyme bifonctionnelle SpoT (Atkinson et al., 2011). Certaines bactéries Gram négative comme *V. cholerae* comportent en plus des deux enzymes RSH longues, une enzyme RSH courte SAS, ceci reste cependant rare (Atkinson et al., 2011). En revanche, les enzymes RSH courtes SAS et SAH sont couramment retrouvées chez les

bactéries à Gram positif en combinaison avec une seule enzyme RSH longue bifonctionnelle (Rel) (Atkinson et al., 2011).

1.2. Le régulateur RelA

L'expression de *relA* est finement régulée par 4 promoteurs : P1, promoteur constitutif actif en phase exponentielle de croissance (Metzger et al., 1989), P2, promoteur induit pendant la transition entre phase exponentielle et phase stationnaire (Nakagawa et al., 2006), et les promoteurs P3 et P4 qui sont activés lors de carences en azote (Brown et al., 2014).

La protéine RelA (743 aa, 84 kDa) est une enzyme RSH longue et monofonctionnelle, son domaine hydrolase est inactif (Aravind and Koonin, 1998). RelA synthétise du (p)ppGpp en réponse à une carence en aa (Cashel and Gallant, 1969) en détectant la présence d'ARNt non chargés (Haseltine and Block, 1973). En condition de croissance normale (suffisamment d'aa dans le milieu), la protéine RelA adopte une conformation dite « fermée » qui empêche la synthèse du (p)ppGpp (Arenz et al., 2016; Brown et al., 2016). En effet, la région C-terminale inhibe l'activité synthétase de la protéine à l'état basal (Gropp et al., 2001; Schreiber et al., 1991). Le mécanisme de cette inhibition n'est pas encore élucidé mais deux hypothèses sont largement favorisées : (i) interaction intramoléculaire entre la région C-terminale et N-terminale (Mechold et al., 2002) ou (ii) oligomérisation de la région C-terminale (Gropp et al., 2001; Jain et al., 2006). L'activation de la synthèse du (p)ppGpp nécessite l'interaction de trois éléments : la protéine RelA, l'accumulation d'ARNt non chargés et des ribosomes bloqués. La localisation de la protéine RelA dans la cellule à l'état basal et le mécanisme exact de reconnaissance entre RelA et les ARNt non chargés sont encore sujets à controverse, il existe à ce jour deux modèles pertinents dans la littérature. Le premier propose que la région C-terminale de la protéine RelA se fixe au ribosome dans une zone proche du site accepteur A et que la région N-terminale est flottante et inactive ; lors de carences en aa, des ARNt non chargés se fixent au site accepteur A du ribosome ce qui permet une interaction entre les ARNt non chargé et RelA activant la synthèse de (p)ppGpp (Figure 28A) (Kudrin et al., 2018; Loveland et al., 2016). Le deuxième modèle propose que RelA, libre dans le cytoplasme,

reconnaît l'ARNt non chargé et s'y lie par le biais de sa région C-terminale puis l'amène jusqu'au site accepteur A du ribosome. Une fois le complexe dans le ribosome, le domaine SD de RelA devient actif et synthétise du (p)ppGpp (Figure 28B) (Winther et al., 2018). Ces deux modèles se rejoignent dans la nécessité de formation d'un complexe stable entre la région C-terminale de RelA, l'ARNt non chargé et le site A du ribosome pour permettre à la protéine d'adopter une conformation dite « ouverte » permettant la synthèse du (p)ppGpp (Arenz et al., 2016; Brown et al., 2016; Loveland et al., 2016; Winther et al., 2018). Le (p)ppGpp peut aussi se lier de façon allostérique à la région N-terminale de RelA, lorsque la protéine adopte sa conformation ouverte et est liée au ribosome, stimulant sa propre synthèse (Figure 28B) (Kudrin et al., 2018; Shyp et al., 2012).

Il est à noter qu'en plus des carences en aa dues à un manque d'aa dans le milieu, un autre mécanisme peut induire la carence en acide glutamique (Glu). En effet, chez *E. coli*, la toxine HipA inhibe l'activité de la glutamyl-ARNt-synthétase en la phosphorylant, empêchant ainsi l'aminacylation (activation de l'aa et son transfert sur l'ARNt) (Germain et al., 2013; Kaspy et al., 2013). Par conséquent, en présence de la protéine HipA, les ARNt^{Glu} non chargés s'accumulent dans la cellule, ce qui activera RelA et la synthèse de (p)ppGpp (Figure 28B).

1.3. Le régulateur SpoT

La protéine SpoT (702 aa 79 kDa) est une enzyme RSH bifonctionnelle. Elle a une faible activité synthétase en comparaison à RelA, son activité principale est la dégradation du (p)ppGpp (Ronneau and Hallez, 2019). Une accumulation trop importante de (p)ppGpp est toxique pour la bactérie ce qui explique qu'une souche de *E. coli* délétée uniquement du gène *spoT* n'est pas viable (Xiao et al., 1991). Contrairement à RelA, SpoT synthétise du (p)ppGpp en réponse à diverses carences : carences en source de carbone (Xiao et al., 1991), en phosphate (Spira et al., 1995), en fer (Vinella et al., 2005), en azote (Villadsen and Michelsen, 1977) ou encore en acides gras (Seyfzadeh et al., 1993). De ce fait, SpoT doit répondre à une multitude de signaux pour induire l'accumulation de (p)ppGpp dans la cellule, ces signaux sont encore peu connus. Battesti *et al.* ont identifié la protéine ACP (acyl carrier protein),

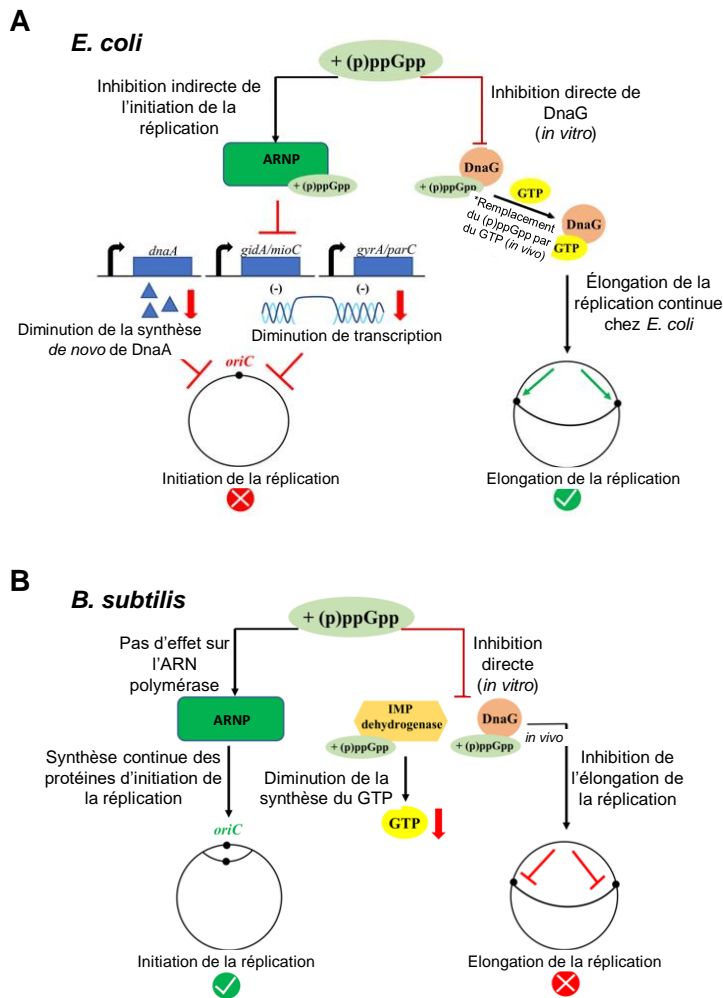


Figure 29 : Le (p)ppGpp inhibe la réplication du chromosome chez *E. coli* et *Bacillus subtilis*

A. Chez *E. coli*, l'inhibition de la réplication se fait au niveau de l'initiation de la réplication lorsque le (p)ppGpp s'accumule. Le (p)ppGpp se lie à l'ARN polymérase (ARNP) ce qui affecte indirectement le profil global d'expression des gènes via une reprogrammation transcriptionnelle pilotée par la ARNP. Les gènes dont les transcrits diminuent comprennent *dnaA*, *gidA*, *mioC*, *gyrA* et *parC*, ce qui conduit à un manque de synthèse *de novo* de DnaA et peut-être à une activation transcriptionnelle réduite d'*oriC*, effets qui contribuent tous ensemble à arrêter l'initiation de la réplication pendant l'accumulation de (p)ppGpp. En outre, la (p)ppGpp se lie à la DnaG primase *in vitro*, mais l'élongation de la réplication n'est pas affectée *in vivo*. Les niveaux de GTP n'étant pas significativement réduits chez *E. coli* pendant l'accumulation de (p)ppGpp, et le GTP se liant aussi à la DnaG, les auteurs supposent que le GTP pourrait concurrencer et supplanter le (p)ppGpp dans la liaison à la DnaG *in vivo* (hypothèse marquée d'un *). D'après (Sinha et al. 2020).

B. Chez *B. subtilis* l'inhibition de la réplication se fait au niveau de l'élongation pendant l'accumulation de (p)ppGpp. Le (p)ppGpp se lie à l'IMP déshydrogénase, diminuant le pool de GTP disponible, ainsi que celui de la DnaG. Cette diminution significative du niveau de GTP permet la liaison préférentielle du (p)ppGpp à la primase DnaG ce qui inhibe son activité *in vivo*. Le niveau de réplication à l'origine de *B. subtilis* pendant l'accumulation de la (p)ppGpp n'est pas modifié, peut-être parce que la (p)ppGpp ne se lie pas directement à la RNAP. D'après (Sinha et al. 2020).

transporteur de groupements acyles, comme le signal déclencheur de la synthèse de (p)ppGpp par SpoT lors de carences en acides gras (Battesti and Bouveret, 2006). Ils ont montré que la protéine ACP interagit avec le domaine TGS de la protéine SpoT, et suggèrent que lors de carences en acides gras, la taille du groupement acyle porté par la protéine ACP change, induisant un changement de conformation qui va favoriser l'activité synthétase de SpoT et la production de (p)ppGpp (Figure 28C) (Battesti and Bouveret, 2006). Il a aussi été proposé que la protéine ACP pourrait réguler l'activité de SpoT en fonction de la disponibilité en sources de carbone, car la privation en sources de carbone conduit *in fine* à une carence en acide gras, mais cette hypothèse reste à confirmer (Battesti and Bouveret, 2006; DiRusso and Nyström, 1998).

Le mécanisme qui permet l'alternance entre l'activité synthétase et hydrolase de SpoT n'est pas facile à élucider à cause des multiples stimuli. Une étude *in vitro* a montré que l'activité HD de SpoT est inhibée en présence d'ARNt non chargés (Richter, 1980). Dans ce cas, la détection d'ARNt non chargés provoquerait simultanément l'induction de la synthèse de (p)ppGpp par RelA et l'arrêt de sa dégradation par SpoT entraînant ainsi une accumulation rapide et importante de (p)ppGpp pour répondre de façon efficace aux carences en aa.

2. Conséquences de l'induction de la réponse Stringente

2.1. Inhibition de la réplication

L'accumulation du (p)ppGpp inhibe le processus de réplication. En effet, le taux de réplication est inversement proportionnel au niveau de (p)ppGpp (Ferullo and Lovett, 2008; Schreiber et al., 1995). Chez *E. coli*, le (p)ppGpp inhibe essentiellement l'initiation de la réplication et de façon moins importante l'élongation de la réplication (Figure 29A) (Sinha et al., 2020). Le (p)ppGpp bloque l'initiation de la réplication en (i) diminuant la transcription du gène *dnaA* et donc la synthèse *de novo* de la protéine DnaA, responsable de l'activation de l'initiation de la réplication du chromosome (Figure 29A) (Chiaramello and Zyskind, 1990; Riber and Løbner-Olesen, 2020; Zyskind and Smith, 1992); (ii) diminuant la transcription de gènes proches de l'*oriC* (*gidA*, *mioC*) ce qui provoque une diminution du surenroulement négatif et

par conséquent bloque l'initiation de la réplication (Kraemer et al., 2019) ; (iii) réprimant la transcription de l'ADN gyrase (*gyrA*) et de la topoisomérase IV (*parC*) ce qui diminue aussi le surenroulement négatif (Fernández-Coll et al., 2020).

Chez *E. coli* le (p)ppGpp ne semble pas inhiber l'élongation de la réplication *in vivo*, le cycle de réplication en cours au moment de l'induction de la réponse stringente n'étant pas interrompu (Ferullo and Lovett, 2008; Schreiber et al., 1995). Néanmoins, il a été montré *in vitro* que le (p)ppGpp se lie directement à la primase DnaG et inhibe son activité de synthèse des primers ARN pour la réplication du brin tardif (Maciag et al., 2010). Sinha *et al.* ont émis une hypothèse pour expliquer cette incohérence (cf légende de la Figure 29A) (Sinha et al., 2020). L'inhibition de l'élongation de la réplication par le (p)ppGpp chez *E. coli* est toujours un sujet à controverse. En effet, Denapoli *et al.* ont montré *in vivo* chez *E. coli*, que l'accumulation du (p)ppGpp provoque une légère diminution du taux d'élongation mais uniquement lors de situations de stress nutritionnel intense (Denapoli et al., 2013).

Chez *Bacillus subtilis* (Firmicutes), le (p)ppGpp n'inhibe pas l'initiation de la réplication mais seulement l'élongation de la réplication en se liant à la protéine DnaG (Figure 29B) (Wang et al., 2007). Il a été démontré chez *B. subtilis* qu'en présence de niveaux élevés de (p)ppGpp, les fourches de réplication arrêtées n'étaient pas capables de recruter la protéine RecA (activateur de la réponse SOS) indiquant que les fourches de réplication bloquées ne sont pas détruites, mais qu'elles sont arrêtées de façon réversible avec la capacité de redémarrer la réplication lorsque les nutriments seront à nouveau disponibles (Wang et al., 2007).

2.2. Effet sur la transcription

L'une des principales conséquences de l'accumulation du (p)ppGpp pendant la réponse stringente est le changement du profil transcriptionnel. Des études par microarrays ont permis d'identifier plusieurs centaines de gènes régulés soit positivement, soit négativement par le (p)ppGpp, contrôlant ainsi l'expression de différents processus cellulaires (Durfee et al., 2008; Traxler et al., 2008). De plus, une étude récente a montré par approche RNA-seq que l'induction de (p)ppGpp altérait l'expression de 757 gènes à 5 min et 1024 gènes

à 10 min chez *E. coli*, montrant que le (p)ppGpp régule l'expression des gènes selon une certaine dynamique (Sanchez-Vazquez et al., 2019). L'accumulation de (p)ppGpp permet d'inhiber l'expression de gènes nécessaires à la croissance et d'activer l'expression de gènes indispensables à la survie. La réponse stringente est caractérisée par la diminution de la transcription des ARN stables (ARNt, ARNr), entraînant un ralentissement de la synthèse protéique et une baisse de la vitesse de croissance (Cashel and Gallant, 1969; Traxler et al., 2008). D'autre part, la réponse stringente active la transcription de gènes de biosynthèse et de transport des aa afin de pallier les carences (Riggs et al., 1986; Traxler et al., 2008). Par conséquent, une souche (p)ppGpp⁰ (*relA*-/*spoT*-) est polyauxotrophe (Xiao et al., 1991). De plus, chez *E. coli*, le (p)ppGpp est responsable de l'augmentation de la transcription du gène *rpoS* qui code pour le facteur sigma alternatif σ^S (Lange et al., 1995) et du gène *iraP*, qui code une protéine anti-adaptatrice inhibant la protéolyse de RpoS (Bougdour and Gottesman, 2007). Ce dernier est un régulateur global de la réponse au stress, il permet aux cellules de faire face à des conditions de stress très diverses (carence en nutriments, choc osmotique, stress oxydatif...). De plus, le (p)ppGpp favorise l'association des facteurs σ alternatifs (σ^S , σ^N et σ^H) au core enzyme de l'ARNP par rapport au facteur σ^{70} (Jishage et al., 2002). Une étude originale utilisant des bactéries privées de nutriments de façon progressive, a permis d'identifier deux cascades de régulation distinctes activées par le (p)ppGpp chez *E. coli* : (i) à des faibles concentrations de (p)ppGpp, le régulon Lrp (leucine-responsive protein), un régulateur global des gènes impliqués dans la biosynthèse et le transport des aa, est activé, (ii) à des concentrations plus élevées de (p)ppGpp, le régulon RpoS, contrôlé par le facteur σ^S , est induit (Traxler et al., 2011). Ainsi *E. coli* a calibré sa réponse au stress en fonction de la concentration en (p)ppGpp.

Le mécanisme par lequel le (p)ppGpp régule l'expression des gènes lors de la réponse stringente diffère entre les protéobactéries et les Firmicutes (Irving et al., 2021). Chez *E. coli* comme chez la plupart des protéobactéries, le (p)ppGpp se lie directement à l'ARNP et régule l'expression des gènes soit négativement, soit positivement (Ross et al., 2016, 2013). L'accumulation du (p)ppGpp entraîne la déstabilisation des complexes ouverts d'initiation de

la transcription essentiellement des ARNs stables et par conséquent la libération des ARNP engagées sur ces promoteurs. La transcription des gènes des ARNs stables représente 60 à 80% de la transcription qui se produit dans les cellules en croissance rapide, le grand nombre d'ARNP libérées vont alors être disponibles pour transcrire les gènes régulés positivement lors de la réponse stringente (Barker et al., 2001b, 2001a; Traxler et al., 2008). Les études menées par l'équipe de Richard Le Gourse ont démontré que la fixation du (p)ppGpp à l'ARNP est indispensable pour réguler l'expression des gènes lors de la réponse stringente, peu de gènes sont régulés *via* un mécanisme indirect (Ross et al., 2013, 2013; Sanchez-Vazquez et al., 2019). Il existe deux sites de fixation du (p)ppGpp au niveau de l'ARNP : le « site 1 » se trouve à l'interface entre les sous-unités ω et β' et le « site 2 » se situe à l'interface entre la sous-unité β' et le facteur de transcription DksA (facteur connu pour son rôle important, en synergie avec le (p)ppGpp, dans la régulation de l'expression des gènes lors de la réponse stringente) (Ross et al., 2016, 2013). L'étude de Ross *et al.* a montré que lorsque le (p)ppGpp se fixe uniquement au site 1, la transcription des gènes est faiblement impactée (négativement ou positivement), alors que lorsqu'il se fixe au site 2 en présence du facteur DksA, la transcription est fortement impactée (Ross et al., 2016). Les auteurs suggèrent que le site 1 serait responsable des effets sur la régulation de l'expression des gènes lorsque les concentrations de (p)ppGpp sont faibles, par exemple pendant la croissance en milieu riche ou au début d'une carence nutritive. Lorsque les concentrations de (p)ppGpp sont suffisamment élevées pour remplir les deux sites, le site 2 serait responsable de la majorité des effets sur la transcription des gènes (Ross et al., 2016). Une étude récente a établi le profil des éléments -35 et -10 du promoteur et de la région qui se trouve entre l'élément -10 et le site d'initiation de la transcription +1 (le discriminateur) de gènes régulés positivement et négativement par le (p)ppGpp. Les gènes inhibés par le (p)ppGpp semblent posséder un discriminateur riche en G/C alors que les gènes activés ont un discriminateur riche en A/T (Sanchez-Vazquez et al., 2019). Chez les Firmicutes et les Actinobactéries, le (p)ppGpp ne se lie pas à l'ARNP et n'affecte pas la stabilité du complexe ADN-ARNP, de ce fait les changements dans la transcription lors de la réponse stringente sont indirects. L'impact de la réponse stringente sur la transcription chez les

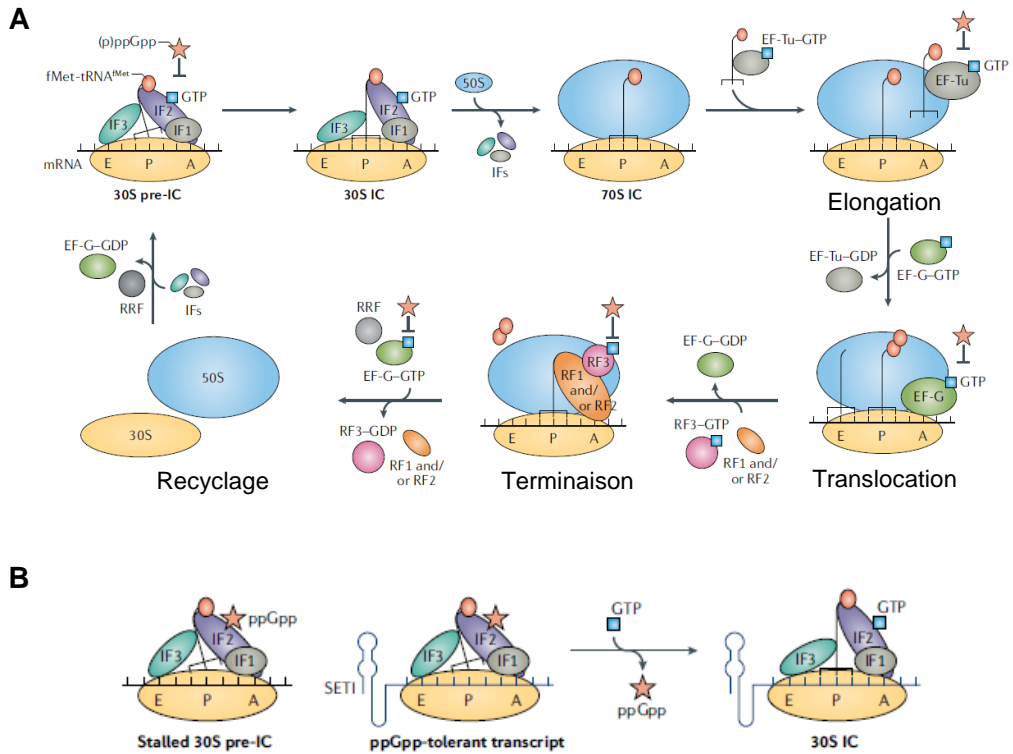


Figure 30 : Le (p)ppGpp inhibe la traduction protéique

A- La Guanosine pentaphosphate (pppGpp) et la guanosine tétraphosphate (ppGpp) collectivement appelées (p)ppGpp (★) se lient directement à un certain nombre de protéines responsables des différentes étapes de la traduction et les inhibent. Par association avec le GTP (carré bleu), le facteur d'initiation procaryote IF2 positionne l'ARNt initiateur (fMet-tRNA^{fMet}) au sein du complexe de pré-initiation 30S (30S pre-IC) et favorise le recrutement de la sous-unité 50S, un processus qui est inhibé par le (p)ppGpp. Le (p)ppGpp inhibe la liaison du facteur d'élongation EF-Tu au GTP ce qui empêche la liaison d'un ARNt aminoacylés au site A du ribosome 70S (élongation). L'inhibition de la liaison de la translocase EF-G au GTP arrête la translocation des ARNt aminoacylés à travers le ribosome. Le (p)ppGpp inhibe également le facteur de libération RF3, empêchant ainsi le recyclage des facteurs RF1 et RF2 à partir du ribosome. Le complexe de post-terminaison est recyclé par le facteur de recyclage du ribosome, RRF, et le facteur EF-G, ce qui permet au cycle de recommencer. Ce processus peut également être inhibé par la (p)ppGpp interagissant avec EF-G. D'après (Irving *et al.* 2021).

B- La liaison de la ppGpp à IF2 inhibe la reconnaissance du codon de départ. Le complexe de pré-initiation 30S (30S pre-IC) peut alors échanger un transcrit non compatible contre un transcrit contenant un élément SET1 (structured enhancer of translation initiation) qui est toléré par la ppGpp (par exemple, tufA), ce qui permet l'échange de la ppGpp contre du GTP et la poursuite de la traduction. D'après (Irving *et al.* 2021).

Firmicutes résulte essentiellement de la diminution du niveau de GTP qui est dû à la consommation du GTP pour produire du (p)ppGpp et à l'inhibition des enzymes synthétisant le GTP par le (p)ppGpp (Gaca et al., 2013; Irving et al., 2021).

2.3. Inhibition de la traduction

Comme vue précédemment, la réponse stringente réprime la transcription des ARNr. De plus, elle inhibe la maturation des ribosomes et la traduction des protéines par les ribosomes. Le (p)ppGpp peut bloquer la production de protéines à plusieurs étapes clés (initiation, élongation, terminaison et recyclage des ribosomes), assurant une croissance ralentie en cas de stress. Le (p)ppGpp se lie au facteur d'initiation IF2 et inhibe son activité ce qui empêche la formation du complexe d'initiation de traduction 30S (30S IC) (Figure 30A) (Milon et al., 2006; Zhang et al., 2018). Cependant, une étude récente montre que l'affinité du facteur IF2 (lié au complexe 30S) pour le (p) ppGpp diffère en fonction de l'ARNm présent au sein du complexe d'initiation (Vinogradova et al., 2020). En effet, la présence d'un motif SETI (structured enhancer of translation initiation, deux structures tiges boucles consécutives) en amont de la région d'initiation de la traduction au sein de l'ARNm permet d'échanger le (p)ppGpp en GTP et donc de continuer la traduction (Figure 30B) (Vinogradova et al., 2020). Le (p)ppGpp bloque également le processus de traduction par l'inhibition des facteurs d'élongation EF-Tu et EF-G, qui sont nécessaires respectivement à l'acheminement de l'ARNt chargé jusqu'au site accepteur A du ribosome et à la translocation de la chaîne peptidique pendant la synthèse protéique (Figure 30A) (Rojas et al., 1984; Zhang et al., 2018). Le (p)ppGpp bloque aussi le recyclage des facteurs de terminaison (RF1 ou RF2) en empêchant la libération du facteur RF3 ainsi que le recyclage de la petite sous-unité 30S et de la grande sous-unité 50S en se fixant au facteur EF-G (Figure 30A) (Irving et al., 2021; Kihira et al., 2012; Zhang et al., 2018). En plus de freiner la traduction des protéines par les ribosomes, le (p)ppGpp inhibe la formation des petites et grandes sous-unités ribosomiques, respectivement 30S et 50S, en inactivant les petites GTPases (RsgA, RbgA, Era et Obg) impliquées dans la maturation des ribosomes (Irving et al., 2021). Le (p)ppGpp induit aussi la transcription de *hpf*

(Hibernation promoting factor), *rmf* (Ribosome modulating factor) et de *RaiA* (ribosome associated inhibitor), des facteurs importants dans la dimérisation et l'inactivation des ribosomes (Izutsu et al., 2001; Prossliner et al., 2018).

2.4. Effets sur le métabolisme cellulaire

Le (p)ppGpp régule aussi différents processus métaboliques lors de la réponse stringente.

En interagissant avec la lysine décarboxylase (Ldcl ; enzyme participant à la protection des bactéries contre le stress acide), le (p)ppGpp inhibe l'activité de cette dernière pour moduler la consommation de la lysine dans les cellules lors d'un stress acide dans des conditions de limitation des nutriments (Kanjee et al., 2011).

Le (p)ppGpp inhibe l'activité de l'exopolyphosphatase (PPX) favorisant l'accumulation du polyphosphate (polyP) (Kuroda et al., 1997). Ce dernier active la protéase Lon permettant de dégrader les protéines ribosomiques afin de générer des aa libres, le complexe polyP-Lon a aussi été impliqué dans la tolérance des bactéries aux antibiotiques (voir section 3 de ce chapitre) (Kuroda et al., 1997; Maisonneuve et al., 2013, 2011).

Lorsque le (p)ppGpp s'accumule dans la cellule, les pools de GTP et de GDP diminuent car ils vont servir de substrat pour la synthèse de (p)ppGpp. Cependant, il est maintenant largement établi que le (p)ppGpp inhibe également de manière active la synthèse des purines (Irving et al., 2021; Kriel et al., 2012). Chez *B. subtilis*, le contrôle des niveaux de GTP est essentiel pour réguler la transcription des gènes (Irving et al., 2021).

3. Réponse stringente, acteur majeur de la survie des bactéries aux antibiotiques

Lors de carences nutritives, le (p)ppGpp s'accumule dans la bactérie et induit la réponse stringente afin de relocaliser les ressources de la bactérie le temps que le stress se termine. Cependant, l'induction de la réponse stringente a aussi été associée à d'autres phénomènes tels que la virulence (Chau et al., 2021; Irving et al., 2021), la résistance ou la

persistance des bactéries vis-à-vis des traitements antibiotiques (Hobbs and Boraston, 2019; Pacios et al., 2020).

La plupart des *Staphylococcus* résistants à la méthicilline (SARM) présentent une résistance hétérogène aux β -lactamines : la majorité de la population a un faible niveau de résistance et une minorité a un haut niveau de résistance (Hartman and Tomasz, 1986). Une étude, utilisant une approche de séquençage haut débit, s'est intéressée au mécanisme moléculaire qui permet à ces rares bactéries d'avoir une CMI élevée par rapport au reste de la population ; elle a permis d'identifier qu'une délétion dans la région C-terminale de la protéine RelA entraînait l'augmentation du niveau de (p)ppGpp dans la cellule (Mwangi et al., 2013). Plus tard, cette équipe a démontré que ce niveau élevé de (p)ppGpp induisait l'expression du gène *mecA* et la production élevée de la transpeptidase PBP2A, responsable de la résistance aux β -lactamines (Dordel et al., 2014; Kim et al., 2013). Ils ont également observé que des bactéries soumises à un stress nutritionnel présentaient aussi un haut niveau de résistance aux β -lactamines (Kim et al., 2013). Une étude au laboratoire a montré que la réponse stringente induisait en biofilm une augmentation du niveau basal de l'expression de l'intégrase des intégrons de classe 1 qui permet l'acquisition et l'échange de cassettes de gène codant essentiellement des gènes de résistances aux antibiotiques (Voir Chapitre I) (Strugeon et al., 2016).

Aujourd'hui, la réponse stringente est aussi considérée comme un acteur majeur de la tolérance des bactéries aux antibiotiques et de la formation de bactéries persistantes. La réponse stringente, activée lors de carences nutritives, a été décrite dans la formation de bactéries tolérantes ou persistantes à différentes classes d'antibiotiques telles que les β -lactamines (Rodionov et al., 1995; Tuomanen and Tomasz, 1986) et fluoroquinolones (Amato et al., 2013; Viducic et al., 2006). Dans des environnements naturels, les bactéries peuvent rencontrer un accès limité aux nutriments en biofilm ou chez l'hôte. Il a été montré que la tolérance de *P. aeruginosa* et *E. coli* en biofilm dépendait de carences en aa (Bernier et al., 2013; Nguyen et al., 2011). De plus, il a été démontré chez une souche de *E. coli* adhérente

et invasive (souche LF82 retrouvée couramment chez des patients atteints de la maladie de Crohn et suspectée participer à la pathogenèse de cette dernière) que l'induction de la réponse stringente immédiatement après la phagocytose des bactéries participe à leur survie dans le macrophage et à la formation de bactéries persistantes (Demarre et al., 2019). Helaine *et al.* ont exploré l'invasion de macrophages de souris par *Salmonella enterica* et ont aussi montré que la production de (p)ppGpp par les bactéries emprisonnées au sein du macrophage était nécessaire pour la formation de bactéries persistantes (Helaine et al., 2014).

Le mécanisme par lequel la réponse stringente induit la formation de bactéries persistantes est encore sujet à controverse. Plusieurs études soutiennent que la réponse stringente induit la formation des bactéries persistantes selon un modèle passif. Selon ce modèle, lors de la réponse stringente, l'inhibition des différents processus de réplication, transcription et traduction entraîne l'arrêt de croissance des bactéries et peut donc empêcher les antibiotiques d'agir sur leurs cibles (Wood et al., 2013). Cependant, la réponse stringente n'est pas binaire dans son contrôle, elle peut être partiellement activée et il en résulte des cellules qui présentent un métabolisme et une croissance réduits plutôt que nuls (Hobbs and Boraston, 2019). De ce fait, d'autres études ne sont pas en faveur d'un modèle passif et proposent d'autres mécanismes où la réponse stringente induirait la formation de bactéries persistantes en régulant différents processus (activation de systèmes toxines-antitoxines (TA), hibernation du ribosome, production de ROS,...). En effet, Gerdes et Maisonneuve ont proposé que l'apparition de bactéries persistantes serait induite par l'activation des systèmes TA *via* le (p)ppGpp. Dans leur modèle, le (p)ppGpp inhibait l'activité de l'exopolyphosphatase (PPX) entraînant l'accumulation de PolyP et donc l'activation de la protéase Lon, laquelle activait à son tour indirectement les toxines en dégradant les anti-toxines associées (Maisonneuve et al., 2013, 2011). Cependant, les auteurs ont rétracté leurs articles en 2018, affirmant que l'inhibition apparente de la persistance dans leurs mutants était due à la contamination de leurs souches par un bactériophage. Néanmoins, la toxine HipA du couple TA HipAB est bien impliquée dans la persistance. En effet, Kaspy *et al.* ont montré que la persistance induite par HipA était dû au fait que cette dernière active la réponse stringente et

la production de (p)ppGpp (Figure 28B) (Kaspy et al., 2013). Song et Wood ne sont pas en faveur de l'implication des systèmes TA dans la formation de bactéries persistantes et proposent le modèle plus simple suivant : le (p)ppGpp génèrerait des bactéries persistantes en inactivant directement les ribosomes (Song and Wood, 2020). Cette inhibition ferait intervenir un inhibiteur associé au ribosome (RaiA), le facteur de modulation des ribosomes (Rmf) et le facteur de promotion de l'hibernation (Hpf), ces deux derniers facteurs provoquant la dimérisation des ribosomes dont le coefficient de sédimentation passe de 70S (actif) à 100S (inactif) (Song and Wood, 2020). Ces deux modèles ne présentent pas un mécanisme actif *per se* pour la formation des bactéries persistantes mais propose une meilleure compréhension du mécanisme génétique par lequel les bactéries atteignent l'état de dormance *i.e.* les bactéries répondent au stress d'une manière active (*via* des circuits génétiques) uniquement comme un moyen de parvenir à l'état de dormance. *A contrario*, Nguyen *et al.* ont montré que l'induction de la réponse stringente en biofilm (un environnement où les bactéries rencontrent souvent une carence en nutriments) protège *P. aeruginosa* et *E. coli* contre les effets létaux provoqués par différentes classes d'antibiotiques par un mécanisme actif, qui comprend d'une part l'induction de défenses antioxydantes (production de la catalase et superoxyde dismutase) et d'autre part la diminution de la production de métabolites pro-oxydants (Nguyen et al., 2011). De plus, leur étude a démontré que *in vivo* le traitement à l'ofloxacine augmentait significativement le taux de survie de souris infectées par une souche *P. aeruginosa* dépourvu des gènes *relA* et *spoT* par rapport celles infectées par la souche sauvage (Nguyen et al., 2011). Une autre étude *in vivo* a rapporté que *Mycobacterium tuberculosis* (connue pour sa tolérance à l'isoniazide) dépourvue de l'enzyme Rel était capable d'infecter des souris de façon chronique mais était sensible au traitement par l'isoniazide (Dutta et al., 2019).

Il existe dans la littérature deux articles qui suggèrent un lien entre réponse stringente active et tolérance des bactéries aux antibiotiques chez le patient. L'étude par séquençage haut débit d'une souche de *S. aureus* SARM isolée d'un patient atteint d'une bactériémie récurrente (celle-ci a nécessité plus de 100 jours de traitement antibiotique pour être

éradiquée) a permis d'identifier dans la souche parentale différentes mutations dont une dans le gène *rel* au niveau du domaine hydrolase entraînant un niveau élevé de (p)ppGpp et par conséquent une diminution de croissance de la souche ; les auteurs suggèrent que cette activation partielle de la réponse stringente a participé à la tolérance du *S. aureus* au traitement antibiotique et donc à la persistance de l'infection (Gao et al., 2010). En 2017, une autre étude a identifié une mutation dans le domaine hydrolase de la protéine Rel chez une souche de *Enterococcus faecium* isolée d'une patiente immunodéprimée avec une bactériémie persistante malgré un long traitement antibiotique. Cette mutation identifiée 3 jours après le début du traitement antibiotique entraînait un niveau élevé de (p)ppGpp, et permettait aux bactéries de survivre à des doses élevées de daptomycine et de linezolide (des antibiotiques utilisés lors du traitement) dans un modèle de biofilm mais pas en culture planctonique. Les auteurs suggèrent que l'infection viendrait de la colonisation du cathéter veineux central par un biofilm à l'origine probable de la formation d'un biofilm au niveau de la valve cardiaque ce qui pourrait expliquer la persistance de l'infection (Honsa et al., 2017).

4. La réponse stringente nouvelle cible antibactérienne

Comme dit précédemment, la tolérance des bactéries aux antibiotiques constitue un problème majeur de santé publique. Dans le but de potentialiser l'effet des antibiotiques existants, plusieurs cibles sont en cours d'étude comme la réponse SOS (voir chapitre III) ou encore la réponse stringente. Cette dernière semble être aussi une cible intéressante car (i) les antibiotiques actuels ciblent des processus métaboliques actifs, cependant, les bactéries persistantes présentent généralement un métabolisme réduit, notamment à cause de l'induction de la réponse stringente, échappant aux traitements par les antibiotiques classiques. Nous avons vu précédemment que la délétion des gènes régulateurs de la réponse stringente diminue la formation de bactéries persistantes et améliore la survie des souris dans des modèles *in vivo* (voir section 3 de ce chapitre) ; (ii) la réponse stringente est une réponse au stress nutritionnel hautement conservée chez les bactéries ; (iii) il n'y a pas d'homologue des enzymes Rel/RelA chez les mammifères.

Ces différentes caractéristiques ont motivé le développement d'inhibiteurs compétitifs pour l'activité synthétase de ces enzymes (Wexselblatt et al., 2010). A ce jour, quatre molécules inhibant la synthèse du (p)ppGpp par les enzymes Rel/RelA (des analogues de leurs substrats (GTP/GDP)) ont été décrites dans la littérature (Dutta et al., 2019; Syal et al., 2017; Wexselblatt et al., 2012, 2010). Certaines de ces molécules sont particulièrement étudiées dans le traitement d'infection à *Mycobacterium* spp, un genre bactérien connu pour sa haute tolérance aux antibiotiques. Le composé développé par l'équipe de Dipankar Chatterji a montré une bonne efficacité dans l'inhibition de synthèse du (p)ppGpp, chez *M. smegmatis*, il n'est pas toxique et pénètre efficacement dans les cellules épithéliales du poumon (Syal et al., 2017). Un autre composé, appelé X9, capable de tuer *M. tuberculosis* et d'augmenter sa sensibilité à l'isoniazide est en développement (Dutta et al., 2019). Une étude récente a aussi démontré que des antibiotiques inhibant la synthèse protéique (thiostrepton, chloramphénicol, and tétracycline) étaient capables d'inhiber l'accumulation de (p)ppGpp chez *E. coli* et *B. subtilis* (Kudrin et al., 2017). Cependant le mécanisme par lequel ces molécules inhibent l'accumulation du (p)ppGpp n'est pas clair, les auteurs suggèrent que les inhibiteurs de synthèse protéique interfèreraient dans l'association entre les protéines Rel/RelA et le site A du ribosome (Kudrin et al., 2017). L'effet de ces antibiotiques sur la formation de bactéries persistantes aux antibiotiques est encore sujet à controverse (Kudrin et al., 2017; Rodionov et al., 1995). Dans la littérature, il a aussi été rapporté que des peptides anti-biofilm (1018, DJK-5 et DJK-6) agiraient en inhibant la réponse stringente (de la Fuente-Núñez et al., 2015, 2014; Hobbs and Boraston, 2019). Le composé 1018 prévient la formation de biofilm et conduit à l'éradication de biofilms matures chez des souches représentatives de bactéries pathogènes Gram négatives et Gram positives, notamment *P. aeruginosa*, *E. coli*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* résistant à la méthicilline, *S. typhimurium* et *Burkholderia cenocepacia* (de la Fuente-Núñez et al., 2014). Deux autres molécules DJK-5 et DJK-6 ont été décrit avec une meilleure efficacité.(de la Fuente-Núñez et al., 2015) Le mécanisme d'action de ces trois peptides impliquerait une interaction directe des peptides avec le (p)ppGpp ce qui promouvrait sa dégradation par la bactérie (de la Fuente-Núñez et al., 2015, 2014; Hobbs and Boraston,

2019). Des études *in vivo* ont montré que ces molécules agissent en synergie avec des antibiotiques conventionnels lors du traitement d'infections. Dans un modèle d'abcès sous-cutané chez la souris infectée par des bactéries du groupe ESKAPEE (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, *E. coli*), la combinaison du traitement antibiotique + peptides a montré des effets synergiques qui réduisaient de manière significative la taille des abcès et/ou amélioraient l'élimination des bactéries du site de l'infection (Pletzer et al., 2018). Et dans un modèle d'infection létale de *Caenorhabditis elegans* et *Galleria mellonella* par *P. aeruginosa*, les peptides DJK-5 et DJK-6 réduisaient la mortalité des invertébrés (de la Fuente-Núñez et al., 2015).

Objectifs de thèse

Les intégrons de résistance sont des acteurs majeurs de la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif. Les études sur les intégrons et leurs régulations ont été réalisées essentiellement en culture planctonique où il a été démontré que l'expression de l'intégrase d'intégron de classe 1 (la plus prévalente en clinique) était régulée par la réponse SOS (Guerin et al. 2009). Cependant, dans les écosystèmes naturels, les bactéries vivent essentiellement sous forme de biofilms, *i.e.* dans des communautés complexes de microorganismes attachés aux surfaces. Les biofilms posent problème aujourd'hui en clinique car ils sont à l'origine d'infections persistantes difficiles à traiter. Des travaux précédents du laboratoire ont montré que le biofilm et le tractus intestinal de la souris (dans lequel les bactéries vivent sous forme de biofilm) sont des environnements propices pour l'acquisition et l'échange de cassettes de résistance par les intégrons. En effet, il a été mis en évidence que le niveau basal d'expression ainsi que l'activité de l'intégrase de classe 1 étaient augmentés dans un modèle de biofilm *in vitro* et *in vivo* dans le tractus digestif de souris par rapport à la culture planctonique (Sturgeon et al 2016, thèse de Murielle Baltazar). L'étude de Sturgeon *et al.* a aussi montré que la régulation de l'expression de *intl1* en biofilm est complexe et fait intervenir plusieurs régulateurs (RelA, SpoT et Lon). Dans cette dernière étude le niveau basal d'expression de *intl1* a été estimé à partir du biofilm entier (Sturgeon et al 2016). Or, le biofilm est un milieu hétérogène où les bactéries présentent différents états physiologiques en fonction de leur localisation dans le biofilm.

Le premier objectif de mon travail de thèse a donc été de localiser l'expression du gène codant l'intégrase d'intégron de classe 1 (*intl1*) en biofilm afin de déterminer si cette expression est globale ou restreinte à certaines bactéries dans des microniches du biofilm. L'expression de l'intégrase étant régulée par la réponse SOS, nous avons aussi étudié la localisation de cette réponse en biofilm *via* le suivi de l'expression du gène *sfiA*.

Le deuxième objectif de mon travail de thèse a été de continuer la caractérisation de la régulation de l'expression de *intl1* en biofilm en explorant le rôle des régulateurs globaux CRP et IHF.

**Axe 1 : Localisation et quantification de
l'expression des gènes *intl1* et *sfiA* en
biofilm**

Une étude récente menée au laboratoire a montré qu'en biofilm, mode de vie préféré des bactéries dans les écosystèmes naturels, le niveau basal d'expression des gènes *intl1* (intégrase d'intégron de classe 1) et *sfiA* (régulon SOS), est augmenté d'environ 2 à 3 fois par rapport à la culture planctonique. Cette induction biofilm-spécifique est sous le contrôle de la réponse stringente (induite par des carences nutritives et contrôlée par les régulateurs RelA et SpoT) (Strugeon et al., 2016). Dans cette étude, les niveaux d'expression de *intl1* et *sfiA* ont été estimés à partir du biofilm entier. Cependant, comme nous l'avons vu en introduction (chapitre II), le biofilm est un milieu hétérogène dans lequel les bactéries présentent des phénotypes variés selon le micro-environnement où elles se trouvent dans le biofilm (microniches). Il est ainsi probable, qu'au sein du biofilm, les niveaux d'expression de *intl1* et *sfiA* varient en fonction des conditions de stress perçues par les bactéries dans les diverses microniches du biofilm. Par conséquent, les résultats obtenus dans la précédente étude pourraient ne pas refléter ce qui se passe réellement dans la structure hétérogène du biofilm, et ne présenter qu'une valeur moyennée du niveau d'expression de ces gènes, avec certaines bactéries qui exprimeraient les gènes à haut niveau (celles dans des microniches à haut niveau de stress, par exemple carences en nutriments) et d'autres à bas niveau (microniches où les bactéries seraient nourries et oxygénées correctement).

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la localisation de l'expression de *intl1* et de *sfiA* au sein du biofilm. La question était de déterminer si toutes les bactéries du biofilm subissaient la régulation *via* la réponse stringente ou si seulement une partie d'entre elles était induites, et dans ce cas, à quel niveau ?

Pour répondre à cette question, nous avons tout d'abord mis au point un système de culture de biofilm en « flow-cell microfluidique » couplé à un microscope confocal afin de localiser par émission de fluorescence, l'expression des gènes *intl1* et *sfiA* *in situ* dans le biofilm. Ensuite, nous avons développé une approche de cytométrie en flux pour quantifier finement le nombre de bactéries exprimant les gènes d'intérêt. Enfin nous avons utilisé le FACS pour trier les bactéries du biofilm dans le but d'estimer leur niveau d'expression des gènes *intl1* et *sfiA* par RT-qPCR.

Nos résultats ont montré qu'en absence de stress exogène, seul un très petit nombre (environ 1%) de bactéries situées en profondeur du biofilm expriment les gènes *intI1* et *sfiA* et ce à un niveau élevé, à la fois de manière dépendante et indépendante de la réponse stringente. Nos résultats indiquent que des bactéries situées dans des microniches en profondeur du biofilm subissent un stress endogène (limitation en nutriments) suffisant pour permettre l'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques *via* les intégrons. Ces bactéries pourraient ainsi former un réservoir de bactéries responsables de la persistance des infections.

Le travail effectué dans cet axe est présenté en deux parties : une partie de mises au point expérimentales, et une partie Résultats présentée sous forme d'un article déposé sur BioRxiv (bioRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2021.11.03.467100>).

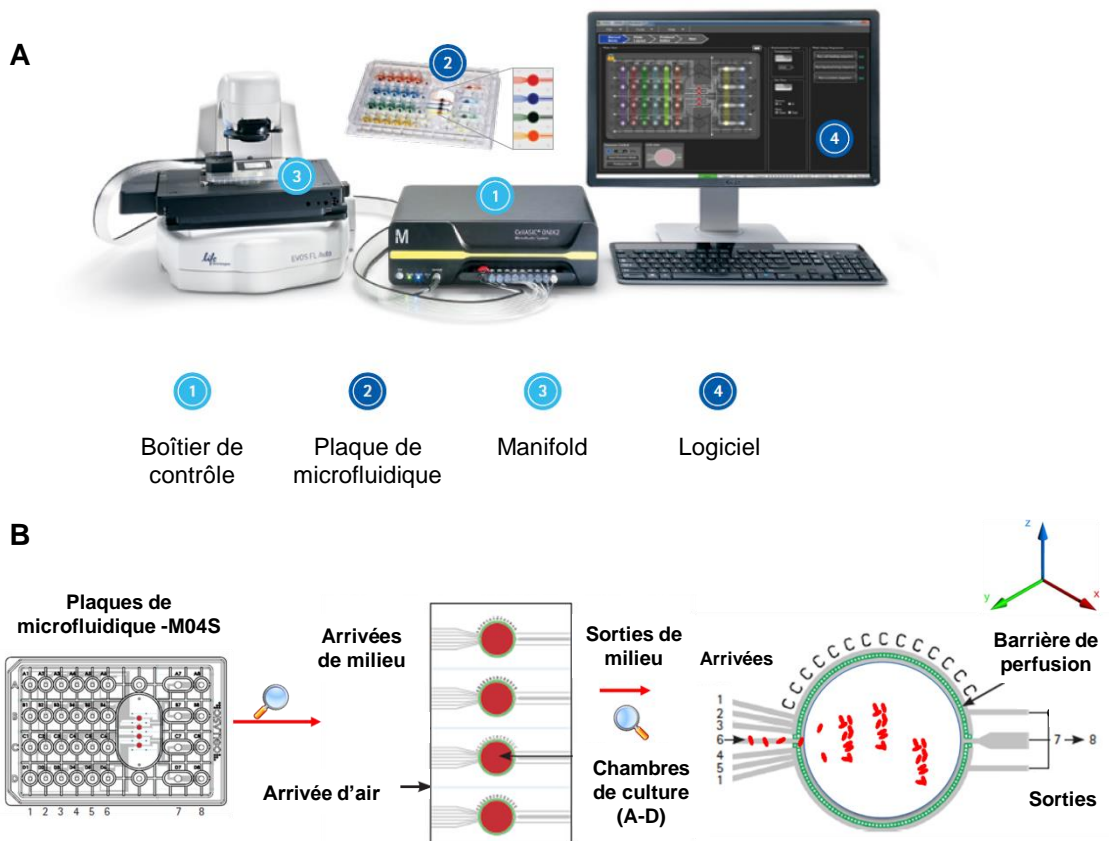


Figure 31 : Le Système microfluidique CellASIC® ONIX2

A. Éléments composant le système. Le système est constitué : (1) d'un boîtier de contrôle, qui permet l'injection des solutions dans la chambre de culture (par pression), le maintien du débit et le contrôle de la température et du débit de gaz, (2) de plaques de microfluidique (il en existe différents types en fonction de ce que l'on veut étudier) composées de chambres de culture reliées via 6 microcanaux à des puits permettant d'alimenter la chambre en différents milieux/solutions, (3) d'un manifold, qui se fixe sur les plaques, et qui fait le lien entre le boîtier de contrôle et les plaques, il permet d'appliquer les pressions sur les différents puits et le maintien de la température (4) d'un logiciel qui permet d'automatiser les expériences.

B. Configuration de la plaque M04S utilisée pour les cultures de biofilms. La plaque microfluidique M04S possède quatre chambres de culture indépendantes (A-D ; cercles rouges), chacune avec une entrée de milieu par gravité (1), quatre entrées de solution (2-5), une entrée pour les cellules (6) et deux sorties partagées (7 et 8). La chambre est entourée d'une barrière de perfusion (cercle vert) qui la sépare des canaux d'écoulement. Cette plaque a une hauteur de $120\mu\text{M}$ ce qui permet le développement du biofilm en trois dimensions.

Mises au point expérimentales

1. Mise au point du suivi en temps réel du développement d'un biofilm en système de culture continue microfluidique par microscopie confocale

1.1. Présentation du système de culture continue microfluidique

Dans le but de répondre à la question de la localisation de l'expression des gènes *int11* (intégrase d'intégron de classe 1) et *sfiA* (gène du régulon SOS) dans le biofilm, le laboratoire s'est équipé d'un système de « flow-cell microfluidique » CellASIC® ONIX2 Microfluidic system (Merck Millipore) permettant le développement de biofilm en culture continue, et qui peut être couplé à un microscope confocal afin de localiser l'expression de gènes d'intérêt par émission de fluorescence (Figure 31A). Ce système permet de suivre en temps réel le développement du biofilm tout en contrôlant de façon automatisée (grâce à un logiciel) l'injection et le débit du milieu, et la température (Figure 31A). Nous avons utilisé les plaques de culture « mammalian microfluidic plate (MS04) ». Les chambres de culture de cette plaque ont une hauteur de 120µM ce qui permet le développement d'un biofilm en trois dimensions (Figure 31B). Ces plaques possèdent quatre chambres de culture indépendantes qui peuvent être utilisées simultanément, ce qui permet de comparer différentes conditions de milieux ou différents fonds génétiques en parallèle.

1.2. Souches et plasmides utilisés

Afin de suivre la formation du biofilm en microscopie confocale, nous avons utilisé la souche d'*E. coli* MG1656 F' exprimant la protéine fluorescente rouge mCherry (expression constitutive du gène *mcherry* introduit au site λatt sur le chromosome de la souche) et nommée MGcherry F'. Pour visualiser l'expression des gènes *sfiA* et *int11 in situ* dans le biofilm, nous avons construit des plasmides portant une fusion transcriptionnelle entre la région promotrice d'intérêt et le gène *gfp*, codant la protéine fluorescente verte GFP (plasmides pPsfIA-*gfp* et pPint11-*gfp*). Ces plasmides ont été transformés dans la souche MGcherry F'.

Les mises au point ont été réalisées avec la fusion *PsfiA-gfp*, l'activité du promoteur *PsfiA* étant forte un fois la répression par *LexA* levée. La souche MGcherry F' portant un plasmide vide (*pvide*), et la souche MGcherry F' portant le plasmide *pPsfiA*-gfp* qui contient une fusion transcriptionnelle entre le promoteur *PsfiA* muté dans la boîte *LexA*, *PsfiA**, et le gène *gfp* (expression constitutive de la GFP) ont servis de contrôle négatif et contrôle positif de fluorescence respectivement.

1.3. Culture des biofilms en flow-cell microfluidique

Les chambres de cultures ont d'abord été lavées avec du milieu LB pendant 5 min avec un débit de 5 psi (72µl/h). Elles ont ensuite été inoculées avec 10µl de culture bactérienne de nuit diluée (différentes dilutions testées) avec un débit de 0,25 psi pendant 6 s. Le débit de milieu a alors été stoppé (plus de perfusion de milieu) pendant 15min afin de permettre aux bactéries d'adhérer à la surface. Enfin un débit de 7µl/h de milieu de culture (LB) (1psi) a été appliqué de façon bilatérale (à partir des puits 3 et 4) (Figure 31B) pour assurer une arrivée homogène du milieu dans la chambre de culture. La température de la chambre a été maintenue à 37°C. Les biofilms ont été cultivés pendant 24 h. Le manifold contenant la plaque a été placé sur la platine du microscope confocal inversé dès le début de l'expérimentation. Le microscope était équipé d'une chambre d'incubation maintenue à 37°C.

Dans nos premières expériences, nous avons inoculé les chambres de culture avec 10µl de culture bactérienne de nuit (MGcherry F'/*pPsfiA-gfp*) diluée à 10⁹ bactéries/ml ($DO_{600}=2$). Un biofilm assez dense s'est rapidement formé dans la chambre de culture ce qui s'est traduit par une saturation du signal rouge (les bactéries expriment de façon constitutive la mCherry). En effet les acquisitions se faisaient sur la nuit avec un programme d'acquisition d'images automatisé, il était donc compliqué d'anticiper avec exactitude le moment de la saturation pour diminuer la puissance du laser. De plus, la saturation du signal rouge nous empêchait de visualiser les bactéries du biofilm de manière individuelle, ce qui compliquait la co-localisation des bactéries vertes (celle avec un promoteur *PsfiA* actif) et rouges (tout le

biofilm). Après différents essais, nous avons choisi d'inoculer les chambres de culture avec 10 μ l de culture bactérienne de nuit diluée à 5x10⁷ bactéries/ml (DO₆₀₀=0,1).

1.4. Acquisition des images par microscopie confocale

La croissance du biofilm et l'émission de fluorescence dans le temps ont été suivies à l'aide d'un microscope confocal inversé Carl Zeiss (Oberkochen, Allemagne) LSM 880 et d'un objectif à immersion 40X.

L'expression du gène *sfiA* étant suivie par émission de la fluorescence verte (fusion *P_{sfiA}-gfp*), les réglages du laser d'excitation vert ont été optimisés en utilisant une souche qui n'émet pas de fluorescence verte (*MGcherry F'/pvide*) de manière à ne pas avoir de bruit de fond dans le canal vert. Au moins trois positions ont été sélectionnées le long de la chambre pour l'imagerie en temps réel. Nous avons réalisé des piles d'images toutes les 2h pendant 24h avec des paramètres optimisés pour éviter le phénomène de photoblanchiment (destruction irréversible des fluorophores par une illumination très intense) tout en conservant une résolution satisfaisante : taille de l'image 512X512 pixels, temps d'acquisition 6 min environ /pile d'images, épaisseur en z de 40 μ m. Nous avons rencontré des problèmes de perte du focus au cours des acquisitions nécessitant l'achat et l'installation d'un système de stabilisation du focus sur le microscope. Les images ont été traitées pour enlever le bruit de fond en utilisant un filtre Gaussien puis analysées à l'aide du logiciel IMARIS 9.6.

1.5. Mise au point de la visualisation de formation de biofilm par la souche **MG1656 Δ relA Δ spoT F'**

L'étude de Strugeon *et al.* a montré que l'expression des gènes *intl1* et de *sfiA* est régulée par RelA et SpoT en biofilm (régulateurs de la réponse stringente). Nous avons donc voulu évaluer l'activité *in situ* des promoteurs de ces gènes, *P_{sfiA}* et *P_{intl1}*, dans un mutant *MG Δ relA Δ spoT*. Pour visualiser la formation du biofilm en 3D et localiser l'expression d'un gène d'intérêt, il est important que toutes les bactéries du biofilm émettent une fluorescence. Nous avons tenté de construire une souche *MGcherry Δ relA Δ spoT*, cependant nos multiples

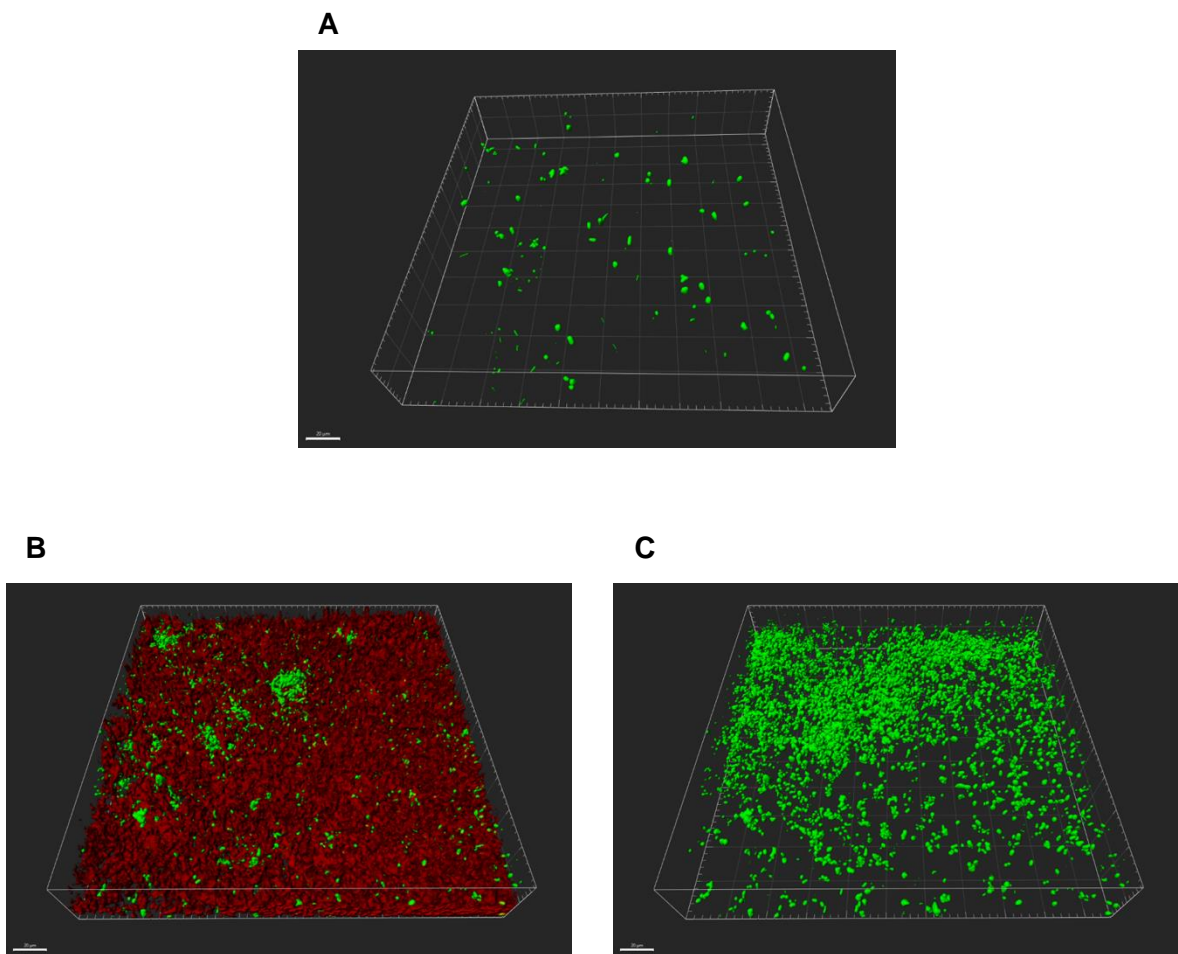


Figure 32 : Induction de la réponse SOS dans un mutant $MG\Delta reIA\Delta spoT$ par ajout du colorant FM4-64

Images de microscopie confocale du biofilm de la souche $MG\Delta reIA\Delta spoT$ F'/pPsfIA-*gfp*, cultivées pendant 24h à 37°C dans une chambre de culture microfluidique (A) avant ajout du colorant FM4-64, (B, C) après ajout du colorant FM4-64. Les panels A et C montrent les acquisitions dans le canal vert et le panel B est une superposition des acquisitions dans les canaux vert et rouge. Les images ont été générées à l'aide d'un microscope Zeiss LSM 880 et traitées avec le logiciel Imaris 9.6 (Bitplane). La barre d'échelle représente 30 μ m.

essais sont restés vains. Nous avons alors décidé de colorer les bactéries avec un colorant de membrane, le FM4-64 (fluorescence rouge). De façon surprenante, l'ajout du colorant à un biofilm de 24h de la souche *MGΔrelAΔspoT F'/pPsfIAgfp* a entraîné l'apparition de bactéries vertes indiquant l'induction de la réponse SOS (Figures 32A, B et C).

2. Mise au point de la quantification du nombre de bactéries exprimant un gène d'intérêt par cytométrie en flux

Afin de quantifier la proportion de bactéries fluorescentes vertes (i.e. exprimant le gène d'intérêt ; fusion transcriptionnelle) dans le biofilm, nous avons développé une approche par cytométrie en flux. Les biofilms ont été cultivés dans un système de culture continue en microfermenteur, un système qui contrairement à la flow-cell, permet de récupérer le biofilm avec une biomasse importante afin de l'analyser en cytométrie en flux.

2.1. Culture des biofilms en microfermenteur

Les biofilms de *MGcherry F'/pPsfIA*-gfp* ont été cultivés en culture continue pendant 24 h dans un microfermenteur (MF, Figure 19E) en verre contenant une spatule amovible comme décrit dans (Strugeon al. 2016). Les MF ont été inoculés en insérant dans le MF une spatule ayant trempée pendant 2 min dans 15 ml de culture bactérienne de nuit contenant 10^9 bactéries/ml ($DO_{600}=2$) et brièvement rincée dans du milieu LB. Le débit du milieu (LB) dans le MF était de 1,1ml/min. Après 24h, le biofilm a été remis en suspension par agitation vigoureuse du MF, et la biomasse du biofilm a été estimée en déterminant la densité optique à 600 nm (DO_{600}).

Quand cela était nécessaire des cultures planctoniques ont été réalisées : 100 µl de la culture de nuit utilisée pour inoculer le MF, ont été dilués dans 10 ml de LB et cultivés pendant 24 h à 37°C avec agitation à 300 rpm.

2.2. Analyse par cytométrie en flux

Les biofilms resuspendus ont été dilués dans du PBS 1X à une concentration finale de 10^7 bactéries/ml pour être analysés avec le trieur BD FACSAria III (Becton Dickinson, Franklin

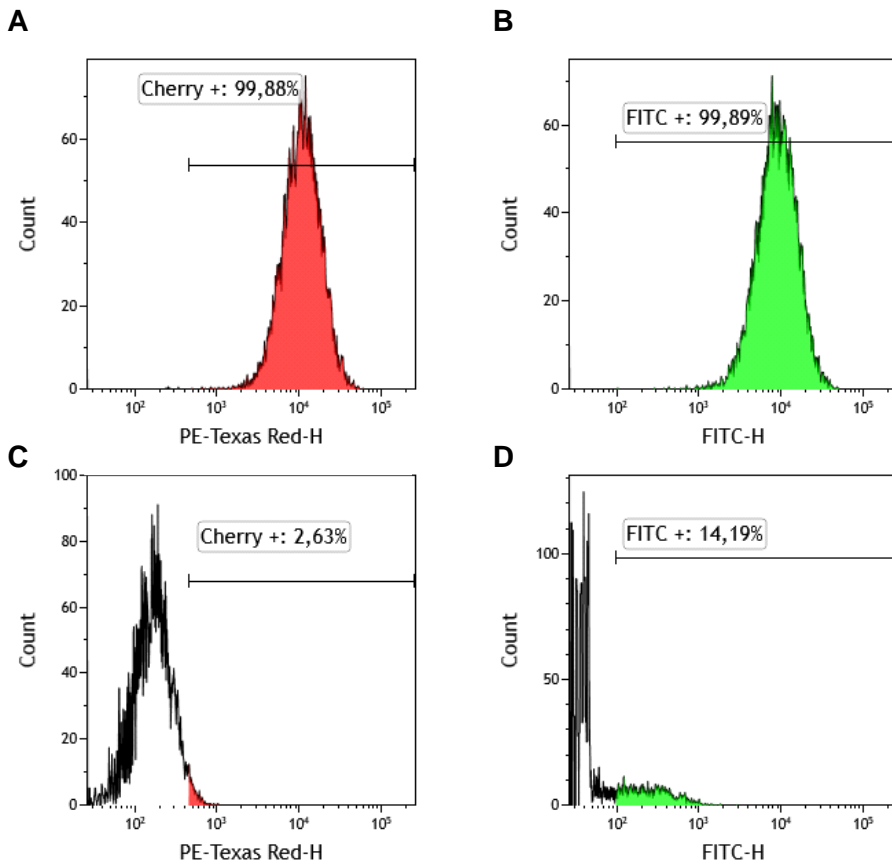


Figure 33 : Problème de maturation des protéines fluorescentes en biofilm

Profils de fluorescence dans le rouge (PE-Texas Red) et dans le vert (FITC) de culture planctonique (**A, B**) ou de culture de biofilm en microfermenteur (**C, D**) de la souche MGcherry F'/pPsfiA*-*gfp* (plasmide portant la fusion transcriptionnelle entre le promoteur PsfiA muté dans la boîte LexA, et le gène *gfp* ; expression constitutive de la GFP). Le % de bactéries rouges ou vertes est indiquée.

Lackes, NJ, USA) en comptant un minimum de 10^6 bactéries. Les bactéries ont été identifiées en fonction de leurs tailles et structures, seuls les singulets ont été pris en compte dans l'analyse. Une culture en MF de la souche MG1656 F' (non fluorescente) a servi à définir les seuils de positivité pour les fluorescences rouge et verte.

La souche MGcherry F'/ pPsfIA*-*gfp* (expression constitutive des gènes *mcherry* et *gfp*) montrait des bactéries rouges et vertes en microscopie confocale lorsqu'elle était cultivée en biofilm en flow-cell microfluidique et au cytomètre lorsqu'elle était cultivée en culture planctonique (Figures 33A et B). Cependant, l'analyse par cytométrie en flux du biofilm de la même souche cultivée en MF, n'a montré quasiment aucune bactérie rouge et seulement une petite quantité de bactéries vertes avec une intensité de fluorescence très faible (Figures 33C et D respectivement).

Nous avons alors cherché à comprendre d'où venait le problème et qu'elle était la différence entre le biofilm en MF et les expériences de microscopie et la culture en planctonique. Dans le biofilm un gradient d'oxygène se forme au fur et à mesure de son développement, avec des zones qui ont peu d'oxygène. Or, les protéines fluorescentes nécessitent de l'oxygène pour devenir mature et fluorescer (Craggs, 2009; Strack et al., 2010). Le biofilm formé dans les MF étant plus « dense » que celui formé dans la flow-cell microfluidique, un manque d'oxygène pourrait expliquer l'absence de fluorescence en cytométrie de flux à l'issue des cultures de biofilm en MF. De plus, en culture planctonique (aération par agitation lors de la culture) les protéines mCherry et GFP fluoresçaient. Nous avons donc conclu que le problème venait probablement de la maturation des protéines mCherry et GFP.

2.2.1. Test d'autres protéines fluorescentes

Nous avons d'abord testé la capacité d'autres protéines fluorescentes à fluorescer après la culture des bactéries en biofilm en MF. Nous disposions au laboratoire du plasmide pZE1R-*evoglow* qui porte une fusion transcriptionnelle entre le promoteur P λ right du phage lambda, et le gène codant la protéine fluorescente verte Evoglow® (Evocatel). Cette dernière

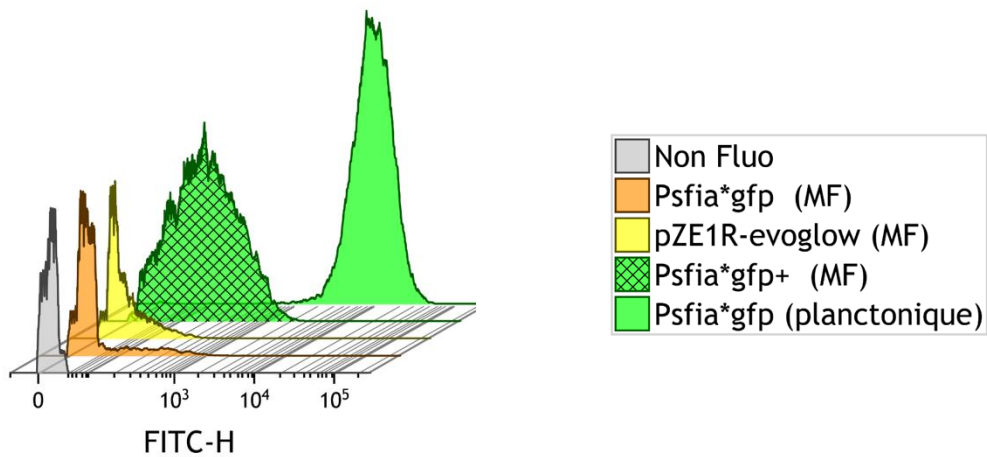


Figure 34 : Capacité de différentes protéines fluorescentes à fluorescer après culture des bactéries en biofilm en microfermenteur

Profils de fluorescence dans le vert (FITC) de la souche d'*E. coli* MG1656 F' portant l'un des plasmides suivants : pPsfiA*-gfp, pZE1R-evoglow, pPsfiA*-gfp+, cultivée 24h en biofilm (microfermenteur, MF), et de la souche MG1656 F' pPsfiA*-gfp (contrôle positif de fluorescence) cultivée en planctonique (24h). L'histogramme en gris représente le profil de fluorescence d'une souche MG1656 non fluorescente cultivée en MF.

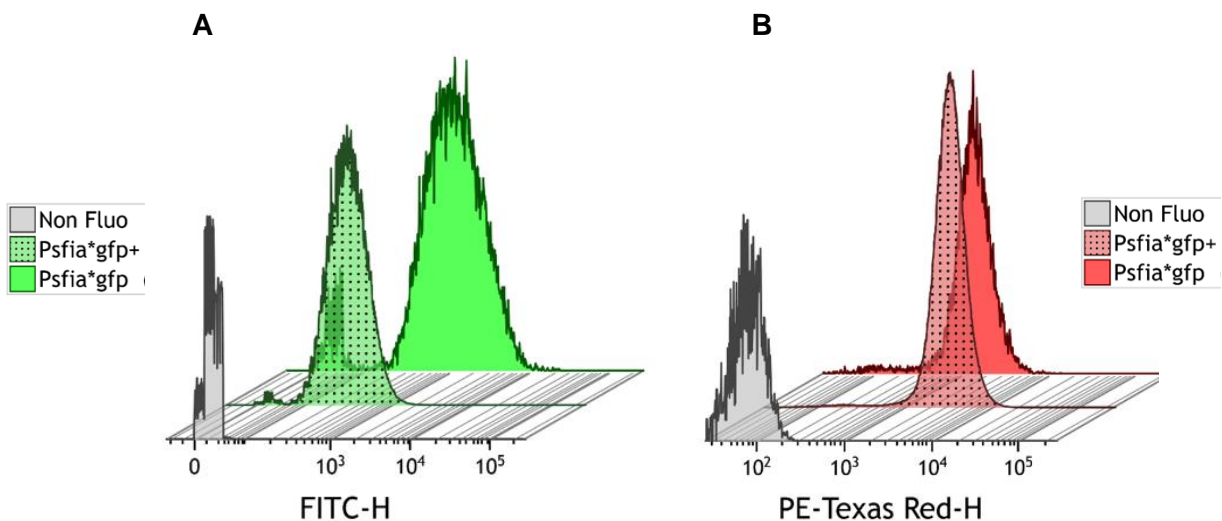


Figure 35 : Capacité de protéines fluorescentes à fluorescer après culture des bactéries en biofilm en chambre ibidi

Profils de fluorescence dans le vert (FITC) (A) et dans le rouge rouge (PE-Texas Red-H) (B) de la souche d'*E. coli* MGcherry F' portant l'un des plasmides suivants : pPsfiA*-gfp, ou pPsfiA*-gfp+ cultivée en chambre ibidi (biofilm) pendant 24h. L'histogramme en gris représente le profil de fluorescence d'une souche MG1656 non fluorescente cultivée et traitée de la même façon.

est une protéine de type FbFPs (Flavin-based fluorescent proteins) dont la maturation est indépendante de l'oxygène (Mukherjee et al., 2013). Nous avons aussi construit le plasmide pPsfIA-*gfp+*, portant la fusion transcriptionnelle PsfiA*-*gfp+* (promoteur PsfiA muté dans la boîte LexA) et le gène *gfp+* codant un variant de la protéine GFP. La protéine GFP+ a une intensité de fluorescence accrue (sensibilité de détection 320 fois supérieur à celle de la GFP) en raison de mutations améliorant l'efficacité de repliement et le rendement de fluorescence (Scholz et al., 2000; Zaborskyte et al., 2017).

Les souches MG1656 F'/pZE1R-*evoglow*, MG1656 F'/ pPsfIA*-*gfp+* et MG1656 F'/ pPsfIA*-*gfp* ont été mise en culture en MF pendant 24h et les biofilms ont été analysés par cytométrie en flux en utilisant une culture planctonique de MG1656 F'/ pPsfIA*-*gfp* comme contrôle positif de fluorescence. Bien que la maturation de la protéine Evoglow® soit indépendante de l'oxygène, son niveau de fluorescence était aussi faible que celui de la GFP (Figure 34). La faible intensité de fluorescence de l'Evoglow® pourrait s'expliquer par le fait que l'intensité de fluorescence des protéines de type FbFPs est relativement faible. L'intensité de fluorescence d'une protéine fluorescente se mesure à sa « brillance » (brillance = coefficient d'extinction x rendement quantique) : plus cette valeur de brillance est grande, plus forte est l'intensité de fluorescence de la protéine. La GFP a ainsi une brillance égale à 33 000, alors que la brillance de l'Evoglow® est de 4 875. Le meilleur profil de fluorescence des protéines testées était celui de la GFP+ (Figure 34). Bien que l'intensité de fluorescence obtenue pour les bactéries du biofilm de MG1656 F'/ pPsfIA*-*gfp+* soit élevée, elle restait bien plus faible que celle de la culture planctonique. En effet, une partie des bactéries émettait une fluorescence qui restait trop proche du signal d'auto-fluorescence des bactéries MG1656 F' (non fluorescente) cultivées en MF, ce qui empêche une quantification précise.

2.2.2. Test d'un autre système de culture de biofilm

Nous avons donc ensuite testé un autre modèle de culture de biofilm. Nous avons utilisé des chambres de culture « ibidi » (Sarstedt). Contrairement aux systèmes de culture biofilm en flow-cell microfluidique ou en MF, les chambres de culture ibidi font partie des

Table 4 : Conditions testées pour l'AFR

Conditions	PBS (1X)		Température		Contenant		Ajout de Cm		Agitation		Temps d'incubation				% bactéries rouges	% bactéries vertes
	pH 7,4	pH 8	Ambiante	4°C	Erlenmeyer	Tube	Oui	Non	Oui	Non	1h	2h	4h	6h		
C1	X			X		X	X		X		X				3%	87% ^a
C2	X			X		X	X		X			X			8%	87%
C3	X			X		X	X		X				X		50%	87%
C4	X			X		X	X		X					X	80%	87%
C5	X			X		X		X	X		X				0%	87%
C6	X			X		X		X	X		X				1%	87%
C7	X			X		X		X	X				X		24%	87%
C8	X			X		X		X	X					X	65%	87%
C9				X		X		X	X		X				0%	87%
C10				X		X		X	X			X			0.5%	87%
C10				X		X		X	X				X		14%	87%
C11				X		X		X	X					X	60%	87%
C12	X			X			X	X		X					50%	87%
C13	X			X		X	X	X			X				90%	87%
C14	X			X		X	X	X					X		96%	87%
C15	X		X				X	X					X		97%	87%
C16	X		X				X	X						X	97%	93%
C17	X		X			X	X	X	X	X	X				98%	88%
C18	X		X			X	X	X	X			X			92%	93%

^aintensité de fluorescence faible

modèles statiques de culture de biofilm (pas de renouvellement de milieu). Ce modèle a néanmoins un certain avantage, car il permet à la fois de visualiser le biofilm *in situ* par microscopie et aussi de le récupérer pour des analyses de cytométrie. Nous avons réalisé une culture de 24h dans ce système en utilisant les souches MGcherry F'/ pPsfIA*-*gfp* et MGcherry F'/ pPsfIA*-*gfp*+. Brièvement, Les chambres de culture ont été inoculées avec 1ml de culture bactérienne de nuit diluée à 10^9 bactéries/ml ($DO_{600}=2$), les bactéries ont ensuite été incubées 1h à 37°C afin de permettre aux bactéries d'adhérer à la surface, puis la culture bactérienne a été enlevée et remplacée par 1ml de milieu LB. Après 24h de culture à 37°C, les bactéries planctoniques présentes en suspension dans le milieu ont été retirées délicatement, le biofilm a été rincé avec 1ml de PBS 1X avant d'être resuspendu dans 1ml de PBS 1X. L'analyse par cytométrie en flux des biofilms a montré que 99% de bactéries étaient rouges et vertes quelle que soit la construction utilisée (Figure 35). Cependant, la biomasse récupérée avec ce système de culture était d'environ 2×10^8 bactéries, donc trop faible pour réaliser les expériences de tri (cf paragraphe 3) pour lesquelles il faut au moins 1×10^9 bactéries.

2.2.3. Méthode de « récupération de la fluorescence en aérobie »

Comme nous l'avons vu en introduction (chapitre II section 6.1.3), il a été démontré que des protéines dérivées de la GFP et de la DsRed peuvent rester dans un état intermédiaire immature non fluorescent jusqu'à ce qu'elles subissent une maturation post-traductionnelle lors de l'exposition à l'air *via* une approche dite d'« aerobic fluorescence recovery » (AFR) (Pinilla-Redondo et al., 2018). Nous avons appliqué cette méthode au biofilm en MF obtenu avec la souche MGcherry F'/pPsfIA*-*gfp*+, la protéine GFP+ ayant le meilleur profil de fluorescence des différentes protéines fluorescentes testées (Figure 36). Le biofilm de 24h a été resuspendu et dilué dans du PBS 1X froid à une concentration de 10^7 bactéries/ml, puis exposé à l'air pendant un temps variable (de 1 à 6 heures ; Table 4). Nous avons aussi testé différentes conditions (pH du tampon, température, contenant, agitation ; Table 4). Afin de s'assurer que le signal fluorescent récupéré était exclusivement due à la maturation des protéines produites dans le biofilm et non pas à la synthèse de nouvelles protéines lors de

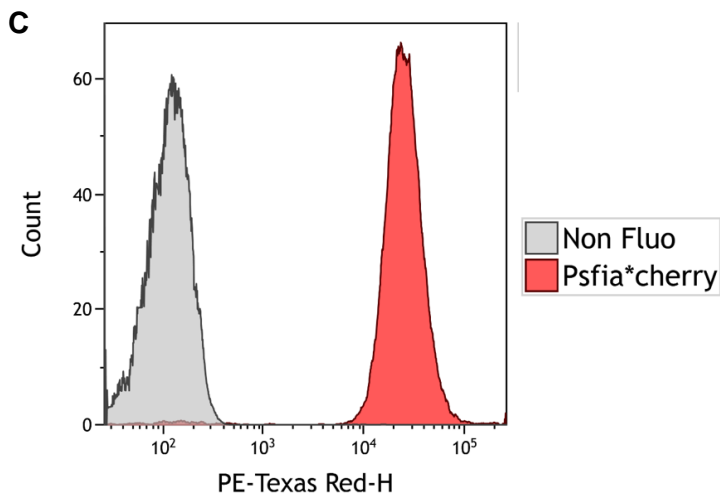
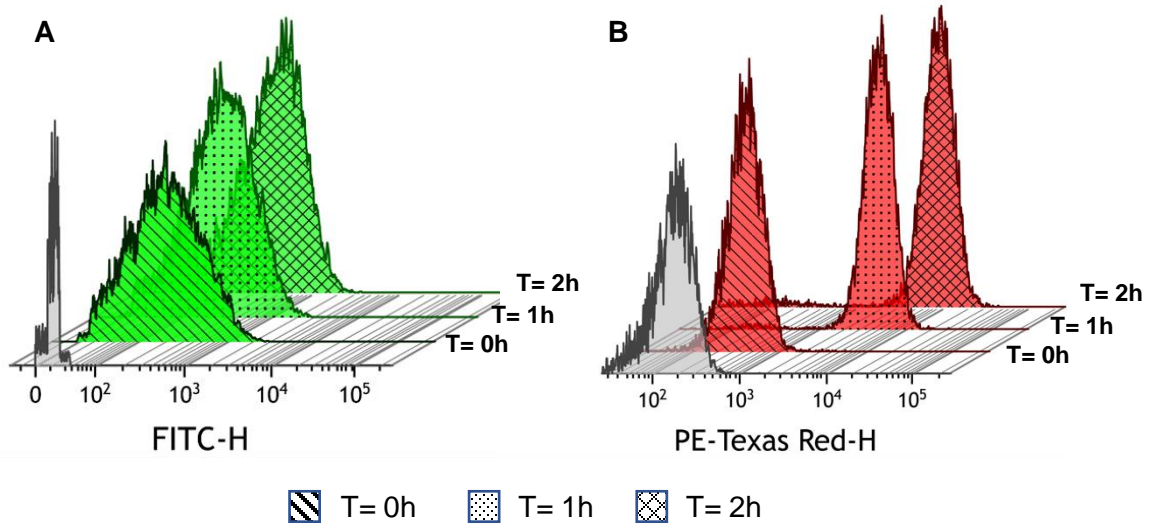


Figure 36 : Effet de l'AFR sur la maturation des protéines GFP+ et mCherry

Profils de fluorescence dans le vert (FITC-H) (A) et dans le rouge (PE-Texas Red-H) (B) de la souche MGcherry F' / pPsfia*-*gfp*+ cultivée en microfermenteur pendant 24h puis exposée à l'air pendant 0, 1 ou 2h en erlenmeyer sous agitation à température ambiante, avant analyse en cytométrie en flux (les temps (T) sont indiqués). Profil de fluorescence dans le rouge (PE-Texas Red-H) de la souche MG F' / pPsfia*-*cherry* (C) cultivée en MF pendant 24 puis exposée à l'air pendant 1h en erlenmeyer sous agitation, à température ambiante. L'histogramme en gris représente le profil de fluorescence d'une souche MG1656 non fluorescente cultivée et traitée de la même façon.

l'exposition à l'air, nous avons rajouté à la suspension de biofilm du chloramphénicol, un inhibiteur de la traduction (Pinilla-Redondo et al., 2018) ; cet antibiotique n'induit pas la réponse SOS chez *E. coli* (Baharoglu and Mazel, 2011).

Contrairement à la GFP+, pour laquelle nous n'avons observé aucun décalage du niveau de fluorescence quelles que soient les conditions testées, la fluorescence de la protéine mCherry a évolué fortement (Figure 36A et B). Parmi toutes les conditions testées, la C17 (Table 4) est celle qui a permis la meilleure récupération de la fluorescence rouge dans un temps court. Dans le biofilm resuspendu (T0) seulement 1.2% des bactéries du biofilm émettaient une fluorescence rouge. Après 1h d'incubation avec agitation dans un erlenmeyer à température ambiante, 99% des bactéries étaient rouges avec une intensité de fluorescence permettant de bien les différencier du témoin négatif non fluorescent (Figure 36B). La protéine fluorescente mCherry s'est donc avérée être un meilleur gène rapporteur que la GFP+ dans ce contexte particulier de culture de biofilm en MF. Par conséquent, nous avons construit des fusions transcriptionnelles entre le promoteur du gène *sfiA* (version sauvage ou mutée dans la boîte LexA, P*sfiA* et P*sfiA** respectivement) et le gène codant la protéine fluorescente *mCherry* : P*sfiA*-*cherry* et P*sfiA**-*cherry*. Nous avons bien confirmé avec la souche MG1656 F'/ pP*sfiA**-*cherry* que l'on pouvait nettement séparer et quantifier les bactéries fluorescentes après 1h d'AFR à température ambiante (Figure 36C). Ce sont donc les fusions transcriptionnelles avec *mcherry* qui ont été utilisées pour quantifier le nombre de bactéries exprimant le gène *sfiA* (réponse SOS) en biofilm par cytométrie en flux (cf paragraphe 3), et aussi pour trier ces bactéries par FACS.

3. Mise au point de la quantification par RT-qPCR du niveau d'expression d'un gène d'intérêt dans les populations de bactéries triées

Différentes étapes ont dû être optimisées pour arriver à quantifier le nombre de transcrits à partir d'échantillons de bactéries triées par FACS contenant peu de bactéries (10^5 à 10^6 bactéries).

Table 5 : Conditions testées pour optimiser la lyse des bactéries

Conditions	Lysozyme (mg)		Protéinase K (µg)		Incubation (minutes)		Température d'incubation			Lyse mécanique	
	0,1	1,5	0	200	10	30	Ambiante	37°C	56°C	Oui	Non
	C1		X		X	X		X			X
C2		X		X	X		X				X
C3		X		X	X			X			X
C4	X		X		X			X			X
C5	X		X		X		X				X
C6		X	X			X		X			X
C7		X		X		X		X			X
C8	X		X			X		X			X
C9		X		X		X			X		X
C10		X		X		X		X	X		X

3.1. Extraction d'ARNs

Les kits destinés à l'extraction d'ARN à partir de peu de matériel biologique donnent toujours des renseignements concernant la quantité d'ARN qu'il est possible d'extraire à partir de cellules eucaryotes ou de tissus, mais rarement à partir de bactéries et encore moins à partir d'un faible échantillon de bactéries (inférieur à 10^8 bactéries). L'autre difficulté rencontrée lorsque l'on extrait de l'ARN à partir d'une faible quantité de matériel biologique est l'estimation de la concentration de l'ARN purifié. Cette estimation est indispensable pour réaliser une réaction de RT-qPCR en utilisant la même quantité d'ARN initiale pour chacun des échantillons à comparer. Nous avons accès sur la plateforme d'acides nucléiques de BISCem, au Bioanalyseur® qui permet à la fois de quantifier des échantillons d'ARN avec une concentration minimale de 50pg/ μ l (en utilisant le kit RNA 6000 Pico) et de calculer un RIN (RNA integrity number) qui témoigne de la qualité de l'échantillon d'ARN.

Nous avons donc testé cinq kits d'extraction d'ARN et différentes conditions de lyse des bactéries pour optimiser la réaction d'extraction lorsque cela était possible car certains fabricants ne recommandent pas de traitement préalable des échantillons avant extraction, (Table 5). Les tests d'extraction d'ARN ont été réalisés à partir de 10^6 bactéries.

Parmi les cinq kits testés, seuls 3 kits ont permis d'obtenir des ARNs suffisamment concentrés pour être dosés au Bioanalyseur® (Table 6).

Table 6 : Efficacité des kits en termes de concentration d'ARN

Kits testés	Concentration obtenue (pg/ μ l)	Volume d'élution
Nucleospin RNA- Macherey Nagel	< 50	40 μ l
Nucleospin RNA XS- Macherey Nagel	50	15 μ l
Nucleospin RNA XS Plus- Macherey Nagel	208	10 μ l
RNeasy Plus Micro - Qiagen	< 50	10 μ l
RNeasy Mini- Qiagen	792	30 μ l

Le kit RNeasy (Qiagen), en améliorant l'étape de lyse, est celui qui a permis d'obtenir le meilleur rendement. Brièvement, le culot bactérien a été resuspendu dans du tampon TE (30 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) contenant 100 μ g de lysozyme et 200 μ g de Protéinase

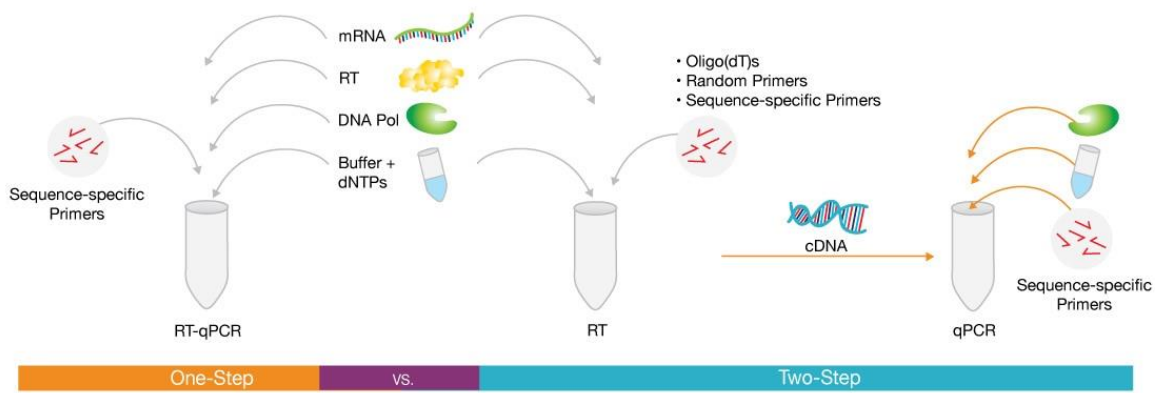


Figure 37 : RT-qPCR « One-Step » versus « Two-Step »

K, puis incubé pendant 10 min à 37°C sous agitation (300 rpm). Ensuite l'ARN a été extrait avec le kit selon les recommandations du fabricant. La concentration et la qualité des ARNs extraits ont été estimées à l'aide d'un BioAnalyseur®.

3.2. Quantification du niveau d'expression de gènes par RT-qPCR à partir d'une faible quantité d'ARN

La RT-qPCR est une des techniques largement utilisée pour quantifier le niveau d'expression de gènes. L'ARN est tout d'abord rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc) grâce à une transcriptase inverse. L'ADNc est ensuite utilisé comme matrice pour réaliser une PCR quantitative (qPCR). En général, les kits de rétrotranscription (RT), suggèrent d'utiliser de 500ng à 1µg d'ARN par réaction pour synthétiser les ADNc. Comme vu ci-dessus, la quantité maximale d'ARN obtenue à partir de 10⁶ bactéries était d'environ 25 ng. Il était donc nécessaire de trouver un kit de RT qui permette de synthétiser des ADNc à partir d'une faible quantité initiale d'ARN (environ 100pg) et un kit de qPCR assez sensible pour mesurer l'abondance de l'expression d'un gène à partir d'une faible quantité d'ADNc. Il existe deux types de RT-qPCR : « One-Step » ou « Two -Step » (Figure 37). La RT-qPCR « One-step » combine les étapes de RT et de qPCR dans un seul tube et un seul tampon, en utilisant une transcriptase inverse et une ADN polymérase. La transcriptase inverse des RT-qPCR « One-step » utilise les mêmes amorces que la qPCR pour synthétiser les ADNc, ce qui augmente la sensibilité de la réaction. Dans les RT-qPCR « Two-step », les étapes de RT et de qPCR sont réalisées dans des tubes séparés.

Nous avons testé cinq kits commerciaux (4 kits « one-step » et un « two-step » Table 7) avec une sonde fluorogénique (sonde Taqman) spécifique du gène *rpoB*, pour détecter la cible au fur et à mesure qu'elle s'accumule au cours de la PCR. Les différents kits ont été testés selon les recommandations des fabricants.

Le niveau d'expression du gène *rpoB* a été quantifié en utilisant une gamme de 10, 50, 100 ou 500 pg d'ARN de départ. Une gamme standard pour la qPCR a été réalisée à partir d'une solution contenant le plasmide pSU38-*gyrB-rpoB-cherry-int11-sfiA* (concentré à 0,2.10⁹

Table 7 : Comparaison d'efficacité des kits en termes de sensibilité de détection

Types de RT-qPCR	Kits testés	Efficacité	R ²	CT (Réaction à partir de X pg d'ARN)			
				10pg	50pg	100pg	500pg
Two-Step	QuantiNova Reverse Transcription Kit & QuantiNova Probe PCR Kit (Qiagen)	90%	0.987	36	32	33	29
				ND	ND	ND	ND
One-Step	One-Step TaqProbe qRT-PCR Kit (Applied Biological Materials)	600.2%	0.700	ND	ND	ND	ND
	One Step Luna (New England Biolabs)	101.2%	0.997	ND	38	37	35
	QuantiNova Probe RT-PCR Kit (Qiagen)	103%	0.995	35	33	31	29
	TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix – (Thermo Fisher)	103%	0,985	30	28	27	24

copies/5 μ L) dilué successivement de 10^8 à 10^2 copies de plasmides/ μ L. Les résultats obtenus pour des quantifications d'ARN sont présentés dans la Table 7. Quatre des kits testés avaient une bonne sensibilité de détection avec une efficacité de $\approx 100\%$ et un $R^2 \approx 0.9$, un donnait des résultats aberrants (Table 7). Nous avons choisi le kit « One-step » TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermo Fisher qui était le seul kit permettant d'obtenir des CT inférieurs à la limite de détection CT=32 (la qPCR étant quantitative seulement jusqu'à 10^2 copies ≈ 32 CT) quelle que soit la quantité d'ARN utilisée.

Résultats

1 **Microniches in biofilm depth are hot-spots for antibiotic resistance acquisition**
2 **in response to *in situ* stress**

3

4 Linda Tlili¹, Marie-Cécile Ploy¹, and Sandra Da Re¹

5

6 ¹ University of Limoges, INSERM, CHU Limoges, RESINFIT, U1092, F-87000 Limoges,
7 France

8

9 Address correspondence to :

10 Sandra Da Re

11 Postal address : UMR1092, CRBS, Rue du Pr Bernard Descottes, 87025 Limoges Cedex,
12 France

13 Tel : (+33) (0)519 564 263

14 e-mail : sandra.da-re@unilim.fr

15



16 **Abstract**

17 Class 1 integrons play a major role in antibiotic resistance dissemination among Gram-
18 negative bacteria. They are genetic platforms able to capture, exchange and express antibiotic
19 resistance gene cassettes. The integron integrase, whose expression is regulated by the
20 bacterial SOS response, is the key element of the integron catalyzing
21 insertion/excision/shuffling of gene cassettes. We previously demonstrated that the basal level
22 of integrase expression and in consequence, its activity, is increased *via* the starvation-induced
23 stringent response in the biofilm population. However, biofilms are heterogeneous
24 environments where bacteria are under various physiological states. Here we thus analyzed
25 at the bacterial level, the SOS response and integrase expression within the biofilm, using
26 confocal microscopy and flow cytometry. We showed that in the absence of exogenous stress,
27 only a small number of bacteria (~ 1%) located in the depth of the biofilm induce the SOS-
28 response leading to a high level of integrase expression, through both a stringent response-
29 dependent and -independent manner. Our results thus indicate that few bacteria located in
30 microniches of the biofilm depth undergo sufficient endogenous stress to promote the
31 acquisition of antibiotic resistance, forming a reservoir of bacteria ready to rapidly resist
32 antibiotic treatments.

33

34 **Introduction**

35 In natural settings, bacteria most often live in complex communities attached to surfaces known
36 as biofilms [1]. Biofilms are highly heterogeneous environments where bacteria experience
37 local gradients of physical (temperature, pH) and biological (nutrients, oxygen, waste products)
38 parameters, resulting in microniches of distinct bacterial subpopulations [2]. Early biofilm
39 characterization studies used the biofilm as a whole, which provided global information
40 averaging the entire biofilm bacterial population [2,3]. In the last decades, the use of fluorescent
41 reporter genes in combination with confocal scanning laser microscopy (CLSM) has proven to
42 be particularly useful for monitoring gene expression heterogeneity within biofilms [4–8].
43 Fluorescence-activated cell sorting (FACS) offered complementary information allowing to
44 separate biofilm subpopulations to further characterize them independently [9–11]. All these
45 techniques have helped to show that biofilms favor horizontal gene transfer [12], the main
46 driving force for the emergence and dissemination of antibiotic resistance. One of the most
47 striking characteristics of the biofilm is its recalcitrance towards antibiotics and host defenses,
48 leading to treatment failure and infection recurrence[13].

49 Resistance integrons (RI) are low-cost structures allowing bacteria to rapidly adapt to antibiotic
50 pressure [14,15]. They play a major role in the spread of antibiotic resistance among Gram-
51 negative bacteria [14]. Integrons are genetic platforms able to capture, exchange and express
52 resistance genes embedded within gene cassettes (GC) from a common promoter Pc [16].
53 The integrase, Intl, is the key element of the integron system, catalyzing GC insertion and
54 excision through site-specific recombination [17]. Among the five classes of RIs identified
55 based on the Intl amino acid sequence, class 1 RIs are the most frequently reported in
56 antibiotic-resistant clinical isolates [18,19]. The expression of the class 1 integrase, Intl1, is
57 controlled by the bacterial SOS response, a global regulatory network addressing DNA
58 damages and mainly governed by the transcriptional repressor LexA [20,21]. We recently
59 reported that in the absence of exogenous stress, the expression level of the *intl1* integron
60 integrase, as well as that of the SOS regulon gene *sfiA*, was higher in a continuous biofilm

61 culture than in a planktonic culture [22]. This increase depended on the RelA and SpoT
62 proteins, the regulators of the stringent response (stress response induced upon starvation
63 and whose effectors are the alarmones (p)ppGpp [23]). However these data were obtained
64 from the whole biofilm and may not reflect what actually happens within its heterogeneous
65 structure, where not all bacteria are subjected to nutrient starvation [24]. Herein, using CLSM
66 and FACS approaches, we could refine our previous observation, and showed that actually
67 only a very small number of bacteria located in the depth of the biofilm expressed *intI1* and
68 *sfiA* genes at a high level in both a *relA/spoT*-dependent and -independent manner in the
69 absence of exogenous stress. Most importantly our results highlight that endogenous stress in
70 specific microniches in the depth of the biofilm would be sufficient to form a reservoir of bacteria
71 fully ready to develop antibiotic resistance upon antibiotic treatments.

72

73 **Materials and methods**

74 **Strains and growth conditions**

75 Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Strains were grown
76 under planktonic or biofilm conditions at 37°C in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with
77 kanamycin (Km; 25µg/ml) when required.

78 Biofilms in continuous culture were grown for 24 h in a glass microfermentor containing a
79 removable spatula, as previously described [22]. Briefly, the microfermentor were inoculated
80 by dipping the spatula for 2 min into 15 ml of over-night bacterial culture containing 1×10^9
81 cells/ml, followed by a brief rinse in LB medium before insertion in the microfermentor and start
82 of the culture. After 24h, the biofilm was resuspended by vigorously shaking the
83 microfermentor, and the biofilm biomass was estimated by determining the optical density at
84 600 nm (OD_{600}).

85 For planktonic culture, 100 µl of the culture used to inoculate the microfermentor was diluted
86 in 10 ml of LB and grown for 24 h at 37°C with shaking.

87

88 **Construction of the MG1656 λ att::cherry F' strain**

89 The *E. coli* MG1656 λ att::mcherry strain, expressing red fluorescent protein (mCherry), was
90 constructed by integrating a *km-frt-mcherry* cassette at the *E. coli* λ att site in a three-step-
91 PCR-based approach, and removing the Km resistance gene with the FLP recombinase as
92 previously described [25]. Primers used to construct and verify the strain, are listed in Table
93 S1. The F' plasmid was introduced by conjugation in this strain from the NEB5-alphaF' strain.

94

95 **Plasmid construction**

96 pPsfIAgfp+ and pPsfIA*gfp+ were constructed by amplifying the *gfp+* gene (encoding a GFP
97 variant with increased fluorescence intensity [8]) from plasmid pGZA1 (Table 1) using primers
98 PsfiA-gfp(+)INF-5 and PsfiA-gfp(+)INF-3 and cloning the amplified fragments into plasmids
99 pSU38PsfIA*lacZ* and pSU38PsfIA**lacZ* respectively, digested with BamHI and HindIII, using
100 the In-Fusion HD cloning kit (Clontech, Kusatsu, Japan) following manufacturer's instructions.
101 pPsfIAcherry-pintl1*intl1* and pPsfIA*cherry-Pintl1*intl1* were constructed by amplifying first the
102 *mcherry* gene encoding a red fluorescent protein from pCTX2-groE-mCherry using primers
103 hindIII-mcherry and bamHI-mcherry2 and cloning the amplified fragment into pSU38PsfIA*lacZ*
104 and pSU38PsfIA**lacZ* respectively digested with BamHI and HindIII, yielding pPsfIAcherry and
105 pPsfIA*cherry. Primers ter-intl-fwd-2 and inTI-pSU-rev, ter-ter-fwd-2 and ter-intl-rev-3, and
106 pSU-ter-fwd-2 and ter-ter-rev-2, were used to amplify respectively the *intl1* gene and the
107 lambda t0 terminator from pZE1-*intl1* (Table 1). These fragments were cloned at the XmnI site
108 of pPsfIAcherry and pPsfIA*cherry respectively using the In-Fusion HD cloning kit (Clontech).
109 All constructs were verified by PCR and sequencing. All primers are listed in Table S1.

110

111 **Time-lapse Microscopy with Microfluidic flow-cell**

112 Experiments were performed with a CellASIC® ONIX2 microfluidic system
113 (www.cellasic.com). Microfluidic biofilm cultures were grown in M04S microfluidic plates (EMD
114 Millipore, Burlington, Massachusetts, USA). After priming with culture media, the cell culture

115 chamber was loaded with 10µl of overnight bacterial culture diluted to 5×10^7 cells/ml with a
116 flow pressure of 0,25 psi for 6 s. Bacteria were allowed to attach to the surface for 15min
117 without media perfusion, before starting a laminar flow of 7µl /h (1psi) for 24h. The temperature
118 was maintained at 37°C. Image acquisition was performed with a Carl Zeiss (Oberkochen,
119 Germany) LSM 880 inverted confocal microscope equipped with a large incubator chamber
120 allowing temperature control, and a 40X oil immersion objective. At least three positions were
121 selected along the chamber for real-time imaging. Images were captured every 2h during 24h
122 with a constant 0.4 µm Z-step and were analyzed using the IMARIS 9.6 software (oxford
123 instruments, Tubney Wood, UK). Experiments were performed at least three times.

124

125 **Aerobic fluorescence recovery (AFR)**

126 Resuspended 24 hours old microfermentor-biofilms were diluted in PBS 1X to a final
127 concentration of 10^7 bacteria/ml. Chloramphenicol (Cm) was added at a final concentration of
128 100 µg/ml to prevent further protein synthesis [26]. Samples were incubated at room
129 temperature during 1h with shaking (300 rpm) to allow AFR [27].

130

131 **Determination of the proportion of red-fluorescent bacteria by flow cytometry**

132 The resuspend biofilm after AFR was analyzed counting 10^6 bacterial cells with a BD FACSAria
133 III cell sorter (Becton Dickinson, Franklin Lacks, NJ, USA). Bacteria were excited with 560nm
134 yellow green laser and red fluorescence was collected in the PE-Texas-Red channel
135 (610/20nm). Bacteria were gated on basis of their distribution on forward vs side scatter plots.
136 Red bacteria were gated based on their distribution on side scatter vs PE-Texas-Red
137 fluorescence plots. The background signal was determined with a non-fluorescent bacteria
138 biofilm. Thresholds were applied manually to determine the boundaries between the different
139 populations and remained the same for all experiments. Data were analyzed using the
140 FlowLogic™ software (Inivai Technologies, Mentone, Australia).

141

142 **Sorting of bacterial subpopulations**

143 Red-fluorescent bacteria were sorted from the resuspended biofilm after AFR using a BD
144 FACS Aria III cell sorter (Becton Dickinson). Cells were collected in Nucleoprotect RNA solution
145 (Macherey-Nagel, Dueren, Germany). Bacteria were gated as described above. The sort
146 collection chamber was maintained at 4°C. Up to $2 \cdot 10^6$ and $5 \cdot 10^5$ bacteria were collected in 2
147 hours for respectively both intermediate- and non-fluorescent-, and super-fluorescent-biofilm
148 populations. For the *MG Δ relA Δ spoT* super-fluorescent population approximately $3 \cdot 10^5$
149 bacteria were collected in 3 hours.

150

151 **Quantification of transcripts**

152 The pellet of sorted bacteria were incubated in 100 μ l of TE (30 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH
153 8.0) in the presence of 100 μ g of lysozyme and 200 μ g of Proteinase K for 10 min at 37°C with
154 shaking. Total RNA was then extracted with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)
155 following manufacturer's instructions. RNA concentration, quality and integrity were evaluated
156 with the Agilent RNA 6000 Pico kit on a Bioanalyzer. cDNA were synthesized from 100 pg of
157 RNA and quantified using the TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix (Thermofisher,
158 Waltham, Massachusetts, USA) following manufacturer's instructions with appropriate
159 oligonucleotides and Taqman probes (Table S1). Assays were performed with a CFX96 Touch
160 detection system (Bio-Rad®, Hercules, Californie, USA) using the following PCR cycling
161 conditions: 5 min at 50°C (retro-transcription reaction (RT)), 20s at 95°C (RT enzyme
162 inactivation) and 40 cycles at 95°C for 15s and 60°C for 45s. Assays were performed in
163 triplicate from six independent sorting.

164

165 **Quantification of plasmid copy number**

166 Sorted subpopulations were resuspended in 300 μ l of PBS 1X and incubated at 95°C for 10
167 min. Debris were removed by centrifugation, 5 min at 11000 g. Concentration of the extracted
168 DNA was measured with Qubit 4 Fluorometer (Thermofisher) and normalized to 5 pg/ μ l in
169 water. Quantification of *mcherry* and *gyrB* (single gene copy on the plasmid and on the
170 chromosomal DNA respectively) copy number was made from 25 pg of DNA using the

171 LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe kit (Roche, Bâle, Switzerland) following
172 manufacturer's instructions with appropriate oligonucleotides and Taqman probes (Table S1).
173 Assays were performed with a CFX96 Touch detection system using the following PCR cycling
174 conditions: 10 min at 95°C followed by 40 cycles at 95°C for 30s and 60°C for 1min. Assays
175 were performed in triplicate on each population from five independent sorting. The plasmid
176 copy number was estimated as the ratio of *mcherry* copy number/ *gyrB* copy number.

177

178 **Statistical analysis**

179 Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8 (version 8.4.3) for Windows,
180 GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com. For two groups comparison
181 a two-tailed Wilcoxon test (paired) or Mann–Whitney U-test (unpaired) test was used.

182 Statistically significant differences were defined by a p value lower than 0.05.

183

184 **Results**

185 **Heterogeneity of the SOS response level within the *E. coli* biofilm**

186 To assess the spatial distribution of the bacteria inducing the SOS response and thus
187 expressing *int11* within the biofilm in the absence of any exogenous stress, we used a
188 continuous microfluidic culture system coupled with confocal microscopy allowing the
189 development of a three-dimensional biofilm in a flow chamber and its visualization in real-time.
190 We used the *E. coli* MG1656 F' tagged on the chromosome with the *mcherry* gene encoding
191 a red-fluorescent protein expressed from a constitutive promoter (hereafter named MGcherry
192 F'; Table 1). We monitored the expression of *int11* and *sfiA* genes, both regulated by the SOS
193 response, using transcriptional fusions between their respective promoters, P_{int11} and P_{sfiA},
194 and the fluorescent reporter gene, *gfp+*. The plasmid pP_{sfiA}*-*gfp+*, in which the LexA binding
195 region is mutated leading to constitutive expression of *gfp+*, was used as a positive control of
196 fluorescence and SOS response. The pSUΔ_{tot}/*lacZ* plasmid was used as negative control
197 (Table 1). We knew from our previous study that in biofilm, P_{sfiA} activity fully depends on an

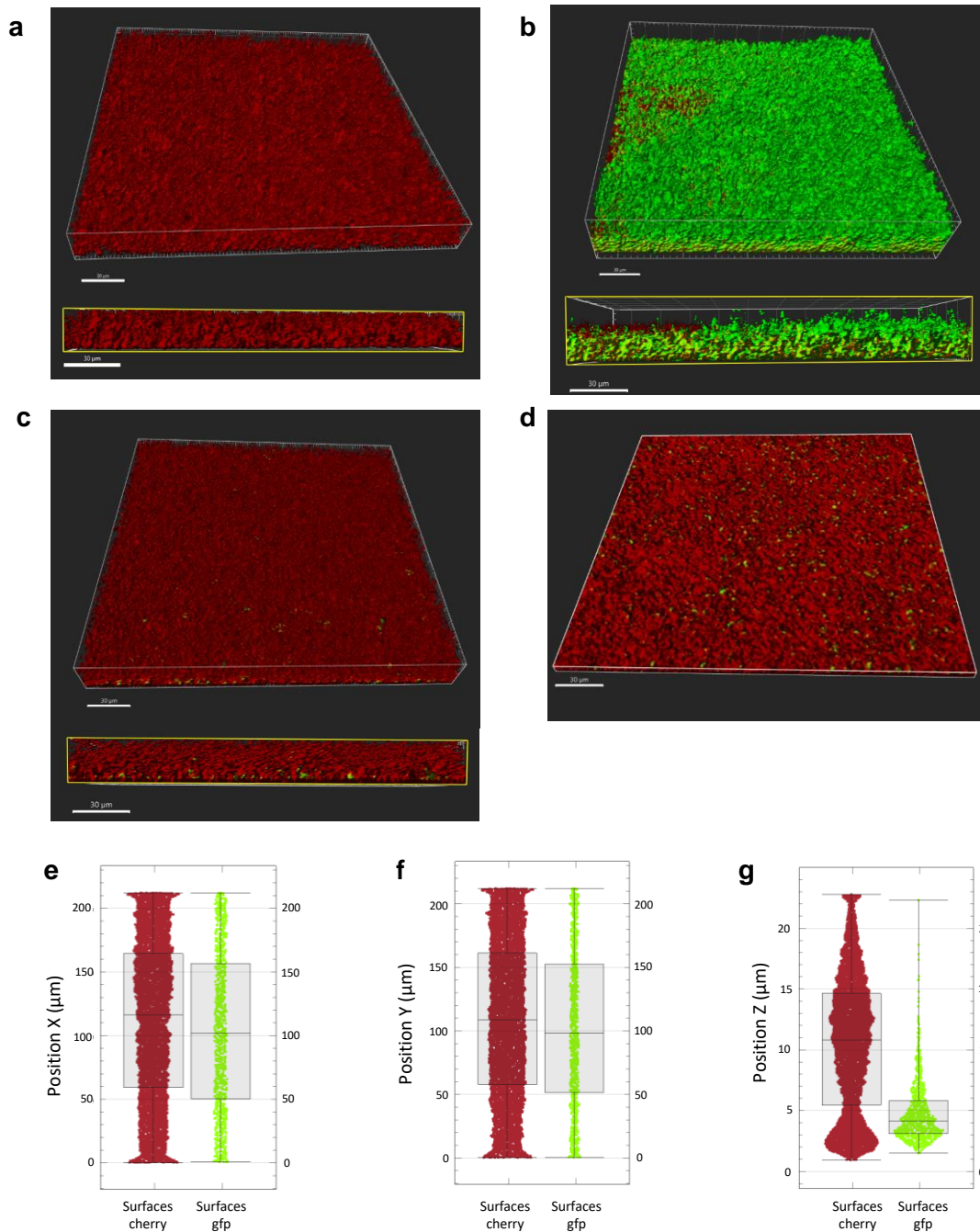


Fig. 1: *sfiA* expression is heterogeneous and localized within the biofilm

a, b, c, CLSM images and section of the XZ planes of respectively *MGcherry F'/pSUDtot*, *MGcherry F'/pPsfIA*-gfp+* and *MGcherry F'/pPsfIA-gfp+* biofilms grown for 24h at 37°C in microfluidic flow-cell chamber. **d**, XY plan section of the *MGcherry F'/pPsfIA-gfp+* biofilm image (c) at 5 μm depth. z-stacks were generated using a Zeiss LSM 880 microscope and processed with Imaris 9.6 software (Bitplane). Scale bar represents 30 μm. **e, f, g**, 1D plot representing the total number of green and red fluorescent bacteria in the biofilm as a function of their X-position, Y-position and Z-position respectively. Boxplots are designed as median, the lower quartile (Q1) and the upper quartile (Q3). Whiskers are extended to the extreme data points. All images are representative of one position among 10 taken for each condition. Experiments were done in triplicate.

198 active SOS response, as *PsfIA* is inactive in a *MGΔrecA* mutant (no activator of the SOS
199 response, RecA) and fully derepressed in a *MGΔlexA* mutant (no repressor of the SOS
200 response, LexA) [22].

201 Biofilms of *MGcherry F'* carrying one of the plasmids were grown for 24h in LB at 37°C. As
202 expected, the CLSM images showed that the *MGcherry F'/pSUΔtot* biofilm contained only red
203 bacteria and the *MGcherry F'/pPsfIA*-gfp+* biofilm contained bacteria that were both red and
204 bright green (Fig. 1a and 1b). As seen on Fig. 1c and 1d, the *MGcherry F'/pPsfIA-gfp+* biofilm
205 contained mainly red bacteria and very few both red and green bacteria. The 1D dot plot
206 representing the distribution of bacteria as a function of their spatial localization further showed
207 an uneven distribution of green bacteria on the z-axis of the 3D image of the biofilm compared
208 to the x- and y- axes (Fig. 1g, 1e and 1f respectively). These results indicated that in the
209 absence of exogenous stress, the *PsfIA* promoter is activated (green bacteria) in a minority of
210 bacteria preferentially located in the depth of the biofilm.

211 We then estimated the proportion of these bacteria in the biofilm, using a FACS approach,
212 which allowed to analyze each bacterium separately. To obtain enough biomass for FACS
213 analysis, we grew our biofilms in a continuous culture in microfermentor [28]. Surprisingly, we
214 detected no red fluorescence from the *MGcherry F'/pPsfIA*-gfp+* biofilm, and only 87% of the
215 bacteria in the biofilm emitted green fluorescence, which was of very low intensity. We
216 postulated that this lack or low level of fluorescence was related to the biofilm model itself.
217 Indeed, as the microfermentor-biofilm is thicker and larger than the microfluidic flow chamber
218 one, the oxygen concentration might be more limiting, therefore impairing the maturation of the
219 GFP+ and mCherry fluorescent proteins [27].

220 To complete the protein maturation to a fully fluorescent form, we added a step of AFR after
221 biofilm growth [27]. The resuspended microfermentor-biofilm was incubated for one hour at
222 room temperature with shaking in the presence of chloramphenicol to prevent further protein
223 synthesis [26]. This method allowed full recovery of red fluorescence (mCherry) with high
224 fluorescence emission intensity. However, for the green fluorescence, the fluorescence

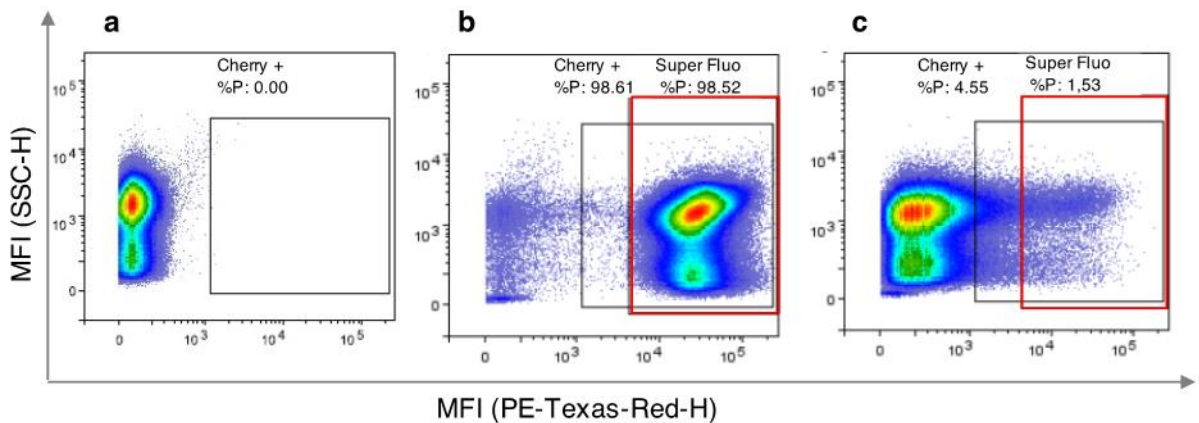


Fig. 2. Quantification of cells expressing *sfiA* in biofilm

Flow cytometry dot-plot analyses of a 24h-old biofilm of strain (a) MG F'/pSU Δ tot, (b) MG F'/pPsfIA**cherry*-Pint1:*intl1* and (c) MG F'/pPsfIA*cherry*-Pint1:*intl1* grown in continuous culture in microfermentor. Counting was performed after one hour of aerobic fluorescence recovery at room temperature. The black square delimits the cherry-positive population (cherry +) based on the non-fluorescent strain MG F'/pSU Δ tot (panel a), and the red rectangle defines the cherry-super-fluorescent population (super Fluo) based on derepressed cherry expression in strain MG F'/pPsfIA**cherry*-Pint1:*intl1* (panel b). The data represent one representative experimental replicate.

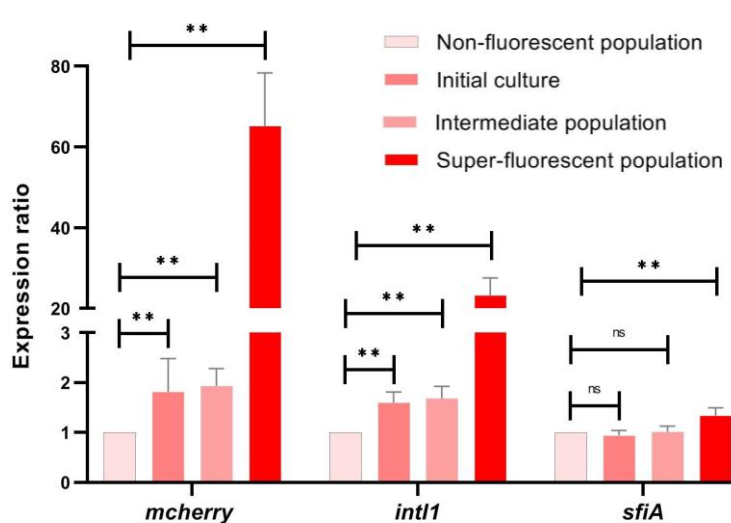


Fig. 3. Differential expression of *mcherry*, *intl1* and *sfiA* in biofilm subpopulations

Expression ratio of *mcherry*, *intl1* and *sfiA* transcripts from initial culture (dark pink) and sorted sub-populations (non-fluorescent (light pink), intermediate (medium pink) and super-fluorescent (red)) of a 24-old biofilm of MG F'/pPsfIA*cherry*-Pint1:*intl1* grown in microfermentor. Relative quantification of *mcherry*, *intl1* and *sfiA* was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, the transcript number of each gene was normalized to the endogenous *gyrB* gene and calibrated to the non-fluorescent population. Data are the average of transcripts levels measured from 6 independent sorting experiments. Errors bars indicate the SD. Asterisks indicate significant difference: ** $p < 0.01$; ns: non-significant (Wilcoxon test).

225 intensity remained very low and too close to the background signal to be properly quantified.
226 Therefore, the plasmid model was adjusted accordingly. We constructed PsfiA and PsfiA*
227 transcriptional fusions with *mcherry* as the reporter gene (to follow PsfiA activity in
228 microfermentor-biofilms by FACS). And as we were unable to visualize by CLSM *intl1*
229 expression in the biofilm of MGcherry F'/pintl1-*gfp+*, probably due to the low level of *intl1*
230 expression, even when the *intl1* gene is derepressed [22], we also added on the new plasmid,
231 the *intl1* gene under the control of its own promoter Pintl1, to subsequently estimate integron
232 integrase expression by RT-qPCR (see below). These plasmids were transformed in the strain
233 MG1656 F', leading respectively to strains MG F'/pPsfiA*cherry*-Pintl1*intl1* and MG
234 F'/pPsfiA**cherry*-Pintl1*intl1* (Table 1).

235 After one hour of AFR, 99 % of the bacteria of a 24h-old microfermentor-biofilm of the positive
236 control MG F'/pPsfiA**cherry*-Pintl1*intl1* were bright red fluorescent (Fig. 2b). For MG
237 F'/pPsfiA*cherry*-Pintl1*intl1*, FACS dot-plot analysis showed that, as observed with the
238 microfluidic chamber, only few bacteria expressed fluorescence in the biofilm. This approach
239 further showed that this minority of red bacteria (3.3 ± 1.8 %) is clearly divided into two
240 populations: one (2.3 ± 1.2 %) expressing red fluorescence at an intermediate level, the other
241 (1 ± 0.7 %) at a high level (Fig. 2c). The latter showed red fluorescence intensity equivalent to
242 that expressed from the constitutive promoter PsfiA*, indicating that in this population the SOS
243 response is strongly induced, leading to full activity of the PsfiA promoter. These two red
244 populations will be named hereafter “intermediate-” and “super-fluorescent-populations”
245 respectively.

246

247 **Differential Integron integrase expression within biofilm subpopulations**

248 As we have previously shown that basal-expression of the *intl1* and *sfiA* genes was higher in
249 biofilm than in planktonic culture without any exogenous stress [22], we hypothesized that the
250 expression of *intl1* and *sfiA* would happen within the same subpopulations in the biofilm. We
251 therefore sorted by FACS the three non-fluorescent, intermediate and super-fluorescent
252 subpopulations of the MG F'/pPsfiA*cherry*-Pintl1*intl1* biofilm, in order to quantify in each of

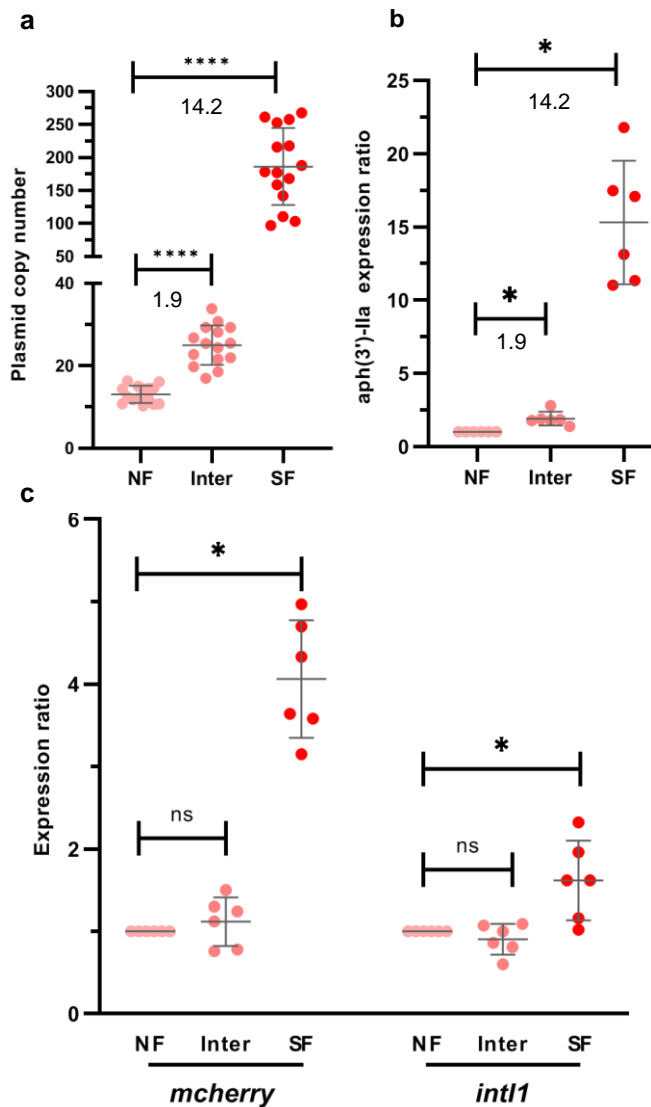


Fig. 4: Impact of the variation in plasmid copy number in the biofilm sub-populations on *mcherry* and *int1* expression level

a, The plasmid copy number was estimated by calculating the ratio of gene copies number of plasmidic *mcherry* over chromosomal *gyrB* for each sorted sub-populations from a 24h-old biofilm of MG F⁺/ pPsfACherry-Pint1*int1* strain grown in microfermentor. **b**, Expression ratio of *aph(3')-IIa* transcripts from sorted sub-populations NF, inter and super + (same biofilm as in a). Relative quantification of *aph(3')-IIa* (gene encoding kanamycin resistance carried on the same plasmid as *mcherry*) was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, with normalization to the endogenous *gyrB* gene and calibration to the non-fluorescent population. **c**, Expression ratio of *mcherry* and *int1* transcripts in sorted sub-populations, NF, inter and super +. Relative quantification of *mcherry* and *int1* was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, with normalization to the *aph(3')-IIa* gene and calibration to the non-fluorescent population. NF (non-fluorescent; light pink), inter (intermediate; medium pink) and SF (super-fluorescent; red) sub-populations. Data are the average of gene copies number or transcripts levels measured from 6 independent sorting experiments: Average and standard deviation are shown as black lines (a and c), errors bars indicate the SD (b). Asterisks indicate significant difference: * $p < 0.05$; **** $p < 0.0001$; ns: non-significant (Wilcoxon test).

253 them the transcript levels of *intl1* and *mcherry* genes (expressed from promoters *Pint11* and
254 *Psf1A* respectively) by RT-qPCR. First, we confirmed that no degradation of the bacterial RNA
255 or changes in the level of *mcherry* expression occurred in the initial culture (*i.e.* re-suspended
256 biofilm during the various steps of the experiment (AFR + sorting)) (Fig. S1).
257 Transcript levels were higher in the intermediate population (1.9- and 1.7-fold for *cherry* and
258 *intl1* respectively) and in the super-fluorescent population (64- and 22-fold for *cherry* and *intl1*
259 respectively) than in the non-fluorescent population (Fig. 3). As the *sfiA* gene is present in the
260 chromosome of our MG F'/pPsf1A*cherry*-*Pint11intl1* strain, we therefore quantified *sfiA*
261 transcripts to verify that its expression was also induced in the fluorescent populations of the
262 biofilm. Surprisingly, the chromosomal *sfiA* transcript level was significantly increased but only
263 in the super-fluorescent population and at a much lower level than that of the plasmid genes
264 *intl1* or *mcherry* (Fig. 3). Altogether, these results suggested that the strong increase in
265 *mcherry* and *intl1* transcripts may be influenced by variations in plasmid copy number in the
266 biofilm subpopulations, in addition to the induction of the SOS response.

267

268 **Influence of biofilm microniches on plasmid copy number**

269 To answer the above questioning, we quantified the plasmid copy number in the three
270 populations of the MG F'/pPsf1A*cherry*-*Pint11intl1* biofilm. As shown on Fig. 4a, the plasmid
271 copy number increased by 1.9- and 14.2-fold respectively in intermediate and super-
272 fluorescent populations compared to the non-fluorescent population. We thus also quantified
273 the transcript level of the kanamycin resistance gene, *aph(3')-IIa*, carried on the same plasmid
274 as the *mcherry* and *intl1* genes, and constitutively expressed. The *aph(3')-IIa* transcript level
275 should only reflect variations in the plasmid copy number. We observed that the *aph(3')-IIa*
276 expression level increased in both the intermediate- and super-fluorescent-populations, in
277 proportions similar to plasmid copy number (Fig. 4b). Therefore, from now on, we normalized
278 the transcript levels of *mcherry* and *intl1* genes by that of *aph(3')-IIa* to estimate the effect of
279 the SOS response induction on *Psf1A* and *Pint11* activity. As shown on Fig. 4c, the activation
280 of *Psf1A* and *Pint11* occurred only in the super-fluorescent population (by 4.1- and 1.6-fold factor

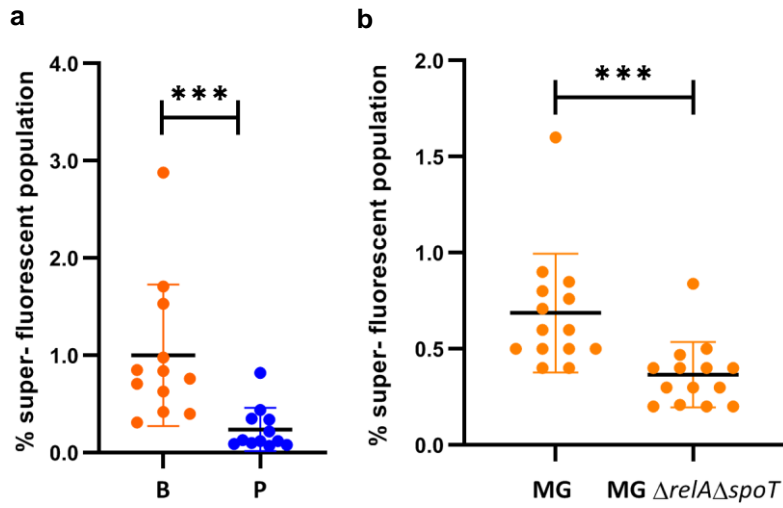


Fig. 5: Comparison of cherry expression level in biofilm and planktonic conditions, and effect of the stringent response on mcherry expression in biofilm

Proportion (%) of cherry-super-fluorescent populations in (a) biofilm (B, orange) and planktonic (P, blue) cultures of the MG F'/pPsfIAcherry-Pint1int1 strain; (b) in biofilm of MG F' and MG $\Delta relA \Delta spoT$ F' strains carrying plasmid pPsfIAcherry-Pint1int1. Data are the average of at least 12 independent cultures. Asterisks indicate significant difference between biofilm and planktonic conditions (a) or between MG and MG $\Delta relA \Delta spoT$ (b); *** $p < 0.001$ (Mann-Whitney U-test (a) or Wilcoxon test (b)). Average and standard deviation are shown as black lines.

281 respectively), in agreement with the above observations for chromosomal *sfiA* transcript levels
282 (Fig. 3). Overall, our results show that, in the biofilm, there are two bacterial populations that
283 express SOS-inducible genes at different levels: one expressing these genes at their low basal
284 non-induced level (non-fluorescent and intermediate- populations), and one at a high de-
285 repressed level (super-fluorescent population).

286

287 **Induction of SOS response in the super-fluorescent population is only partially** 288 **dependent on the stringent response**

289 We previously reported that the basal expression of *sfiA* was 2.2-fold higher in biofilm than in
290 planktonic culture and that this increase was dependent on the stringent response, which is
291 induced by the RelA and SpoT proteins [22]. To determine whether the super-fluorescent
292 population was specific of the biofilm and dependent on the stringent response, we analyzed
293 by FACS a 24h-old planktonic culture of MG F'/pPsf*iA*cherry-PintI1*intI1*, as well as a 24h-old
294 microfermentor-biofilm of a mutant unable to induce the stringent response, MG Δ relA Δ spoT
295 F'/pPsf*iA*cherry-PintI1*intI1* (Table 1). Both cultures contained a super-fluorescent population
296 but in significantly lower proportion than in the MG F'/pPsf*iA*cherry-PintI1*intI1* biofilm (Fig. 5a
297 and 5b). These results suggested that more bacteria activated the SOS-inducible promoters
298 PintI1 and Psf*iA* in the biofilm than in the planktonic culture, and that in the biofilm about half
299 of the super-fluorescent population could induce the SOS response independently of the
300 stringent response. The next question was are the expression levels of *intI1*, *mcherry* and *sfiA*
301 similar in all three super-fluorescent populations *i.e.* from planktonic and both biofilms (MG F'
302 and Δ relA Δ spoT mutant) cultures?

303

304 **Complexity of the regulation of *intI1* expression by the stringent response in biofilm**

305 The amount of super-fluorescent bacteria was too low in the planktonic culture to be sorted in
306 a timescale suitable with our experiment. However, we were able to sort non-fluorescent and
307 super-fluorescent populations from a 24h-old MG Δ relA Δ spoT F'/pPsf*iA*cherry-PintI1*intI1*

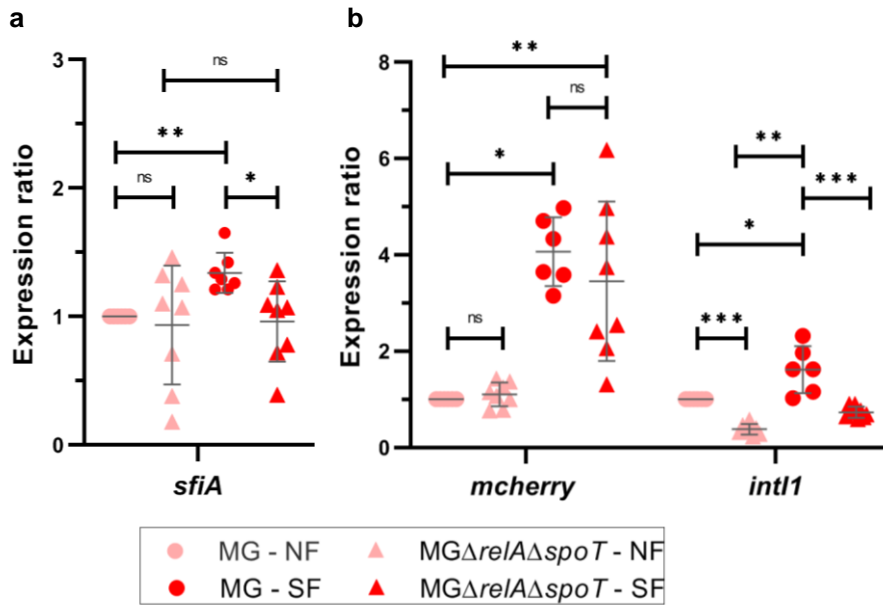


Fig. 6: The stringent response induces the expression of *sfia*, *mcherry* and *int11* in the biofilm super-fluorescent subpopulations.

Expression ratio of (a) *sfia*, (b) *mcherry* and *int11* transcripts number in non-fluorescent (NF; light pink) and super-fluorescent (SF; red) sorted sub-populations of 24-old biofilms of MG F' (circle) and MGΔ*relA*Δ*spoT* F' (triangle) strains carrying pPsf*IAcherry*-P*int11int11*. Relative quantification of *mcherry*, *int11* and *sfia* was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The number of *mcherry* and *int11* transcripts was normalized to that of *Kana* gene (constitutively expressed from the plasmid) to take in to account plasmid number variation; the transcripts number of chromosomal *sfia* gene was normalized to the endogenous *gyrB* gene. The calibrator was MG F' pPsf*IAcherry*-P*int11int11* non-fluorescent sub-population. Data are the average of transcripts levels measured from at least 6 independent sorting experiments. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; ns: non-significant; Mann-Whitney U-test (comparison of WT MG F' vs MGΔ*relA*Δ*spoT* F') or Wilcoxon test (comparison of NF and SF populations of the same biofilm). Average and standard deviation are shown as black lines.

308 biofilms by FACS in sufficient amounts to quantify *intl1*, *mcherry* and chromosomal *sfiA*
309 transcripts by RT-qPCR. Transcript levels from plasmidic *mcherry* and *intl1* genes were
310 normalized to *aph(3')-IIa*, the plasmid copy number being also higher in the super-fluorescent
311 MG Δ *relA* Δ *spoT* F'/pP*sfiA**mcherry*-P*intl1**intl1* population (Fig. S2).

312 In the Δ *relA* Δ *spoT* mutant background, the transcript level of chromosomal *sfiA* was not
313 significantly higher in the super-fluorescent population compared to the non-fluorescent
314 population, contrary to what was observed in the wild type (WT) MG F' background (Fig. 6a),
315 suggesting that the significant increase of *sfiA* expression in MG F'/pP*sfiA**mcherry*-P*intl1**intl1*
316 super-fluorescent population depended on the stringent response. However, the transcript
317 levels of the plasmid genes, *mcherry* and *intl1*, were significantly higher in the MG Δ *relA* Δ *spoT*
318 super-fluorescent population than in the non-fluorescent population (Fig. 6b). Nevertheless,
319 *intl1* expression ratio was still higher in the super-fluorescent population of the WT MG F'
320 background than in the mutant one (Fig. 6b). The trend was the same for the *mcherry* gene,
321 although the difference of expression between the WT and mutant background super-
322 fluorescent populations did not appear to be significant (Fig. 6b). Altogether these results
323 indicated that for the *mcherry* and *intl1* genes, the stringent response participates but is not
324 the only stress to be involved in the SOS response induction in the super-fluorescent
325 population of the biofilm.

326 Surprisingly, although the level of *mcherry* expression was the same in the non-fluorescent
327 WT and mutant populations, as observed for chromosomal *sfiA* expression (Fig. 6), *intl1*
328 expression was significantly lower in the non-fluorescent mutant population than in the WT
329 population (Fig. 6b). These results suggested that in the non-fluorescent population, the
330 stringent response activates *intl1* expression in a SOS-independent manner.

331

332 Discussion

333 Bacterial biofilms are highly heterogeneous environments where bacteria experience various
334 stress [2]. Working with the total biofilm population forces one to average and minimize the

335 observed effects, or even miss some of them, when they occur in a small number of bacteria,
336 as shown here. Indeed, we previously showed that the expression level of *intI1* and *sfiA* genes
337 in the absence of exogenous stress (basal expression) was higher, but not fully de-repressed,
338 in biofilm than in planktonic culture [22]. Here, analyzing the biofilm at the bacterial level, we
339 showed that actually only few bacteria (around 1%) located within the depth of the biofilm
340 activated the two promoters, *PintI1* and *PsfIA*, at a strong level. FACS analyzes were more
341 sensitive than CLSM identifying 3 populations with different level of fluorescence (non-,
342 intermediate- and super-fluorescent, representing in average respectively 97%, 2% and 1% of
343 the bacteria in the biofilm; Fig. 2). However, contrary to the super-fluorescent population, in
344 the intermediate population, the fluorescence did not correlate with increased *PsfIA* and *PintI1*
345 activities, it only reflected an increase in the copy number of the ColE1-type plasmid carrying
346 the *PsfIA-mcherry* transcriptional reporter and the integron integrase *PintI1-intI1* (Fig. 4). It has
347 been shown that starvation/limitation of specific amino acids (Thr, Arg and Leu among those
348 tested) led to a rise in the copy number of ColE1-type plasmids in both *relA+* and *relA-* *E. coli*
349 strains. This rise was even greater in the *relA-* strain than in the *relA+* strain (as observed in
350 this study, Fig. 4a and S2) for starvation of specific amino acids (Ile, Thr and His) [29]. These
351 observations therefore confirmed that in the biofilm, bacteria undergo amino acid limitations,
352 and further indicated that the stronger the limitation, the higher the plasmid copy number.
353 Indeed, the super-fluorescent population which has the highest plasmid copy number is the
354 one that undergoes a sufficiently strong amino acids limitation to induce the stringent response,
355 which in turn would activate the SOS response [22,30]. FACS and RT-qPCR analyses also
356 suggested the existence of other regulation pathways different from the stringent response,
357 that could induce the SOS response, activating both *PsfIA* and *PintI1* in the super-fluorescent
358 population of the *MGΔrelAΔspoT* mutant biofilm (Fig. 5 and 6b). Biofilms of *E. coli ΔrelAΔspoT*
359 mutants have been found to have reduced catalase activity (*i.e.* lower oxidative stress defense)
360 and elevated reactive oxygen species (ROS) OH• levels [31]. ROS are known to induce the
361 SOS response [32]. However the super-fluorescent bacteria are mainly located in the depth of

362 the biofilm (Fig. 1) where the oxygen concentration is commonly low [2]. Therefore, the
363 likelihood that oxidative stress *via* ROS production is one of the signals that induce the SOS
364 response in the super-fluorescent population of $\Delta relA\Delta spoT$ mutant biofilm does not seem
365 very likely, but would need to be investigated. Unfortunately, we could not verify this hypothesis
366 as we were not able to construct an MGcherry $\Delta relA\Delta spoT$ F' mutant strain to monitor and localize
367 the P_{psiA}-*gfp*⁺ expression in flow-cell, as we did with the WT strain (Fig. 1). Another stress
368 inducing the SOS response in the biofilm, could be phosphate starvation, which has also been
369 found to induce the LexA regulon [33].

370 We were surprised to find that the level of *intl1* expression in the non-fluorescent $\Delta relA\Delta spoT$
371 population was significantly lower than in the non-fluorescent WT MG F' population (Fig. 6b).
372 It indeed suggested that the basal activity of P_{intl1} is reduced in the non-fluorescent population
373 in the absence of (p)ppGpp (alarmones produced by RelA and SpoT upon nutrient starvation).
374 Since this effect was not observed for the P_{psiA} promoter, it appears to be specific to P_{intl1}
375 and independent of the SOS response. Interestingly, Strugeon *et al.* have shown that in biofilm,
376 the expression of P_{intl1}* (P_{intl1} promoter with a mutated LexA-binding-site) is regulated by
377 the Lon protease, which was not the case with WT P_{intl1} [22]. The Lon protease is known to
378 be activated by the polyphosphate (poly-P) that accumulates upon the stringent response
379 induction. In the model proposed by Strugeon *et al.*, the poly-P-Lon complex would control the
380 stability of an unidentified regulator of P_{intl1} (repressor) that would only act when the P_{intl1}
381 promoter is released from LexA. Thus, one could imagine that in the non-fluorescent population
382 of the $\Delta relA\Delta spoT$ mutant biofilm, the basal level of poly-P-Lon is no longer sufficient to ensure
383 the degradation of the inhibitor of the derepressed P_{intl1} promoter. In this case, the basal
384 activity of P_{intl1} would decrease due to the absence of (p)ppGpp and the lower level of poly-
385 P-Lon. Another hypothesis to explain this decrease in basal P_{intl1} activity in the $\Delta relA\Delta spoT$
386 non-fluorescent population would be a direct effect on the transcription. Indeed, (p)ppGpp
387 regulates positively or negatively transcription initiation from specific promoters by binding
388 directly to RNA polymerase (RNAP) at two sites [34,35]. In these (p)ppGpp regulated

389 promoters, a discriminator region (region between the conserved -10 promoter element and
390 the transcription start site (TSS)) with more A+T rich content was linked to activated promoters
391 [35,36]. *Pint11* shares some characteristics of (p)ppGpp activated promoters (conserved bases
392 in the -10 region, T and A bases in the discriminator region and TSS [35,37]). It is tempting to
393 assume that the *int11* promoter basal activity in the biofilm might be stimulated by (p)ppGpp,
394 but this will need to be confirmed.

395 Overall, our results showed that the regulation of integron integrase expression in biofilm is
396 complex. There are two main populations with different characteristics in the biofilm: the vast
397 majority of the bacteria expressing the SOS-regulon gene *sfiA* and *int11* at a basal level, which
398 for *int11* expression seems to depend on (p)ppGpp; and a minor population (1%), located in
399 the depth of the biofilm that faces amino acid limitations leading to the induction of the stringent
400 response, as well as other limitations (phosphate ?), all being endogenous stresses inducing
401 the activation of SOS-regulated promoters in this population (Fig. S3). As a result, this
402 population would be able to acquire antibiotic resistance genes *via* the expression of *Int11*.

403 Dorr *et al.* showed that the formation of *E. coli* persisters (subpopulation of bacteria (usually
404 less than 1%) surviving in presence of high bactericidal antibiotic pressure without an increase
405 in MIC [38,39]) was induced by the SOS response after fluoroquinolone treatment [40]. Bernier
406 *et al.* demonstrated that the tolerance of *E. coli* biofilm to ofloxacin depended on starvation and
407 SOS response [41]. Intriguingly, our super-fluorescent-biofilm population shares several
408 characteristics describing triggered persistence: i) it is induced upon amino acids limitation (via
409 the stringent response) and possibly other nutrients limitations, ii) it represents a minor
410 proportion (around 1%) of the biofilm and iii) both states (super-fluorescence/SOS induction
411 and persistence) are transient. Indeed, persistent bacteria, when treated with bactericidal
412 antibiotics, will regrow when diluted in an antibiotic-free media, their progeny being as sensitive
413 to drugs as the parental population. And, in our case, when grown again in microfermentor,
414 sorted super-fluorescent bacteria of the MG F'/Psf*iA*cherry-Pint11*int11* biofilm gave rise to a
415 new biofilm containing the same sub-populations as in the initial biofilm (Fig. S4). It is tempting

416 to infer that the super-fluorescent-biofilm population could be a persister population induced
417 by endogenous stresses of the biofilm. If so, it would mean that in the biofilm, the super-
418 fluorescent population, which expresses the SOS response at high level, would be both
419 tolerant to antibiotics and ready to express antibiotic resistance through gene cassettes
420 acquisition or shuffling via the integron integrase. Furthermore, the activation of the SOS
421 response in the super-fluorescent population could also induce error-prone DNA polymerases
422 leading to mutations involved in antibiotic resistance (Fig. S3). In the case of antibiotic
423 treatment, these features would allow resistant bacteria to be readily selected for. It was indeed
424 recently shown that persisters of *E. coli* after fluoroquinolone treatment displayed enhanced
425 resistance toward several antibiotics following recovery from treatment, and this was linked to
426 the SOS response and the error-prone polymerase V [42].

427 It has been long supposed in clinical practice, that the main characteristic hampering biofilm
428 treatment was their thick-layered structure, limiting the penetration of antibiotics, thus exposing
429 them to sub-MIC concentrations that would facilitate the selection of antimicrobial resistance.
430 Nowadays, it is clear that biofilm endurance is multifactorial [13,43]. It was shown in a *P.*
431 *aeruginosa* biofilm that some bacteria undergo endogenous oxidative stress leading to double-
432 strand DNA breaks. The mechanisms involved in repair of these DNA breaks, which were
433 SOS-response-independent, generated genetic variations within the population, conferring
434 various selective advantages, in particular mutations that increased the emergence of
435 antibiotic resistant bacteria that could be selected for when biofilms were exposed to antibiotic
436 treatment [44]. Here we demonstrate, that in addition to its structural advantage, the biofilm
437 lifestyle promotes levels of local endogenous stresses, even in the absence of antibiotic
438 pressure, that give rise to a small population of bacteria expressing at high-level, genes
439 regulated by the SOS response. This population which shows most of the characteristics
440 required for tolerance to antibiotics and for antibiotic resistance acquisition, could constitute a
441 reservoir of bacteria fully ready to rapidly resist antibiotic treatment, being the cause of

442 recurrent infections and impacting the management of nosocomial infections and antibiotic
443 treatments.

444

445 **Acknowledgements**

446 We thank the engineers of the technology facility BISCEm Inserm US042, CNRS UMS 2015,
447 Claire Carrion and Catherine Ouk for their precious help with the confocal microscopy and flow
448 cytometry experiments respectively. We are grateful to Yohann Lacotte and Cécile Pasternak
449 for helpful discussions and critical reading of the manuscript, and to Ana Catalina Hernandez
450 for her fruitful help and discussions for the cytometry experiments and analyses, and critical
451 reading of the manuscript. This work was supported by grants from Ministère de
452 l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Institut National de la Santé et de la Recherche
453 Médicale (Inserm) and Fondation pour la Recherche Médicale (FRM DEQ20150331742 to MC
454 Ploy). The funders had no role in study design, data collection and analysis, and the decision
455 to submit this work for publication.

456

457 **Conflict of interest**

458 The authors declare no conflict of interest.

459 **References**

- 460 [1] Monds RD, O'Toole GA. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a
461 paradigm up for review. *Trends in Microbiology* 2009;17:73–87.
462 <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.001>.
- 463 [2] Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews*
464 *Microbiology* 2008;6:199–210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>.
- 465 [3] An D, Parsek MR. The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities.
466 *Current Opinion in Microbiology* 2007;10:292–6. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.05.011>.
- 467 [4] Bagge N, Hentzer M, Andersen JB, Ciofu O, Givskov M, Høiby N. Dynamics and spatial
468 distribution of beta-lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob*
469 *Agents Chemother* 2004;48:1168–74. <https://doi.org/10.1128/aac.48.4.1168-1174.2004>.
- 470 [5] Ito A, May T, Taniuchi A, Kawata K, Okabe S. Localized expression profiles of *rpoS* in
471 *Escherichia coli* biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* 2009;103:975–83.
472 <https://doi.org/10.1002/bit.22305>.
- 473 [6] Moormeier DE, Endres JL, Mann EE, Sadykov MR, Horswill AR, Rice KC, et al. Use of
474 Microfluidic Technology To Analyze Gene Expression during *Staphylococcus aureus* Biofilm
475 Formation Reveals Distinct Physiological Niches. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:3413–24.
476 <https://doi.org/10.1128/AEM.00395-13>.
- 477 [7] Pabst B, Pitts B, Lauchnor E, Stewart PS. Gel-Entrapped *Staphylococcus aureus* Bacteria
478 as Models of Biofilm Infection Exhibit Growth in Dense Aggregates, Oxygen Limitation,
479 Antibiotic Tolerance, and Heterogeneous Gene Expression. *Antimicrob Agents Chemother*
480 2016;60:6294–301. <https://doi.org/10.1128/AAC.01336-16>.
- 481 [8] Zaborskyte G, Andersen JB, Kragh KN, Ciofu O. Real-Time Monitoring of *nfxB* Mutant
482 Occurrence and Dynamics in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Exposed to Subinhibitory
483 Concentrations of Ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61.
484 <https://doi.org/10.1128/AAC.02292-16>.
- 485 [9] Ambriz-Aviña V, Contreras-Garduño JA, Pedraza-Reyes M. Applications of Flow
486 Cytometry to Characterize Bacterial Physiological Responses. *Biomed Res Int* 2014;2014.

487 <https://doi.org/10.1155/2014/461941>.

488 [10] Garcia-Betancur JC, Yepes A, Schneider J, Lopez D. Single-cell Analysis of *Bacillus*
489 *subtilis* Biofilms Using Fluorescence Microscopy and Flow Cytometry. *J Vis Exp* 2012.
490 <https://doi.org/10.3791/3796>.

491 [11] Marlow VL, Cianfanelli FR, Porter M, Cairns LS, Dale JK, Stanley-Wall NR. The
492 prevalence and origin of exoprotease-producing cells in the *Bacillus subtilis* biofilm.
493 *Microbiology* 2014;160:56–66. <https://doi.org/10.1099/mic.0.072389-0>.

494 [12] Madsen JS, Burmølle M, Hansen LH, Sørensen SJ. The interconnection between biofilm
495 formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*
496 2012;65:183–95. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x>.

497 [13] Lebeaux D, Ghigo J-M, Beloin C. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between
498 Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics.
499 *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2014;78:510–43.
500 <https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-14>.

501 [14] Gillings MR. Integrons: past, present, and future. *Microbiol Mol Biol Rev* 2014;78:257–77.
502 <https://doi.org/10.1128/MMBR.00056-13>.

503 [15] Lacotte Y, Ploy M-C, Raheison S. Class 1 integrons are low-cost structures in *Escherichia*
504 *coli*. *ISME J* 2017;11:1535–44. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.38>.

505 [16] Stokes HW, Hall RM. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-
506 specific gene-integration functions: integrons. *Molecular Microbiology* 1989;3:1669–83.
507 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00153.x>.

508 [17] Collis CM, Hall RM. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes
509 catalyzed by the integron DNA integrase. *J Bacteriol* 1992;174:1574–85.

510 [18] Escudero* JA, Loot* C, Nivina A, Mazel D. The Integron: Adaptation On Demand.
511 *Microbiology Spectrum* 2015;3. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0019-2014>.

512 [19] Labbate M, Case RJ, Stokes HW. The Integron/Gene Cassette System: An Active Player
513 in Bacterial Adaptation. In: Gogarten MB, Gogarten JP, Olendzenski LC, editors. *Horizontal*
514 *Gene Transfer: Genomes in Flux*, Totowa, NJ: Humana Press; 2009, p. 103–25.

515 https://doi.org/10.1007/978-1-60327-853-9_6.

516 [20] Guerin É, Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Erill I, Re SD, et al. The SOS
517 Response Controls Integron Recombination. *Science* 2009;324:1034–1034.
518 <https://doi.org/10.1126/science.1172914>.

519 [21] Baharoglu Z, Mazel D. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions.
520 *FEMS Microbiology Reviews* 2014;38:1126. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12077>.

521 [22] Strugeon E, Tilloy V, Ploy M-C, Re SD. The Stringent Response Promotes Antibiotic
522 Resistance Dissemination by Regulating Integron Integrase Expression in Biofilms. *MBio*
523 2016;7:e00868-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00868-16>.

524 [23] Cashel M, Gentry DR, Hernandez VH, Vinella D. The stringent response. In: Neidhardt F.
525 C, Curtis III R, Ingraham J. L, Lin E. C.C, Low KB, Magasanik B, et al., editors. *Escherichia*
526 *coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. 2nd ed., ASM press; 1996.

527 [24] Huang C-T, Xu KD, McFeters GA, Stewart PS. Spatial Patterns of Alkaline Phosphatase
528 Expression within Bacterial Colonies and Biofilms in Response to Phosphate Starvation. *Appl*
529 *Environ Microbiol* 1998;64:1526–31.

530 [25] Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia*
531 *coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:6640–5.
532 <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>.

533 [26] Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob*
534 *Chemother* 2001;48:5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5.

535 [27] Pinilla-Redondo R, Riber L, Sørensen SJ. Fluorescence Recovery Allows the
536 Implementation of a Fluorescence Reporter Gene Platform Applicable for the Detection and
537 Quantification of Horizontal Gene Transfer in Anoxic Environments. *Appl Environ Microbiol*
538 2018;84. <https://doi.org/10.1128/AEM.02507-17>.

539 [28] Ghigo J-M. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*
540 2001;412:442–5. <https://doi.org/10.1038/35086581>.

541 [29] Wrobel B, Wegrzyn G. Differential amplification efficiency of pMB1 and p15A (ColE1-type)
542 replicons in *Escherichia coli* stringent and relaxed strains starved for particular amino acids.

543 Microbiological Research 1997;152:251–5. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(97\)80036-5](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(97)80036-5).

544 [30] Durfee T, Hansen AM, Zhi H, Blattner FR, Jin DJ. Transcription profiling of the stringent
545 response in *Escherichia coli*. J Bacteriol 2008;190:1084–96. [https://doi.org/10.1128/JB.01092-](https://doi.org/10.1128/JB.01092-07)
546 07.

547 [31] Nguyen D, Joshi-Datar A, Lepine F, Bauerle E, Olakanmi O, Beer K, et al. Active starvation
548 responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. Science
549 2011;334:982–6. <https://doi.org/10.1126/science.1211037>.

550 [32] Imlay JA, Linn S. Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by
551 hydrogen peroxide. J Bacteriol 1987;169:2967–76. [https://doi.org/10.1128/jb.169.7.2967-](https://doi.org/10.1128/jb.169.7.2967-2976.1987)
552 2976.1987.

553 [33] Dri AM, Moreau PL. Phosphate starvation and low temperature as well as ultraviolet
554 irradiation transcriptionally induce the *Escherichia coli* LexA-controlled gene *sfiA*. Mol Microbiol
555 1993;8:697–706. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01613.x>.

556 [34] Gourse RL, Chen AY, Gopalkrishnan S, Sanchez-Vazquez P, Myers A, Ross W.
557 Transcriptional Responses to ppGpp and DksA. Annu Rev Microbiol 2018;72:163–84.
558 <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062444>.

559 [35] Sanchez-Vazquez P, Dewey CN, Kitten N, Ross W, Gourse RL. Genome-wide effects on
560 *Escherichia coli* transcription from ppGpp binding to its two sites on RNA polymerase. Proc
561 Natl Acad Sci U S A 2019;116:8310–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819682116>.

562 [36] Cabrer-Panes JD, Fernández-Coll L, Fernández-Vázquez J, Gaviria-Cantín TC, Mouali
563 YE, Åberg A, et al. ppGpp mediates the growth phase-dependent regulation of *agn43*, a phase
564 variable gene, by stimulating its promoter activity. Environmental Microbiology Reports
565 2020;12:444–53. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12860>.

566 [37] Guerin E, Jove T, Tabesse A, Mazel D, Ploy MC. High-level gene cassette transcription
567 prevents integrase expression in class 1 integrons. Journal of Bacteriology 2011;193:5675–
568 82. <https://doi.org/10.1128/JB.05246-11>.

569 [38] Balaban NQ, Helaine S, Lewis K, Ackermann M, Aldridge B, Andersson DI, et al.
570 Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. Nat Rev Microbiol

571 2019;17:441–8. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3>.

572 [39] Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ. Distinguishing between resistance,
573 tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol* 2016;14:320–30.
574 <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.34>.

575 [40] Dörr T, Lewis K, Vulić M. SOS Response Induces Persistence to Fluoroquinolones in
576 *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 2009;5:e1000760.
577 <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000760>.

578 [41] Bernier SP, Lebeaux D, DeFrancesco AS, Valomon A, Soubigou G, Coppée J-Y, et al.
579 Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the
580 fluoroquinolone ofloxacin. *PLoS Genet* 2013;9:e1003144.
581 <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003144>.

582 [42] Barrett TC, Mok WWK, Murawski AM, Brynildsen MP. Enhanced antibiotic resistance
583 development from fluoroquinolone persists after a single exposure to antibiotic. *Nat Commun*
584 2019;10:1177. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09058-4>.

585 [43] Hall CW, Mah T-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and
586 tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 2017;41:276–301.
587 <https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>.

588 [44] Boles BR, Singh PK. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in
589 biofilm communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2008;105:12503–8.
590 <https://doi.org/10.1073/pnas.0801499105>.

591 [45] Espéli O, Moulin L, Bocard F. Transcription attenuation associated with bacterial
592 repetitive extragenic BIME elements. *J Mol Biol* 2001;314:375–86.
593 <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5150>.

594 [46] Beloin C, Valle J, Latour-Lambert P, Faure P, Kzreminski M, Balestrino D, et al. Global
595 impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Molecular*
596 *Microbiology* 2004;51:659–74. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03865.x>.

597 [47] Chaverocche MK, Ghigo JM, d'Enfert C. A rapid method for efficient gene replacement in
598 the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Nucleic Acids Res* 2000;28:E97.

599 <https://doi.org/10.1093/nar/28.22.e97>.

600 [48] Cherepanov P, Wackernagel W. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR
601 cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant.
602 *Gene* 1995;158:9–14. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00193-A](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00193-A).

603 [49] Jové T, Da Re S, Denis F, Mazel D, Ploy M-C. Inverse Correlation between Promoter
604 Strength and Excision Activity in Class 1 Integrons. *PLoS Genet* 2010;6.
605 <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000793>.

606 [50] Cisz M, Lee P-C, Rietsch A. ExoS Controls the Cell Contact-Mediated Switch to Effector
607 Secretion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 2008;190:2726–38.
608 <https://doi.org/10.1128/JB.01553-07>.

609

610 **Figure legends**

611 **Fig. 1: *sfiA* expression is heterogeneous and localized within the biofilm.**

612 **a, b, c**, CLSM images and section of the XZ planes of respectively MG*cherry* F'/pSUDtot,
613 MG*cherry* F'/pPsfIA*-*gfp*+ and MG*cherry* F'/pPsfIA-*gfp*+ biofilms grown for 24h at 37°C in
614 microfluidic flow-cell chamber. **d**, XY plan section of the MG*cherry* F'/pPsfIA-*gfp*+ biofilm image
615 (c) at 5 µm depth. z-stacks were generated using a Zeiss LSM 880 microscope and processed
616 with Imaris 9.6 software (Bitplane). Scale bar represents 30 µm. **e, f, g**, 1D plot representing
617 the total number of green and red fluorescent bacteria in the biofilm as a function of their X-
618 position, Y-position and Z-position respectively. Boxplots are designed as median, the lower
619 quartile (Q1) and the upper quartile (Q3). Whiskers are extended to the extreme data points.
620 All images are representative of one position among 10 taken for each condition. Experiments
621 were done in triplicate.

622

623 **Fig.2: Quantification of cells expressing *sfiA* in biofilm.**

624 Flow cytometry dot-plot analyses of a 24h-old biofilm of strain **(a)** MG F'/pSUΔtot, **(b)** MG
625 F'/pPsfIA**cherry*-PintI1*intI1* and **(c)** MG F'/pPsfIA*cherry*-PintI1*intI1* grown in continuous culture
626 in microfermentor. Counting was performed after one hour of aerobic fluorescence recovery at
627 room temperature. The black square delimits the cherry-positive population (cherry +) based
628 on the non -fluorescent strain MG F'/pSUΔtot (panel a), and the red rectangle defines the
629 cherry-super-fluorescent population (super Fluo) based on derepressed cherry expression in
630 strain MG F'/ pPsfIA**cherry*-PintI1*intI1* (panel b). The data represent one representative
631 experimental replicate.

632

633 **Fig. 3: Differential expression of *mcherry*, *intI1* and *sfiA* in biofilm subpopulations.**

634 Expression ratio of *mcherry*, *intI1* and *sfiA* transcripts from initial culture (dark pink) and sorted
635 sub-populations (non-fluorescent (light pink), intermediate (medium pink) and super-
636 fluorescent (red)) of a 24-old biofilm of MG F'/ pPsfIA*cherry*-PintI1*intI1* grown in
637 microfermentor. Relative quantification of *mcherry*, *intI1* and *sfiA* was performed using the 2⁻

638 $\Delta\Delta C_t$ method, the transcript number of each gene was normalized to the endogenous *gyrB* gene
639 and calibrated to the non-fluorescent population. Data are the average of transcripts levels
640 measured from 6 independent sorting experiments. Errors bars indicate the SD. Asterisks
641 indicate significant difference: ** $p < 0.01$; ns: non-significant (Wilcoxon test)

642

643 **Fig. 4: Impact of the variation in plasmid copy number in the biofilm sub-populations**
644 **on *mcherry* and *int11* expression level**

645 **a**, The plasmid copy number was estimated by calculating the ratio of gene copies number of
646 plasmidic *mcherry* over chromosomal *gyrB* for each sorted sub-populations from a 24h-old
647 biofilm of MG F' / pPsf1A*cherry*-Pint11*int11* strain grown in microfermentor. **b**, Expression ratio
648 of *aph(3')-IIa* transcripts from sorted sub-populations NF, inter and super + (same biofilm as in
649 a). Relative quantification of *aph(3')-II* (gene encoding kanamycin resistance carried on the
650 same plasmid as *mcherry*) was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, with normalization to the
651 endogenous *gyrB* gene and calibration to the non-fluorescent population. **c**, Expression ratio
652 of *mcherry* and *int11* transcripts in sorted sub-populations, NF, inter and super +. Relative
653 quantification of *mcherry* and *int11* was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, with normalization
654 to the *aph(3')-IIa* gene and calibration to the non-fluorescent population. NF (non-fluorescent;
655 light pink), inter (intermediate; medium pink) and SF (super-fluorescent; red) sub-populations.
656 Data are the average of gene copies number or transcripts levels measured from 6
657 independent sorting experiments: Average and standard deviation are shown as black lines (a
658 and c), errors bars indicate the SD (b). Asterisks indicate significant difference: * $p < 0.05$; ****
659 $p < 0.0001$; ns: non-significant (Wilcoxon test).

660

661 **Fig. 5: Comparison of *cherry* expression level in biofilm and planktonic conditions, and**
662 **effect of the stringent response on *mcherry* expression in biofilm**

663 Proportion (%) of cherry-super-fluorescent populations in **(a)** biofilm (B, orange) and planktonic
664 (P, blue) cultures of the MG F'/pPsf1A*cherry*-Pint11*int11* strain; **(b)** in biofilm of MG F' and

665 MG Δ relA Δ spoT F' strains carrying plasmid pPsf*Acherry*-Pint1*int1*. Data are the average of at
666 least 12 independent cultures. Asterisks indicate significant difference between biofilm and
667 planktonic conditions (a) or between MG and MG Δ relA Δ spoT (b); *** p<0.001 (Mann-Whitney
668 U-test (a) or Wilcoxon test (b)). Average and standard deviation are shown as black lines.

669

670 **Fig. 6: The stringent response induces the expression of *sfiA*, *mcherry* and *int1* in the**
671 **biofilm super-fluorescent subpopulations.**

672 Expression ratio of (a) *sfiA*, (b) *mcherry* and *int1* transcripts number in non-fluorescent (NF;
673 light pink) and super-fluorescent (SF; red) sorted sub-populations of 24-old biofilms of MG F'
674 (circle) and MG Δ relA Δ spoT F' (triangle) strains carrying pPsf*Acherry*-Pint1*int1*. Relative
675 quantification of *mcherry*, *int1* and *sfiA* was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The number of
676 *mcherry* and *int1* transcripts was normalized to that of *Kana* gene (constitutively expressed
677 from the plasmid) to take in to account plasmid number variation; the transcripts number of
678 chromosomal *sfiA* gene was normalized to the endogenous *gyrB* gene. The calibrator was MG
679 F' pPsf*Acherry*-Pint1*int1* non-fluorescent sub-population. Data are the average of transcripts
680 levels measured from at least 6 independent sorting experiments. *** p<0.001; ** p<0.01; ns:
681 non-significant; Mann-Whitney U-test (comparison of WT MG F' vs MG Δ relA Δ spoT F') or
682 Wilcoxon test (comparison of NF and SF populations of the same biofilm). Average and
683 standard deviation are shown as black lines.

684

685 **Table 1: Strains and plasmids used in this study**

Strains and plasmids	Genotype or description	Reference or use
<i>E. coli</i> Strains		
MG1656 F'	<i>lacZ</i> null derivative of <i>E. coli</i> MG1655 carrying the F' plasmid	[45]
NEB 5-alpha F= Iq	F= <i>proA_B_lacIq_(lacZ)M15 zzz::Tn10 (Tetr)/fhuA2_(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 _80_(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	New England Biolabs, Evry, France
MG1656Δ <i>cpxI</i> ::km-frt	<i>cpxI</i> gene replaced by the km-frt cassette in strain MG1655	[46]
MG1656λatt::mcherry F'	Insertion, at the λatt site, of the <i>mcherry</i> gene under the control of the constitutive λpR promoter	This study
MG1656□ <i>relA</i> □ <i>spoT</i> F'	Deletion of <i>relA</i> and <i>spoT</i> in MG1656	[22]
Plasmid		
s		
pKOBEGA	λ-red recombination system expression plasmid	[47]
pCP20	Vector carrying the <i>flp</i> gene encoding the FLP recombinase specific to FRT sites, thermosensitive; Amp ^r Cm ^r	[48]
pZE1- <i>intI1</i>	<i>intI1</i> gene under the control of its own promoter; Amp ^r	This study
pSU38Δ <i>tot/lacZ</i>	Vector carrying the <i>lacZ</i> coding sequence with no translation initiation region nor promoter; Km ^r	[49]

pSU38PsfIA/lacZ	<i>sfiA</i> promoter cloned into pSU38 Δ tot/lacZ; <i>lacZ</i> under the control of P <i>sfiA</i> ; Km ^r	[22]
pSU38PsfIA*/lacZ	<i>sfiA</i> promoter cloned into pSU38 Δ tot/lacZ; <i>lacZ</i> under the control of P <i>sfiA</i> *, P <i>sfiA</i> carrying the mutation LexA _{mut2} in the LexA box, inhibiting LexA binding and leading to constitutive expression [20]; Km ^r	Laboratory collection
F'	F' conjugative plasmid allowing enhanced biofilm formation; Tet ^R	[28]
pP <i>sfiA</i> - <i>gfp</i> +	<i>gfp</i> + under the control of the promoter of the <i>sfiA</i> gene, P <i>sfiA</i> ; Km ^r	This study
pP <i>sfiA</i> *- <i>gfp</i> +	<i>gfp</i> + under the control of P <i>sfiA</i> *; Km ^r	This study
pCTX2- <i>groE</i> -mCherry	p _{<i>groE</i>} controlling mCherry expression	[50]
pP <i>sfiA</i> cherry-Pint1 <i>int1</i>	<i>mcherry</i> under the control of P <i>sfiA</i> , and <i>int1</i> from In40 class I integron under the control of its own promoter Pint1; Km ^r	This study
pP <i>sfiA</i> *cherry-Pint1 <i>int1</i>	pP <i>sfiA</i> cherry-Pint1 <i>int1</i> carrying the mutation LexA _{mut2} in the LexA box of P <i>sfiA</i> ; Km ^r	This study
pGZA1	pUC18-mini Tn7T-Gm-P _{CD} - <i>gfp</i> +; Gen ^r , amplification matrix for the <i>gfp</i> + gene	[8]

Extended data:

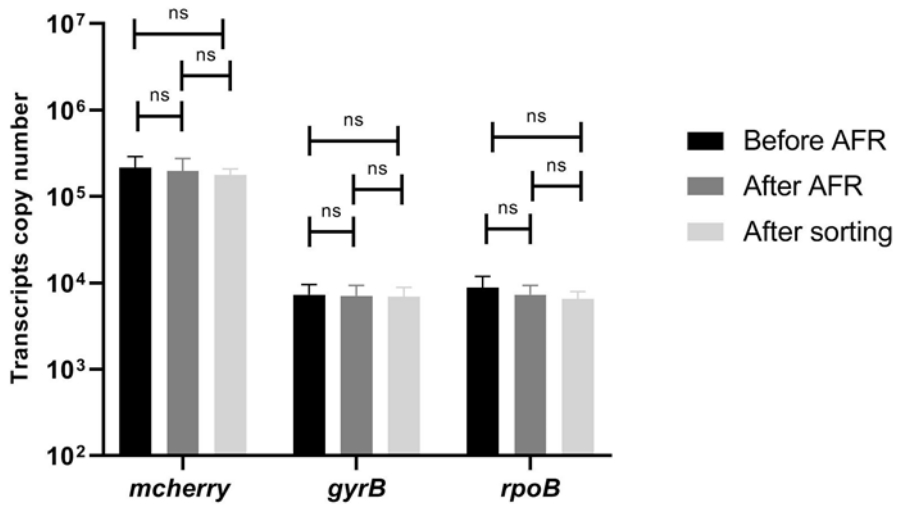


Fig. S1: Stability of RNA

Transcript numbers of *mcherry*, *gyrB* and *rpoB* genes were quantified by RT-qPCR in the initial population (re-suspended 24h biofilm) of MG F⁺/ pPsf*iAcherry-Pint1int1* strain grown in microfermentor, before AFR (black), after AFR (dark grey) and after sorting (light grey). Data are the average of transcripts levels measured from 6 independent sorting experiments. Errors bars indicate the SD. ns: non-significant (Wilcoxon test). AFR: aerobic fluorescence recovery.



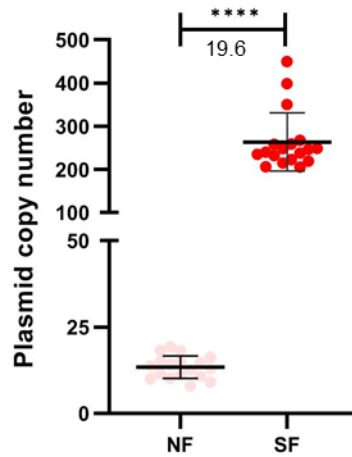


Fig. S2: Plasmid copy number in mutant *MGΔrelAΔspoT*

The plasmid copy number was estimated by calculating the ratio of gene copies number of plasmidic *mcherry* over chromosomal *gyrB* for each sorted sub-populations from a 24h-old biofilm of *MGΔrelAΔspoTF'/ pPsfIAcherry-Pint1int1* strain grown in microfermentor.

NF (non fluorescent; light pink), and SF (super-fluorescent; red) sub-populations. Data are the average of 6 independent sorting experiments. Asterisks indicate significant difference: **** $p < 0.0001$ (Wilcoxon test). Average and standard deviation are shown as black lines.

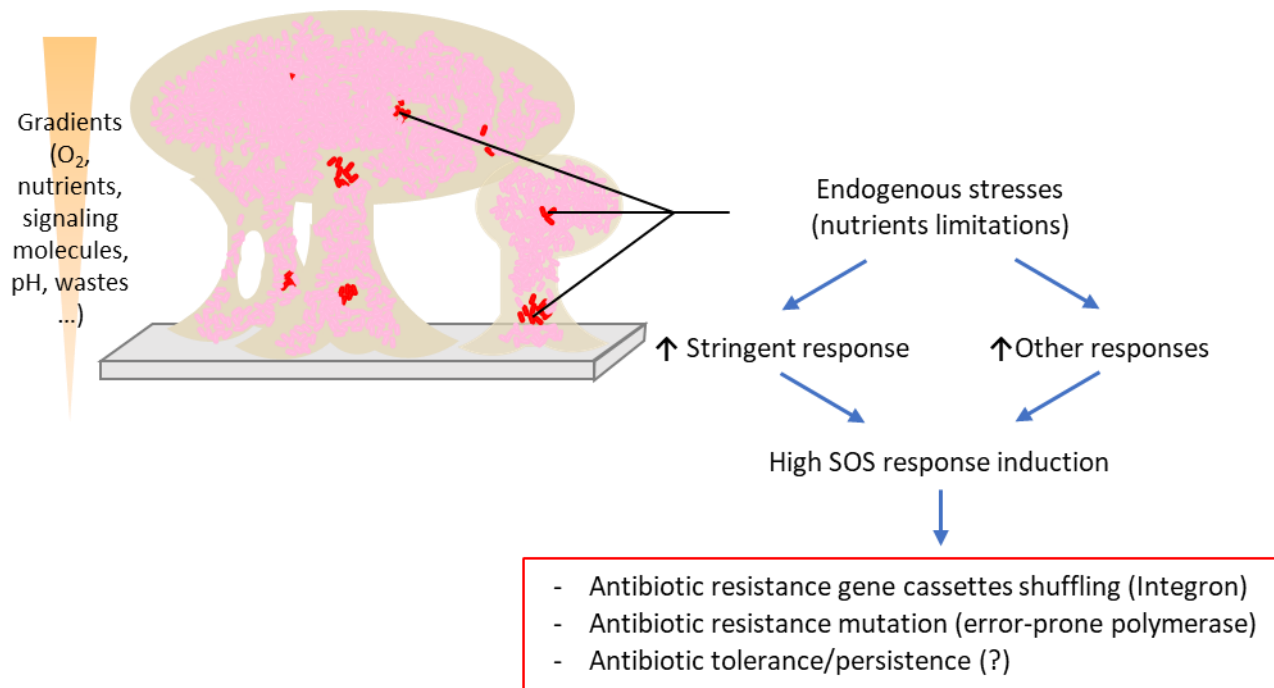


Fig. S3: Heterogeneous expression of *sfjA* and *int11* in the biofilm

In the biofilm, the vast majority of bacteria (non-fluorescent and intermediate populations, 99% of the bacteria, pink bacteria) express the *sfjA* and *int11* genes at a low basal level. Only few bacteria in the biofilm (super-fluorescent population, 1%, red bacteria) experience a level of endogenous stress (various nutrients limitations) high enough to induce the SOS response in a stringent response-dependent and stringent response-independent manner. This induction thus allows for high-level expression of genes regulated by the SOS response, leading to various outcomes favoring the acquisition/expression of antibiotic resistance, such as the acquisition/shuffling of resistance gene cassettes via the integron integrase, antibiotic resistance mutation via the error-prone polymerases, and potentially also antibiotic tolerance/persistence.

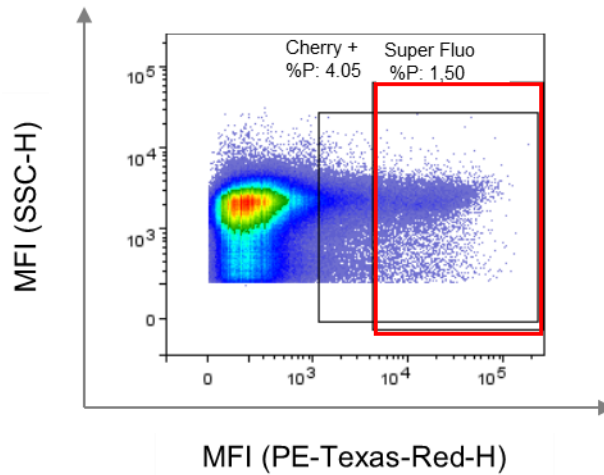


Fig. S4: Quantification of cells expressing *sfiA* in biofilm grown from the sorted super-fluorescent population

Sorted super-fluorescent population of strain MG F'/pPsf*IAcherry-Pint1int1* was used to grow a biofilm in continuous culture in microfermentor for 24h at 37°C. The biofilm was analyzed by flow cytometry. Counting was performed after one hour of aerobic fluorescence recovery at room temperature. The dot-plot analysis is shown. The black square delimits the cherry-positive population (cherry +) based on the non-fluorescent strain MG F'/pSU Δ tot and the red rectangle defines the *mcherry*-super-fluorescent population (super Fluo) based on derepressed *mcherry* expression in strain MG F'/ pPsf*IAcherry-Pint1int1*. The data represent one representative experimental replicate.

Extended data Table 1: Primers and Probes used in this study

Construction	Primer name	Primer sequence	Reference
MG1656λatt::cherry			
	λ att.A1.500-5	CGATGGCGATAATATTTTCACC	1
	λ att.B1.500-3	CCCTGATACTCACCAGGCATC	1
	λ att.A2.Amp-xfp-3	GCGTTTTTTTATTGGTGAGAATTACTAACTTGA GCGAAACG	1
	λ att.B2.Amp-xfp-5	TGAGTAGGACAAATCCGCCGCTAAAAAAGCAG GCTTCAACG	1
	λ ATT-ext5	GGCGATAAATTGCCGCATCG	laboratory collection
	λ ATT-ext3	TGCCACCATCAAGGGAAAGCCC	laboratory collection
	Kmfrt-XhoI-5	AGCCTCGAGATGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTT C	1
	Kmfrt-SacI-3	CAGGAGCTCCTCATATGAATATCCTCCTTA	1
pSU38Psfia$gfp+$ and pSU38Psfia*$gfp+$			
	Psfia- $gfp(+)$ INF-5	CAGGGGCTGGATTGATTATGGATCCCAAAGGA GAAGAACTTTTC	This study
	Psfia- $gfp(+)$ INF-3	GCAAAAGCACCCGCCGACAAGCTTTTATTTGT AGAGCTCATCCATGC	This study
pSU38Psfia$cherry$ and pSU38Psfia*$cherry$			
	hindIII-mcherry	GATAAGCTTGTCGACTTACTTGT	This study
	bamHI-mcherry2	CATGGATCCCAAGGGCGAGGAGGATAA	This study
pSU38Psfia$cherry-pintl1w$ and pSU38Psfia*$cherry-pintl1w$			
	ter-intI-fwd-2	GAGCTCGTAAACTTGTACCTCGAGGTCGACG G	This study
	intI-pSU-rev	GGGTGTCAGTGAAGTACGCCTAGGTCTAGGGC GGC	This study
	ter-intI-rev-3	CAAGTTTACGAGCTCGCTTGGAC	This study
	ter-ter-fwd-2	GTAAACTTGGTCTGACGCTCAGTGGAACG	This study
	ter-ter-rev-2	GTCAGACCAAGTTTACGAGCTCG	This study
	pSU-ter-fwd-2	CCTGCCACATGAAGCGTCTGACGCTCAGTGGA ACG	This study
Sequencing			
	Int1 fwd	CGAACGCAGCGGTGGTAA	This study

pZA for	GTCTTTCGACTGAGCCTTTC	laboratory collection
MRV-D2	TGCTGACGCACCGGTG	laboratory collection
pSU38-verif-sq	GCCCACCCCTGTCCCTC	laboratory collection
qRT-PCR		
intl1-LC1	GCCTTGATGTTACCCGAGAG	2
intl1-LC5	GATCGGTCGAATGCCTGT	2
sfiA-L1	TTACAGCAACTCGGTCAGCA	laboratory collection
sfiA-R1	CAGTGTGGCAAGGGGAGA	laboratory collection
rpoB-R1	GTTTGGTACGCGCAGAGAAG	This study
rpoB-L2	CCGGTATCGTTTACATTGGTG	This study
cherry-L2	GTGACCGTGACCCAGGACT	This study
cherry-R1	TGGTCTTCTTCTGCATTACGG	This study
gyrB-L3	GCTGCTGTTGACCTTCTTCTA	This study
gyrB-R3	TGTTCCCTGCTTGCCCTTCT	This study
kana R1	GTAGCCGGATCAAGCGTATG	This study
kana L1	GAAGGGACTGGCTGCTATTG	This study
sfiA-probe	[6FAM] CTGGGCTACCCTTAACGAAAGTAATG CAGA [TAM]	laboratory collection
rpoB-probe	[6FAM] CTGGTTGGTAAGGTAACGCCGAAAGG T [TAM]	laboratory collection
intl1-probe	[6FAM] ATTCCTGGCCGTGGTCTGGGTTT [BHQ1]	2
gyrB-probe	[6FAM] TCGTCAGATGCCGAAATCGTTGA [BHQ1]	This study
cherry-probe	[Cy5] CAGGACGGCGAGTTCATCTACAAGGT [BHQ2]	This study
kana-probe	[6FAM] TCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGC [BHQ1]	This study

1. Lacotte, Y., Ploy, M.-C. & Raheison, S. Class 1 integrons are low-cost structures in *Escherichia coli*. *ISME J.* 11, 1535–1544 (2017).
2. Barraud, O., Baclet, M. C., Denis, F. & Ploy, M. C. Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1642–1645 (2010).

**Axe 2 : Rôle des protéines CRP et IHF
dans la régulation de l'expression de
l'intégrase *intl1* en biofilm**

Une doctorante au laboratoire, Emilie Strugeon, s'est intéressée à la régulation de l'expression de l'intégrase de classe 1, *intl1*, en biofilm, mode de vie privilégié des bactéries dans les écosystèmes naturels. Son étude a montré qu'en biofilm le niveau basal d'expression de *intl1* (niveau d'expression en absence de stress exogène) est augmenté de plus de deux fois par rapport à une culture planctonique (Strugeon et al., 2016). Afin d'identifier ce qui induisait cette augmentation, elle a évalué le rôle de différents régulateurs globaux dans la régulation de l'expression de *intl1* en biofilm : RpoS (réponse générale au stress), CpxR (réponse au stress d'enveloppe), LuxS (quorum sensing), RelA/SpoT (réponse stringente) et Lon (dégradation des protéines). Pour cela des mutants de délétion des différents gènes mentionnés ont été créés et le niveau d'expression de la β -galactosidase de fusions transcriptionnelles entre la région promotrice de *intl1* et le gène rapporteur *lacZ* a été mesuré chez ces mutants. Il a ainsi été démontré que la régulation de l'expression basale de *intl1* en biofilm faisait intervenir les régulateurs RelA/ SpoT et la protéase Lon (Strugeon et al., 2016). Le modèle de régulation proposé par les auteurs est décrit dans le chapitre I, (Figure 10). Brièvement, lors de carences nutritives la réponse stringente est induite en biofilm et augmente le niveau d'expression de l'intégrase *intl1* en agissant à deux niveaux : d'une part en induisant la réponse SOS et d'autre part *via* un mécanisme indépendant de la réponse SOS qui met en jeu la protéase Lon et un autre régulateur encore non identifié (Strugeon et al., 2016).

Dans cette partie de mon travail de thèse, j'ai continué la caractérisation de la régulation de l'expression de *intl1* en biofilm en explorant le rôle de deux autres régulateurs globaux : CRP (cAMP Receptor Protein impliqué dans la régulation de la répression catabolique) et IHF (Integration Host Factor, impliqué dans le maintien global de l'architecture de l'ADN bactérien).

La protéine CRP (cAMP Receptor Protein) est surtout connue pour son implication dans la régulation de gènes du métabolisme des sources de carbone secondaires (Galinié, 2018). Lors de la présence de plusieurs sucres dans le milieu (glucose, arabinose, lactose...), la bactérie utilise préférentiellement le glucose et réprime les gènes responsables du métabolisme des autres sources de carbone comme le lactose et l'arabinose, c'est ce que l'on

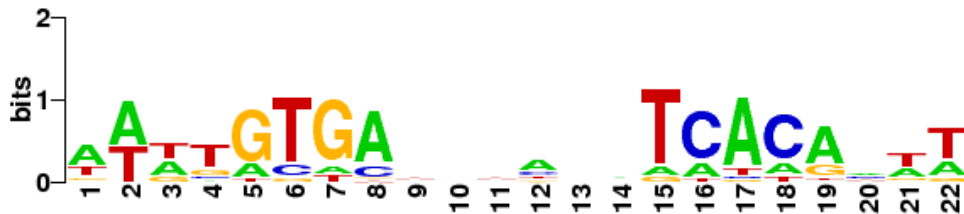


Figure 38 : Séquence consensus du site de fixation du complexe CRP-AMPc

Séquence consensus obtenue par l'alignement de toutes les séquences connues et expérimentalement déterminées pour la fixation de la protéine CRP-AMPc grâce au logiciel WebLogo (Crooks *et al.* 2004). En ordonnées, les bits correspondent à la conservation de la base à une position donnée, et en abscisses, la position des différentes bases dans le motif pour le site concerné. C : Cytosine, T : Thymine, G : Guanine, A : Adénine. Adaptée de Prodoric 8.1 (<http://www.prodoric.de/vfp/>). (Thèse Claire Lallement, Université de Limoges, 2018).

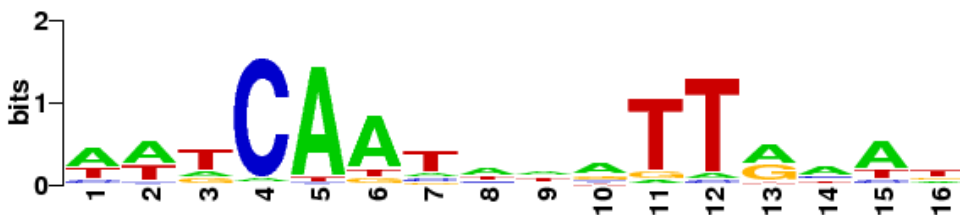


Figure 39 : Séquence consensus du site de fixation de la protéine IHF

Séquence consensus obtenue par alignement de toutes les séquences nucléotidiques connues et expérimentalement déterminées pour la fixation de la protéine IHF grâce au logiciel WebLogo (Crooks *et al.* 2004). En ordonnées, les bits correspondent à la conservation de la base à une position donnée et en abscisses, la position des différentes bases dans le motif pour le site concerné. C : Cytosine, T : Thymine, G : Guanine, A : Adénine. Adapté de Prodoric 8.1 (<http://www.prodoric.de/vfp/>). (Thèse Claire Lallement, Université de Limoges, 2018).

appelle la répression catabolique. Lorsqu'il n'y a plus de glucose dans le milieu de culture, la concentration intracellulaire d'AMP cyclique (AMPC) augmente et celui-ci forme un complexe avec la protéine CRP, CRP-AMPC, qui pourra alors induire l'expression des gènes responsables du métabolisme des sources de carbone secondaires en se fixant sur son site CRP (site de fixation long de 22 pb et partiellement palindromique, Figure 38) (Crooks et al., 2004) dans la région promotrice de ces gènes (Galinier, 2018). Il est ainsi connu que le glucose réprime l'activité de la protéine CRP et que l'arabinose l'induit.

Chez *E. coli*, la protéine CRP n'est pas seulement impliquée dans la répression catabolique, elle régule en fait plus de 500 gènes (selon la base de données Regulon DB, <http://regulondb.ccg.unam.mx>, (Gosset et al., 2004; Zheng et al., 2004)) impliqués dans différents processus : résistance aux antibiotiques (Hirakawa et al., 2006), formation de biofilm (Liu et al., 2020), réponse stringente (Nakagawa et al., 2006), osmorégulation (Balsalobre et al., 2006),... Baharoglu *et al.* ont identifié un site de fixation de CRP dans la région promotrice de l'intégrase de l'intégron sédentaire chromosomique de *V. cholerae*, *intI*A, et montré que l'expression de *intI*A est régulée directement par la protéine CRP indépendamment de la réponse SOS (Baharoglu et al., 2012). La recherche d'un site putatif de fixation de CRP dans le site *attI*1 contenant la région promotrice de *intI*1, avec l'outil en ligne PRODORIC (Prokaryotic database of gene regulation ; <http://www.prodoric.de>) a par contre été vaine, suggérant l'absence de régulation transcriptionnelle directe par CRP sur l'expression de *intI*1. Cependant, lors des études menées par Emilie Strugeon pour vérifier l'implication de la protéine RelA dans la régulation de l'expression de *intI*1 en biofilm, des essais de complémentation du mutant $\Delta relA$ utilisant le système pBad (*relA* cloné sous la dépendance du promoteur P_{araBAD} qui est réprimé en présence de glucose, et induit en présence d'arabinose), ont donné des résultats inattendus, suggérant un effet potentiel du glucose et/ou de l'arabinose sur l'expression de *intI*1.

La protéine IHF (integration host factor) est un régulateur global impliqué dans le maintien global de l'architecture de l'ADN bactérien. Elle est composée de deux sous-unités, α et β , codées respectivement par les gènes *ihfA* et *ihfB* (Haluzi et al., 1991). Selon la base

Table 8 : Souches et plasmide utilisés dans cette étude

Souches et plasmides	Génotype ou description	Référence
Souches de <i>E. coli</i>		
MG1656 F'	MG1655 <i>lacZ</i> - portant le facteur conjugatif F'	Strugeon et al.2016
MG1656Δ <i>ihfA</i> ::KmFRT	Délétion de <i>ihfA</i> par remplacement du gène par une cassette KmFRT ; Km ^R	Cette étude
MG1656Δ <i>crp</i> ::KmFRT	Délétion de <i>crp</i> par remplacement du gène par une cassette KmFRT ; Km ^R	Cette étude
MG1656Δ <i>crp</i> F'	MG1656 délétée du gène <i>crp</i>	Cette étude
MG1656Δ <i>ihfA</i> ::CmFRT F'	Délétion de <i>ihfA</i> par remplacement du gène par une cassette CmFRT ; Cm ^R	Cette étude
NEB 5-alpha F= Iq	F= <i>proA_B_lacIq_(lacZ)M15 zcf::Tn10 (Tetr)/fhuA2_(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 _80_(lacZ)M15 gyra96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	New England Biolabs
Plasmides		
F'	Facteur conjugatif F' améliore la formation du biofilm ; Tet ^R	Ghigo, J.-M. 2001
pKOBEGA	Plasmide portant l'opéron <i>Redγβα</i> du phage lambda sous le contrôle d'un promoteur pBAD inductible. L'opéron code pour des protéines <i>red</i> qui permettent l'intégration d'un fragment d'ADN linéaire dans le chromosome bactérien par recombinaison homologue. Origine de réplication thermosensible repA101ts (30°C); Amp ^R	Chaverroche et al., 2000
pCP20	Plasmide portant le gène <i>flp</i> codant la recombinase FLP spécifique des sites FRT, Origine de réplication thermosensible pSC101 (30° C.); Amp ^R Cm ^R	Chereparov et Wackernagel, 1995
Pint1-lacZ	Site <i>attI</i> de l'intégron de classe 1, In40, cloné dans le plasmide pSU38totlacZ : gène <i>lacZ</i> sous le contrôle du promoteur int11, Pint11 ; origine de réplication p15a ; Km ^R	Guérin et al. 2011
Pint1*-lacZ	Pint1-lacZ avec la mutation LexAmut2 dans la boîte LexA de Pint11, empêchant la fixation de LexA à son site (expression constitutive): Pint11* ; origine de réplication p15a; Km ^R	Guérin et al. 2011
pZS*tetR1.1-mcs1	Plasmide portant P _{N25} -tetR entre le gène <i>bla</i> et le terminateur t0, et le promoteur synthétique P _{LtetO-1} devant le site de clonage multiple MCS1 ; origine de réplication Psc101*; Amp ^R	Strugeon et al.2016
pZS*tetR1.1- <i>relA</i>	Identique à pZS*tetR11-mcs1 mais avec le gène <i>relA</i> sous le contrôle du promoteur synthétique P _{LtetO-1} ; origine de réplication Psc101*; Amp ^R	Strugeon et al.2016
pZS*tetR1.1- <i>crp</i>	Identique à pZS*tetR1.1-mcs1 mais avec <i>crp</i> sous le contrôle du promoteur synthétique P _{LtetO-1} ; origine de réplication Psc101*; Amp ^R	Cette étude

de données RegulonDB (<http://regulondb.ccg.unam.mx>), IHF régulerait l'expression d'environ 229 gènes chez *E. coli* K-12 (elle peut agir comme activateur ou répresseur) impliqués dans des mécanismes moléculaires comme la recombinaison, la réplication (Dhavan et al., 2002; Swinger and Rice, 2004) ou encore dans la tolérance des bactéries à l'ampicilline (Deter et al., 2021). La protéine IHF possède un site de fixation de 16 pb riche en AT (Figure 39).

1. Matériels et méthodes

1.1. Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture

1.1.1. Souches bactériennes et plasmides

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés dans cette étude sont listés dans la Table 8.

1.1.2. Conditions de culture

Les souches ont été cultivées dans des conditions de culture planctonique ou de biofilm à 37°C dans du milieu Luria-Bertani (LB) supplémenté en kanamycine (Km ; 25µg/ml), Ampicilline (Amp ; 100µg/ml) et Anhydrotétracycline (aTc ; 100ng/ml) quand cela était nécessaire.

Les biofilms ont été cultivés en culture continue pendant 24 h dans un microfermenteur (MF) en verre contenant une spatule amovible comme décrit dans (Strugeon al. 2016). Brièvement, les MF ont été inoculés en y insérant une spatule ayant trempée pendant 2 min dans 15 ml de culture bactérienne de nuit contenant 2×10^9 bactéries/ml ($DO_{600}=2$) puis brièvement rincée dans du milieu LB. Le débit du milieu LB dans le MF est de 1,1ml/min. Après 24h, le biofilm a été remis en suspension par agitation vigoureuse du MF, et la biomasse du biofilm a été estimée en déterminant la densité optique à 600 nm (DO_{600}).

Pour la culture planctonique, 100 µl de la culture de nuit utilisée pour inoculer le MF ont été dilués dans 10 ml de LB et cultivés pendant 24 h à 37°C avec agitation à 300 rpm.

Table 9 : Amorces utilisées dans cette étude

NOM	Séquence 5' → 3'
CRP-500-3	TGCCCAACGCATAGATGAGC
CRP-500-5	GCAGGATCGAAACCACATC
CRP-ext3bis	ACGGTACAGCAGACTTAG
CRP-ext5bis	TTCACAATCGACCACATC
CRP-KmFRT-L3	GAAGCAGCTCCAGCCTACACACATGCGCGGTTATCCTCTGTTATA
CRP-KmFRT-L5	GAACTTCGGAATAGGAACTAATCCCGTCGGAGTGGCGCGTTA
ihfA-ext3	TTGGGGAGTTGCCCTTGC
ihfA-ext5	GAATGAGGTTGAGTTCCGT
ihfA-ext3	TTGGGGAGTTGCCCTTGC
ihfA-ext5	GAATGAGGTTGAGTTCCGT
ihfA.Cmfrt.L-3	CTAAGGAGGATATTCATATGCATAGGTTCAATCCCTCAATGATGC
ihfA.Cmfrt.L-5	GAAGCAGCTCCAGCCTACAGTAATCTGATCTAACTAAAAAGGC
KmFRT.ampli-3	CCATGCAAAAATTTTAATCAGC
KmFRT.ampli-5	ACTCTCTATCGTTGAATCGCGACAG
Km-verif-3	GGATTCATCGACTGTGGCCG
Km-verif-5	CAGTCATAGCCGAATAGCCT
Cm-frt-ampli-3	CATATGAATATCCTCCTTAG
Cm-frt-ampli-5	CTGTAGGCTGGAGCTGCTTC

1.2. Constructions des mutants *MG1656Δcrp* et *MG1656ΔihfA*

La délétion des gènes *crp* et *ihfA* de la souche *E. coli* MG1656 a été réalisée par la méthode PCR-3-temps, comme décrite dans (Datsenko and Wanner, 2000). Brièvement, la délétion d'un gène par PCR-3-temps consiste à (i) amplifier les régions adjacentes (environ 500bp) en amont (pool droit) et en aval (pool gauche) du gène à déléter avec des amorces comprenant une région complémentaire à la cassette de résistance et (ii) amplifier la cassette de résistance. Un fragment d'ADN constitué des régions adjacentes au gène à déléter et de la cassette de résistance est ensuite obtenu par une PCR assemblage. Le fragment obtenu est ensuite transformé par électroporation dans une souche MG1656/pKOBEGA. Le plasmide pKOBEGA porte des gènes codant des protéines qui limitent la dégradation de l'ADN linéaire à l'intérieur de la bactérie et permettent son intégration par recombinaison homologue. Les mutants obtenus ont été vérifiés par PCR, puis la délétion a été transférée dans la souche MG1656 par transduction avec le bactériophage P1*vir* avant de retirer la cassette de résistance via la recombinaison FLP. Nous avons ainsi obtenu les souches *MG1656Δcrp* et *MG1656ΔihfA*. Le facteur F'*tet* a ensuite été introduit par conjugaison dans ces souches à partir de la souche NEB5-*alphaF'* (Table 8) pour obtenir les souches *MG1656Δcrp F'* et *MG1656ΔihfA F'*. Les amorces utilisées pour les délétions et les vérifications sont listées dans la Table 9.

Pour le mutant *MG1656ΔihfA::KmFRT*, l'excision de la cassette KmFRT était impossible car nous avons rencontré des difficultés à transformer le plasmide pCP20. Il semblerait que l'absence de la protéine IHF pose un problème pour la transformation de plasmides dont l'origine de répllication est thermosensible. En effet, il a été rapporté dans la littérature que les mutants *ΔihfA* sont sensibles à la différence de température (Bykowski and Sirko, 1998). La conservation de la cassette KmFRT posait problème car les plasmides que nous utilisons dans cette étude portent des gènes de résistance à la kanamycine. Nous avons donc remplacé le gène *ihfA* par une cassette CmFRT conférant la résistance au chloramphénicol.

1.3. Construction du plasmide de complémentation pZStetR1.1 *crp*

Le gène *crp* a été amplifié à partir de l'ADN génomique de MG1656 avec les amorces *crp*-IF-ATG et *crp*-IF-Stop (Table 9), et cloné en utilisant le kit de clonage In-Fusion HD (Clontech) selon les instructions du fabricant, dans le fragment pZStetR1.1 obtenu à partir du plasmide pZStetR1.1 *relA* digéré par KpnI/HindIII. Nous avons ainsi obtenu le plasmide pZStetR1.1 *crp*. Les amorces utilisées sont listées dans le Table 9.

1.4. Essais β -galactosidase

Le dosage de la β -galactosidase a été effectué en utilisant des échantillons de 0,5 ml de culture planctonique ou 0,5 ml de biofilm resuspendu, comme précédemment décrit dans (Jové et al., 2010).

1.5. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide de GraphPad Prism version 6.04 pour Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com". Pour la comparaison entre deux groupes, on a utilisé un test de Wilcoxon (« Two-tailed », apparié) Les différences statistiquement significatives ont été définies par une valeur p inférieure à 0,05.

2. Résultats

2.1. Rôle de la protéine CRP dans la régulation de l'expression de *int11*

2.1.1. Effet de la délétion de *crp*

Afin d'évaluer le rôle de la protéine CRP dans la régulation de *int11*, nous avons construit une souche d'*E. coli* MG1656 délétée du gène *crp* afin de comparer l'activité du promoteur de *int11* dans la souche sauvage et son dérivé Δcrp , en culture planctonique et en biofilm. Pour ce faire, nous avons utilisé une fusion transcriptionnelle entre la région promotrice de *int11* et le gène rapporteur *lacZ* (Pint11-*lacZ*). D'abord, nous avons examiné la capacité du mutant Δcrp à former du biofilm. Ce dernier a formé autant de biofilm que la souche sauvage (DO_{600nm} moyenne du biofilm resuspendu de 4.1 ± 0.6 pour la souche sauvage vs 4.3 ± 0.8

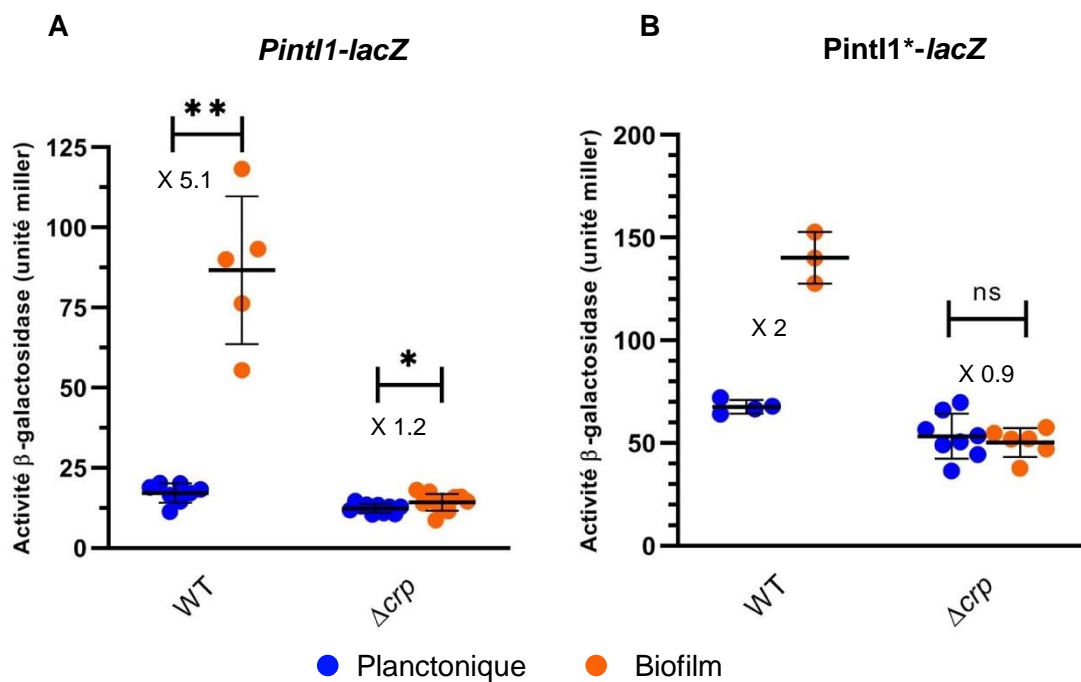


Figure 40 : Influence de la protéine CRP sur l'expression de *int11*

Le niveau d'activité du promoteur sauvage (régulé par la réponse SOS) de l'intégrase, *Pint11* (A) ou du promoteur muté dans la boîte LexA (expression constitutive) *Pint11** (B) a été estimé par dosage de l'activité β -galactosidase (exprimée en unités Miller) de cultures en biofilm (B; orange) et planctonique (P; bleu) pour les souches MG1656 F' (WT) et MG1656 Δcrp F' (Δcrp) contenant le plasmide *Pint11-lacZ* ou *Pint11*-lacZ*. Le ratio des activités β -galactosidase B/P est indiqué. Chaque point représente un réplicat biologique. Les moyennes et les écart-types sont indiqués. Test Wilcoxon, ; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ns: non significatif.

pour le mutant Δcrp ; $p > 0,05$). Les essais β -galactosidase ont montré qu'en absence de CRP, le niveau d'expression de *int11* n'est pas très différent entre culture biofilm (B) et planctonique (P) (ratio B/P des activités β -galactosidases de 1.2) alors que dans la souche sauvage, le niveau basal d'expression de *int11* est 5,3 fois plus élevé en biofilm qu'en planctonique (Figure 40A). Ces résultats indiquent que la protéine CRP est impliquée dans la régulation biofilm-spécifique de *int11*.

Sturgeon *et al.* ont montré que dans un mutant $\Delta recA$ le niveau l'expression de *int11* est très faible voire nul que ce soit en culture planctonique ou en biofilm, suggérant que l'augmentation du niveau basal d'expression de l'intégrase en biofilm dépendait essentiellement de l'induction de la réponse SOS (Sturgeon et al., 2016). Ils ont aussi montré qu'en fait RelA régule cette expression à la fois de façon SOS-dépendante et SOS-indépendante. Afin de savoir si la régulation *via* CRP était exclusivement SOS-dépendante, nous avons aussi estimé l'impact de la délétion de *crp* sur l'activité du promoteur de *int11* muté dans la boîte LexA, Pint11* (mutation empêchant la fixation de la protéine LexA sur sa boîte LexA située dans la région promotrice de *int11* et induisant donc une expression constitutive de *int11*), avec la fusion transcriptionnelle Pint11*-*lacZ*. Les résultats obtenus avec Pint11*-*lacZ* ont montré qu'en absence de CRP, le niveau d'expression de *int11* n'est pas significativement différent entre cultures biofilm et planctonique, alors qu'il est 2 fois plus élevé en biofilm avec la souche sauvage (Figure 40B). L'ensemble de ces résultats indique donc que, comme ce qui avait été observé avec RelA (Sturgeon et al., 2016), CRP régulerait l'expression de *int11* en biofilm en induisant d'une part la réponse SOS (abolition du facteur B/P=5,3 dans le biofilm Δcrp , induction dû essentiellement à la réponse SOS d'après Sturgeon *et al.*) et d'autre part *via* une régulation ne faisant pas intervenir la réponse SOS (abolition du facteur B/P=2 dans le biofilm Δcrp avec le Pint11 déréprimé expression indépendante de la réponse SOS).

2.1.2. Complémentation par CRP

Afin de confirmer le rôle de CRP dans la régulation de l'expression de *int11* en biofilm, nous avons complémenté les souches MG1656 Δcrp F' / Pint11*-*lacZ* et MG1656 Δcrp F' / Pint11-

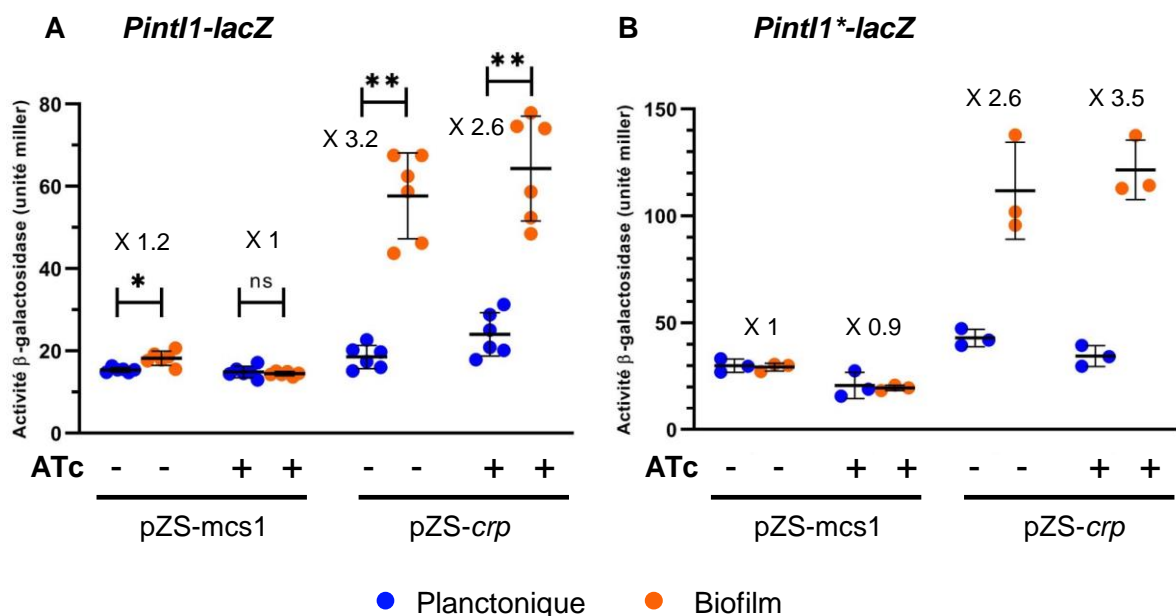


Figure 41 : Complémentation du mutant Δcrp

Le niveau d'activité du promoteur sauvage de l'intégrase, *Pint1* (A) ou du promoteur muté *Pint1** (B) a été estimé par dosage de l'activité β -galactosidase (exprimée en unités Miller) des souches MG1656 Δcrp F' /p*Pint1-lacZ* et MG1656 Δcrp F' /p*Pint1*-lacZ* portant également le plasmide pZS*tetR1.1-mcs1 (pZS-mcs1) ou pZS*tetR1.1-crp (pZS-crp). Les souches ont été cultivées pendant 24 h en biofilm (orange ; B) ou en culture planctonique (bleu ; P) en l'absence (-) ou en présence (+) d'anhydrotétracycline (ATc, 100ng/ml ; induction de la synthèse de la protéine CRP). Le ratio unités Miller B/P est indiqué. Trois à six réplicats biologiques par souches ont été réalisés, chaque point représente un réplicat biologique. Les moyennes et les écart-types sont indiqués. Test Wilcoxon, ; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; ns: non significatif.

lacZ avec CRP. Afin de produire la protéine CRP de façon contrôlée, le gène *crp* a été cloné sous la dépendance du promoteur $P_{\text{LtetO-1}}$, dont l'activité est réprimée par le répresseur TetR (dont le gène est présent sur le plasmide et est exprimé de façon constitutive) qui se lie fortement à l'opérateur *tetO* présent au sein du promoteur $P_{\text{LtetO-1}}$ (plasmide pZS*tetR1.1-*crp*; Table 8). Le système est induit par l'anhydrotétracycline, un dérivé de la tétracycline qui comme cette dernière présente une affinité élevée pour le répresseur TetR (Da Re et al., 2007; Lutz and Bujard, 1997). Comme attendu, lorsqu'on introduit le plasmide de complémentation vide (pZS*tetR1.1-mcs1) dans les souches MG1656 Δ *crp* F'/PintI1-*lacZ* et MG1656 Δ *crp* F'/PintI1*-*lacZ*, le niveau d'expression ne varie pas entre les deux types de cultures biofilm et planctonique (Figures 41A et B). Par contre, l'induction de la production de CRP *via* le plasmide pZS*tetR1.1-*crp*, restaure le phénotype sauvage dans les deux souches, c'est-à-dire que le niveau d'expression basal de *intI1* est plus élevé en biofilm qu'en culture planctonique, confirmant l'implication de CRP dans la régulation de *intI1* en biofilm (Figure 41A et B). De façon très surprenante, la présence du plasmide pZS*tetR1.1-*crp* a suffi pour compléter les deux souches testées même sans induction par l'anhydrotétracycline (Figure 41). Ces résultats étranges pourraient s'expliquer par le fait que le système de répression TetR/ $P_{\text{LtetO-1}}$ ne serait pas totalement efficace et qu'il y aurait une petite fuite d'expression de *crp* suffisante pour rétablir la régulation CRP-dépendante. Ce résultat suggère que quelques molécules de CRP suffiraient pour restaurer le niveau d'expression de *intI1* en biofilm.

2.1.3. Effet de l'arabinose sur l'expression de *intI1*

Comme dit précédemment, la protéine CRP est impliquée dans la régulation de gènes du métabolisme des sources de carbone secondaires, et son activité est réprimée en présence de glucose et induite en présence d'arabinose. Nous avons donc évalué l'expression de *intI1* dans la souche sauvage portant la fusion transcriptionnelle PintI1-*lacZ* en culture planctonique et en biofilm en présence de 1% de glucose ou de 1% d'arabinose. En planctonique, l'ajout d'arabinose a induit l'expression de *intI1* de 13 fois par rapport à la condition glucose (Figure 42) confirmant une régulation de l'expression de *intI1* par la répression catabolique et CRP.

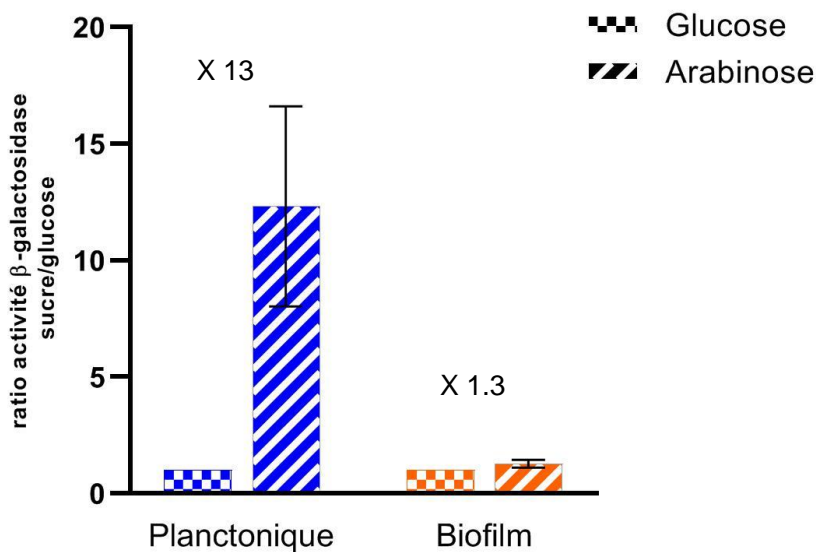


Figure 42 : Effet de l'arabinose sur l'expression de *int1*

Ce graphique représente le ratio des activités β -galactosidase mesurées dans la souche MG1656 F' /pPint11-*lacZ* cultivée en milieu LB + 1% de glucose (damier) ou en milieu LB + 1% d'arabinose (zébrure) sur celle cultivée dans du milieu LB + 1% de glucose. Les souches ont été cultivées pendant 24h en biofilm (orange) ou en culture planctonique (bleu). La différence d'induction Arabinose/Glucose est spécifiée. Cinq réplicats biologiques ont été réalisés par condition. Les moyennes et les écart-types sont indiqués.

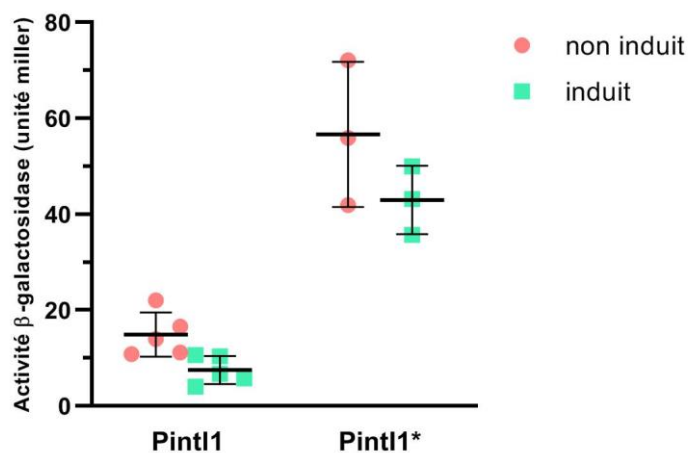


Figure 43 : Complémentation du mutant Δcrp par *RelA*

Le niveau d'activité du promoteur sauvage (Pint11) ou muté (Pint11*) de l'intégrase a été estimé par dosage de l'activité β -galactosidase (exprimée en unités Miller) des souches MG1656 Δcrp F' /pPint11-*lacZ* et MG1656 Δcrp F' /pPint11*-*lacZ* portant également le plasmide pZS*tetR1.1-*relA*. Les souches ont été cultivées pendant 24 h en biofilm en l'absence (non induit; cercle orange) ou en présence (induit; carré vert) d'anhydrotétracycline (100ng/ml) (ATc ; induction de la synthèse de la protéine RelA). Chaque point représente un réplicat biologique. Les moyennes et les écart-types sont indiqués.

Cependant, en biofilm, le niveau d'expression de *int11* n'a pas significativement varié entre les deux conditions (Figure 42). Cette différence d'effet de l'arabinose entre cultures planctonique et biofilm, pourrait s'expliquer par le fait qu'en biofilm, le niveau d'activité maximal de CRP serait déjà atteint, et que l'ajout d'arabinose resterait donc sans effet.

L'ensemble de ces résultats indique que (i) la protéine CRP régule l'expression de *int11* probablement de façon indirecte (ii) cette régulation est favorisée par le mode de vie biofilm, en effet la régulation de *int11* en planctonique n'est visible que si l'activité de CRP est induite par l'arabinose. Il semblerait le mode de vie biofilm soit un environnement induisant l'activité de CRP.

2.1.4. Complémentation par RelA

Comme mentionné plus haut, nous n'avons pas identifié de site putatif de fixation de la protéine CRP au sein de la région promotrice de *int11* ; il semblerait donc que la régulation de *int11* par CRP soit indirecte. De plus, comme le montrent nos résultats CRP induirait l'expression de *int11* en biofilm de façon SOS-dépendante et SOS-indépendante (Figure 40) (Strugeon et al., 2016). Une étude a montré que CRP régule positivement le promoteur P2 du gène *relA* lors de la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire (Nakagawa et al., 2006). Si la régulation par CRP passait par l'induction de l'expression de *relA*, alors il devrait être possible de compléter l'absence de CRP par RelA. Nous avons donc complété la souche Δcrp par RelA en biofilm et en planctonique en transformant le plasmide pZS*tetR1.1-*relA* dans les souches MG1656 Δcrp F'/Pint11-*lacZ* et MG1656 Δcrp F'/Pint11-*lacZ*. Les résultats préliminaires ont montré que l'induction de la production de RelA n'a pas permis de restaurer le niveau d'expression de *int11* en biofilm quelle que soit la construction utilisée (Figure 43). Ce résultat semble suggérer que RelA ne serait pas le chaînon manquant entre CRP et l'induction de l'expression de *int11* en biofilm.

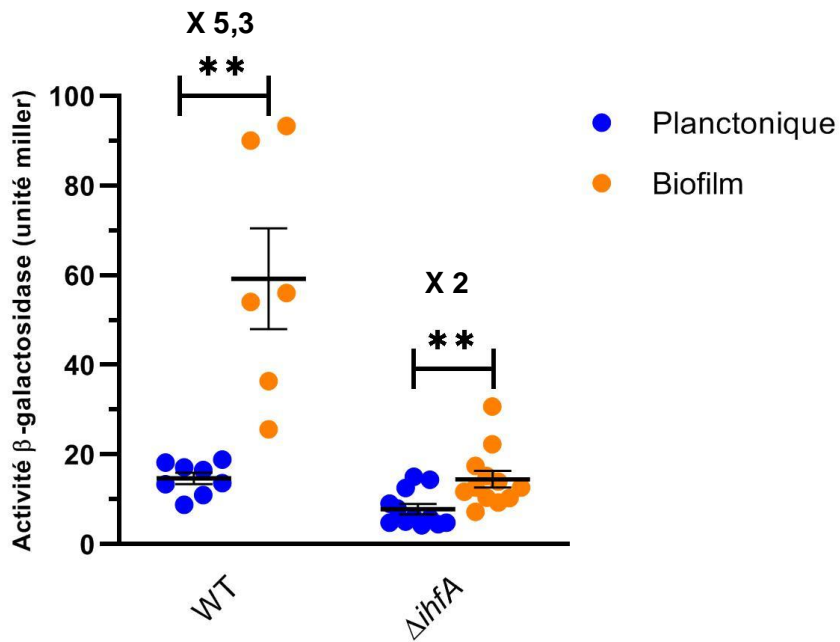


Figure 44 : Influence de la protéine IHF sur l'expression de *intI1*

Le niveau d'activité du promoteur de l'intégrase, *PintI1* a été estimé par dosage de l'activité β-galactosidase (exprimée en unités Miller) de cultures en biofilm (B; orange) et en planctonique (P; bleu) pour les souches MG1656 F' *PintI1-lacZ* (WT) et MG1656Δ*ihfA* F' *PintI1-lacZ* (Δ*ihfA*). Le ratio des activité β-galactosidase B/P est indiqué. Chaque point représente un réplicat biologique. Les moyennes et les écart-types sont indiqués. Test Wilcoxon, ; ** p<0.01.

2.2. Influence de la protéine IHF sur l'expression de *intl1*

Afin d'étudier l'influence de la protéine IHF sur l'activité du promoteur *Pint11* en biofilm, nous avons construit une souche MG1656 F' délétée du gène *ihfA* MG1656 Δ *ihfA* ::CmFRT F', et avons comparé, dans ce fond génétique, l'activité du promoteur *Pint11* en culture planctonique et en biofilm. Contrairement à la mutation Δ *crp*, la délétion du gène *ihfA* a un effet sur la capacité de la souche à former du biofilm : le mutant forme environ 2 fois moins de biofilm que la souche sauvage (DO_{600nm} moyenne de la souche sauvage 3.1 ± 0.9 vs 1.4 ± 0.3 pour le mutant Δ *ihfA* ; $p < 0,05$). Les essais β -galactosidase montrent que par rapport à la souche sauvage, en absence de *ihfA* le niveau d'expression de *intl1* diminue de façon significative que ce soit en culture planctonique ou en biofilm, l'effet étant plus important en biofilm (diminution d'un facteur 1.6 en planctonique et 4 en biofilm ; Figure 44). Bien que le niveau d'expression de *intl1* diminue fortement en biofilm dans la souche MG1656 Δ *ihfA* F'/*Pint11*, l'activité de *Pint11* y reste deux fois plus élevée en biofilm qu'en culture planctonique (Figure 44). L'ensemble de ces résultats suggèrent que même si IHF semble être impliquée dans la régulation de l'expression de *intl1*, elle semble avoir un effet à la fois en planctonique et en biofilm, et sa délétion n'abolit pas l'induction biofilm-spécifique du niveau basal d'expression de *intl1*.

Discussion

Les biofilms sont responsables d'infections chroniques ou récurrentes difficiles à éradiquer avec les traitements antibiotiques classiques (Bjarnsholt, 2013). Ce sont des environnements très hétérogènes (présence de gradients de concentration en oxygène, en nutriments, de pH...) où toutes les bactéries ne présentent pas le même état physiologique et métabolique, et où un certain nombre d'entre elles sont fortement tolérantes aux antibiotiques (Stewart and Franklin, 2008). La récalcitrance des biofilms vis-à-vis des antibiotiques est multifactorielle (Hall and Mah, 2017; Lebeaux et al., 2014; Uruén et al., 2020). Les bactéries persistantes sont suspectées jouer un rôle majeur dans la récalcitrance du biofilm aux antibiotiques. Plusieurs études indiquent que l'induction de la réponse stringente (induite par des carences en nutriments) est responsable de la formation des bactéries persistantes notamment en biofilm où les bactéries sont sujettes à des carences en nutriments (Amato and Brynildsen, 2014; Nguyen et al., 2011). Un autre mécanisme permettant aux bactéries de survivre aux traitements antibiotiques, est l'échange de gènes de résistances aux antibiotiques par transfert horizontal de gènes (Hall and Mah, 2017; Lebeaux et al., 2014; Uruén et al., 2020). La présence d'intégrons, systèmes bactériens d'acquisition, d'échange et d'expression de cassettes de gène codant des résistances aux antibiotiques (Escudero et al., 2018), est fortement corrélée à la multirésistance chez les bactéries à Gram négatif (Deng et al., 2015; Leverstein-van Hall et al., 2003). Une étude récente menée au laboratoire a montré que les biofilms sont des environnements favorables à l'acquisition/échange des gènes de résistance aux antibiotiques *via* les intégrons et donc potentiellement à l'émergence de bactéries multirésistantes (Strugeon et al., 2016). En effet, l'expression des gènes *int11* et *sfiA* (gène du régulon SOS) est augmentée plus de deux fois en biofilm par rapport à la culture planctonique de façon RelA et SpoT dépendante (régulateurs de la réponse stringente) (Strugeon et al., 2016). Si ce travail démontrait l'existence d'une régulation de l'intégrase biofilm-dépendante, il était basé sur l'analyse de données obtenues à partir d'un biofilm entier. Au vu de la structure hétérogène du biofilm, cette dernière pourrait ne pas refléter ce qui se passe réellement dans les différentes populations de bactéries qui constituent le biofilm.

1. Le stress endogène dans le biofilm favorise l'apparition d'une sous-population de bactéries à fort potentiel de résistance

Le premier objectif de mon travail de thèse était donc de localiser l'expression du gène *int11* en biofilm afin de déterminer si l'induction de son expression était généralisée dans le biofilm ou localisée seulement dans certaines microniches. L'expression de l'intégrase étant régulée par la réponse SOS, nous nous sommes également intéressés à l'expression du gène *sfiA* en biofilm, connue pour être fortement induite par la réponse SOS (Courcelle et al., 2001). Pour visualiser l'expression des gènes *int11* et *sfiA* dans chaque bactérie du biofilm et non pas de façon globale, nous avons utilisé des fusions transcriptionnelles entre les promoteurs d'intérêt et une protéine fluorescente, et un système de flow-cell microfluidique associé à un microscope confocal pour suivre l'expression des gènes par émission de fluorescence *in situ* dans le biofilm. Nous avons ensuite évalué la proportion de bactéries exprimant *sfiA* en biofilm par cytométrie en flux, et enfin nous avons quantifié l'expression de *int11* et de *sfiA* par RT-qPCR dans les différentes sous-populations de bactéries du biofilm triées par FACS selon leur niveau de fluorescence.

Nos résultats de microscopie confocale ont montré qu'en absence de stress exogène, seul un nombre très restreint de bactéries situées préférentiellement dans les couches profondes du biofilm, exprimaient le gène *sfiA* (réponse SOS). Nous n'avons par contre pas pu localiser l'expression de *int11* probablement car son niveau d'expression est trop faible (Strugeon et al., 2016) pour permettre de dépasser le seuil de sensibilité de fluorescence du microscope confocal. L'expression localisée de gènes de réponse aux stress dans certaines parties du biofilm a déjà été démontrée. En effet, le gène *rpoS* (codant le régulateur de la réponse globale aux stress chez *E. coli*) est exprimé par toutes les bactéries du biofilm au début du développement de ce dernier, mais lorsque le biofilm devient mature, seules les bactéries présentes à l'interface air-liquide expriment le gène *rpoS* (Ito et al., 2009b). La localisation des bactéries exprimant *sfiA* en profondeur du biofilm est cohérente avec les résultats obtenus par Strugeon et al. qui montraient que l'induction de l'expression de *sfiA* en

biofilm est sous le contrôle de la réponse stringente (Strugeon et al., 2016). En effet, il a été montré que les bactéries localisées dans les couches profondes du biofilm mature sont confrontées à des carences en nutriments (Huang et al., 1998; Petroff et al., 2011; Stewart, 2003; Stewart and Franklin, 2008). Des études ont aussi montré que les bactéries situées dans des microniches en profondeur du biofilm sont peu ou pas actives métaboliquement (Huang et al., 1998; Williamson et al., 2012). Nous avons essayé de suivre en temps réel l'expression de *sfiA* en biofilm avec des acquisitions toutes les deux heures afin de déterminer à quel moment les bactéries ont activé le promoteur *P_{sfiA}*. Cependant, la perte de focus au cours des acquisitions a rendu ce suivi compliqué. Les rares acquisitions que nous avons pu avoir à divers temps et qui étaient exploitables pour l'analyse d'image, ont montré que l'intervalle de temps de 2h était trop long pour suivre correctement les bactéries vertes. Cet intervalle de 2h avait été choisi pour éviter le phénomène de photoblanchiment (destruction irréversible des fluorophores par une illumination très intense/perde de fluorescence). En fait une meilleure approche pour suivre la dynamique d'expression de *sfiA* en biofilm serait d'utiliser un microscope confocal à « spinning disk » plus adapté pour des acquisitions en temps réel sur des échantillons vivants. Ce type de microscope, contrairement au microscope confocal à balayage laser, permet de faire des acquisitions très rapides et limite considérablement le photoblanchiment tout en conservant une haute résolution (Oreopoulos et al., 2014). Il pourrait aussi être intéressant d'utiliser comme gène rapporteur un variant de la GFP avec une demi-vie réduite. Cette dernière ne s'accumulant pas dans la bactérie, elle permettrait d'avoir une localisation temporelle, de voir des situations de ON/OFF *i.e.* d'avoir une vision plus juste du moment de la perception du stress par la bactérie ainsi que de la durée de la réponse (Andersen et al., 1998).

La quantification de la proportion de bactéries exprimant *sfiA* en biofilm par cytométrie en flux a permis de confirmer et d'approfondir les résultats obtenus par microscopie confocale. Les analyses de cytométrie en flux ont permis d'identifier 3 populations exprimant le gène *sfiA* à des niveaux différents: une population non fluorescente majoritaire (environ 97% de la biomasse du biofilm) et qui exprimerait donc *sfiA* à un niveau basal trop bas pour être visualisé

en fluorescence, une petite population intermédiaire en niveau de fluorescence (environ 2% de la biomasse du biofilm) et une population super-fluorescente très minoritaire (environ 1% de la biomasse du biofilm) qui exprimerait *sfiA* à un niveau élevé. Nous avons donc trié les trois populations par FACS et quantifié par RT-qPCR le niveau d'expression des gènes *intl1* et *mcherry*, exprimés respectivement à partir des promoteurs Pint1 et P_{sfiA} et porté par un même plasmide (de type ColE1), et du gène chromosomique *sfiA* dans chacune des sous-populations. Comme attendu, le niveau d'expression de *intl1* et *mcherry* était plus élevé dans les populations intermédiaire et super-fluorescente du biofilm que dans la population non-fluorescente. Étonnamment, seule la population super-fluorescente montrait un niveau d'expression du gène *sfiA* chromosomique significativement plus élevé et ce niveau d'induction était beaucoup plus bas que celui des gènes *intl1* et *mcherry* portés par le plasmide. La quantification du nombre de copies de plasmides dans les différentes sous-populations du biofilm a montré une augmentation du nombre de copies de plasmide d'environ 2 et 14 fois dans les populations intermédiaire et super-fluorescente respectivement. Cette augmentation était corrélée à l'augmentation du niveau d'expression du gène *aph(3')-IIa* (présent sur le même plasmide que *intl1* et *mcherry* et exprimé de façon constitutive). Aussi, afin de différencier l'influence du nombre de copies de plasmide et celle de l'induction SOS, et de n'estimer que le seul effet de la réponse SOS sur le niveau d'expression des gènes *intl1* et *mcherry*, nous avons normalisé l'expression des deux gènes par celui du gène *aph(3')-IIa*. Cette normalisation a permis de montrer que comme pour *sfiA*, seule la population super-fluorescente présentait une forte induction significative de l'expression des gènes *intl1* et *mcherry*. L'augmentation d'expression observée dans la population intermédiaire n'était en fait due qu'à un plus grand nombre de copies de plasmides. Il a été montré que l'absence, ou la présence en faibles quantités, de certains acides aminés augmentait le nombre de copies des plasmides de type ColE1 chez *E. coli* (Wrobel and Wegrzyn, 1997). Herman *et al.* ont proposé que cette augmentation du nombre de copies de plasmides était liée au mode de régulation de la réplication des plasmides ColE1 (Herman *et al.*, 1994). L'initiation de la réplication des plasmides de type ColE1 est régulée positivement par les transcrits ARNII et négativement

par les transcrits ARNI (antisens de l'ARNII) (Cesareni et al., 1991). La privation d'acides aminés augmente le niveau des ARNt non chargés qui, par homologie de séquences, peuvent interagir avec l'ARNI ou l'ARNII (selon le type d'acide aminé). Lorsque les ARNt non chargés interagissent avec l'ARNI, l'ARNII est libéré de son inhibiteur (ARNI) et régule positivement l'initiation de la réplication du plasmide, amplifiant ainsi le nombre de copies du plasmide (Herman et al., 1994).

L'augmentation du nombre de copie de plasmide dans les populations intermédiaire et super-fluorescente du biofilm suggère donc que les bactéries du biofilm seraient confrontées à une limitation en acides aminés. La population super-fluorescente, qui subit une forte augmentation (14 fois) du nombre de copie de plasmide, serait ainsi sujette à une carence telle en acides aminés qu'elle induirait à la fois une augmentation du nombre de copies de plasmide mais aussi la réponse stringente et par conséquent la réponse SOS. Cette hypothèse est tout à fait en accord avec les résultats de l'étude de Strugeon et *al.* qui montre qu'une réponse stringente active est nécessaire pour que le niveau basal d'expression de *sfiA* soit plus élevé en biofilm qu'en culture planctonique. Cette même étude a aussi montré que ce niveau plus élevé d'expression de *sfiA* dépend de RecA (même niveau quasi nul d'expression de *sfiA* dans un mutant $\Delta recA$ que ce soit en culture planctonique ou en biofilm) et donc de la réponse SOS (Strugeon et al., 2016). Dans le biofilm, les bactéries sont donc probablement soumises à un stress endogène lié à la carence en aa.

Afin de déterminer si la population super-fluorescente était spécifique du biofilm et dépendait bien de la réponse stringente, nous avons analysé par cytométrie en flux une culture planctonique de notre souche sauvage MG1656 F'/pPsfIAcherry-PintI1-*intI1* et un biofilm issu de son mutant $\Delta relA\Delta spoT$ (incapable d'induire la réponse stringente). Les résultats ont montré la présence d'une population super-fluorescente dans les deux cultures, mais dans des proportions significativement plus faibles que dans le biofilm sauvage. La présence d'une population super-fluorescente en culture planctonique est cohérente avec des études antérieures regardant l'expression de gènes du régulon SOS au niveau de la cellule unique (single cell) qui ont observé en culture planctonique une expression hétérogène de ces gènes

et une forte expression dans une petite sous-population des bactéries (Kamenšek et al., 2010; McCool et al., 2004). Cette expression hétérogène était expliquée par des effets stochastiques et des différences d'affinités de LexA aux différentes boîte LexA. Une étude récente confirme une grande variabilité du nombre de molécules LexA au sein des bactéries d'une même culture. Cette variabilité est expliquée par l'auto-clivage de LexA qui peut se produire fréquemment sans stress particuliers, et donc induit une hétérogénéité d'expression des gènes du régulon SOS, avec parfois des pulses de SOS dans quelques rares bactéries (Jones and Uphoff, 2021). Le tri des sous-populations du biofilm du mutant $\Delta relA\Delta spoT$ et les analyses par RT-qPCR ont montré que le niveau d'expression des gènes *mcherry* et de *int11* (exprimés respectivement à partir des promoteurs P_{sfiA} et P_{int11}) était significativement plus élevé dans la population super-fluorescente que dans la population non-fluorescente du biofilm du mutant $\Delta relA\Delta spoT$. L'ensemble de ces résultats suggérait que (i) la population super-fluorescente n'est pas spécifique du mode de vie biofilm mais que ce dernier favoriserait l'activation des promoteurs P_{int11} et P_{sfiA} à un haut niveau et (ii) dans la population super-fluorescente du biofilm, la réponse stringente ne serait pas le seul stress impliqué dans l'activation des promoteur P_{sfiA} et P_{int11} donc dans l'induction de la réponse SOS.

L'étude de Nguyen *et al.* a rapporté que les bactéries du biofilm d'*E. coli* $\Delta relA\Delta spoT$ présentaient une activité catalase réduite (c'est-à-dire une défense plus faible contre le stress oxydatif) et des niveaux élevés de radicaux hydroxyles (espèces réactives de l'oxygène communément appelé ROS) (Nguyen et al., 2011). Les ROS sont connues pour induire la réponse SOS (Imlay and Linn, 1987; Jena, 2012). Cependant, les bactéries exprimant *sfiA* sont préférentiellement situées dans les profondeurs du biofilm où la concentration en oxygène est généralement faible. Par conséquent, l'induction de la réponse SOS dans la population super-fluorescente du biofilm du mutant $\Delta relA\Delta spoT$ par le stress oxydatif (*via* la production de ROS) est peu probable. Néanmoins, il est possible qu'une partie de ces bactéries super-fluorescentes soient dans une zone avec une concentration en O₂ suffisante pour induire la production de ROS. La localisation des bactéries super-fluorescentes dans le biofilm du

mutant $\Delta relA\Delta spoT$ pourraient permettre de répondre à cette interrogation, mais nos tentatives de localisation de l'expression de *PsfIA-gfp+* dans le biofilm du mutant $\Delta relA\Delta spoT$ par microscope confocale ont échoué. En effet, nous n'avons pas réussi à construire une souche $\Delta relA\Delta spoT$ marquée dans le chromosome par la protéine mCherry malgré plusieurs essais. Pour pallier ce problème, nous avons tenté d'utiliser un colorant de membrane fluorescent dans le rouge, mais il s'est avéré que ce colorant induisait la réponse SOS chez notre souche (potentiellement par un stress au niveau de la membrane) indépendamment du biofilm. Une autre approche serait de mesurer l'activité catalase et les ROS produits par la population super-fluorescente du biofilm du mutant $\Delta relA\Delta spoT$ et de les comparer à celle de la même population du biofilm sauvage, pour voir si l'activation de la réponse SOS dans la population super-fluorescente du biofilm du mutant $\Delta relA\Delta spoT$ est dépendante des ROS. Il serait aussi possible de rajouter des agents anti-oxydants dans le milieu de culture et voir s'il y a toujours une population super-fluorescente dans le biofilm du mutant $\Delta relA\Delta spoT$.

Une étude a montré qu'une carence en phosphate induisait l'expression de *sfiA* chez *E. coli* et que cette induction dépendrait de la protéine H-NS (Histone-like Nucleoid-Structuring) qui joue sur la topologie de la structure de l'ADN (Dri and Moreau, 1993). Une carence en phosphate pourrait aussi être à l'origine de la surexpression de *mcherry* (sous le contrôle de *PsfIA*), et expliquer la présence d'une population de bactéries super-fluorescentes dans le biofilm du mutant $\Delta relA\Delta spoT$. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de quantifier l'expression du gène *phoA* qui code pour la phosphatase alcaline dans les populations super-fluorescente et non-fluorescente du biofilm du mutant $\Delta relA\Delta spoT$. En effet, l'expression de cette dernière est augmentée en absence de phosphate dans le milieu de culture (Huang et al., 1998).

L'ensemble de nos résultats montre qu'il existe deux populations majeures dans le biofilm: une majorité des bactéries (populations non fluorescente et intermédiaire) exprimant à un niveau basal les gènes *sfiA* et *int1*; et une population très minoritaire (super-fluorescente, 1%), située dans la profondeur du biofilm où la réponse SOS est induite (*PsfIA* et

PintI1 actifs) par (i) des carences en acides aminés menant à l'induction de la réponse stringente (ii) d'autres stress (carence nutritionnelle autre, production de ROS ?). Nos résultats indiquent donc que des bactéries situées dans des microniches en profondeur du biofilm subissent des niveaux de stress endogènes suffisant pour (i) induire à haut niveau la réponse SOS comme l'indique la forte activité du promoteur P_{sfIA} (ii) permettre l'acquisition ou le réarrangement de gènes de résistance aux antibiotiques par les intégrons *via* l'expression de *IntI1*. Pour confirmer ce dernier point, nous pourrions comparer l'activité de recombinaison de l'intégrase dans les populations super-fluorescente et non-fluorescente du biofilm (nous disposons au laboratoire d'une technique permettant de tester l'activité de recombinaison (excision) entre 2 sites *attC* (Guerin et al., 2009)). De plus, il serait intéressant de suivre l'échange de cassettes de gène par fluorescence *in situ* dans le biofilm par microscopie et de quantifier ces événements par cytométrie en flux. Nous avons construit un système d'intégron synthétique qui devait permettre de suivre l'échange de cassettes de gène (insertion/ excision) par émission de fluorescence, cependant nos résultats préliminaires n'ont pas été très concluants.

Nous avons aussi vérifié si la population super-fluorescente était une population transitoire ou ayant acquis un nouveau phénotype stable. Nous avons donc trié les bactéries super-fluorescentes d'un biofilm de la souche sauvage et utilisé ces bactéries pour inoculer un microfermenteur. Le biofilm issu de ces bactéries initialement super-fluorescentes contenaient les mêmes sous-populations que le biofilm initial dans des proportions similaires.

La très faible proportion de bactéries super-fluorescentes dans le biofilm, l'état transitoire de leur phénotype, l'implication de la réponse stringente dans leur forte prévalence en biofilm, et les avantages potentiels que peut conférer aux bactéries le fait d'induire la réponses SOS (induction des ADN polymérases translésionnelles conduisant à des mutations adaptatives), font penser aux caractéristiques des bactéries persistantes (persistance induite). Ces dernières sont des bactéries capables de survivre transitoirement à des concentrations létales d'antibiotiques bactéricides, elles représentent une proportion minoritaire (environ 1%) de la population bactérienne traitée (culture planctonique ou biofilm) et leur état est transitoire.

Lorsque les bactéries persistantes sont isolées, repiquées en milieu sans antibiotique puis réexposées au même traitement antibiotique, la même réponse hétérogène au traitement que celle de la population d'origine est observée *i.e.* répartition de la population en sous-populations persistantes et en sous-populations sensibles (Balaban et al., 2019; Brauner et al., 2016). La persistance peut être spontanée ou induite lorsque les bactéries sont exposées à des conditions stressantes telles que la carence en nutriments (Gutierrez et al., 2013), une haute densité bactérienne (Vega et al., 2012), l'exposition aux cellules du système immunitaire (Helaine et al., 2014). Aujourd'hui, le rôle majeur de la réponse stringente dans la formation des bactéries persistantes est reconnu (Hobbs and Boraston, 2019; Pacios et al., 2020), notamment en biofilm où les carences nutritives sont plus fréquentes à cause de la structure hétérogène de celui-ci (Amato and Brynildsen, 2014; Bernier et al., 2013; Nguyen et al., 2011). Bernier *et al.* ont aussi montré qu'une réponse SOS active était nécessaire à la formation de bactéries persistantes en biofilm suite à un traitement par l'ofloxacin (fluoroquinolone), la réponse SOS étant induite lors de la formation du biofilm et non pas lors de l'ajout de l'antibiotique (Bernier et al., 2013).

Il est ainsi très tentant de supposer que la population super-fluorescente du biofilm pourrait être une population de bactéries persistantes induites par les stress endogènes du biofilm. Pour étayer cette hypothèse, il faudrait comparer la capacité des populations super-fluorescente et non-fluorescente du biofilm à survivre en présence de fortes concentrations d'antibiotiques bactéricides. Si notre hypothèse est valide, cela signifierait que dans le biofilm, la population super-fluorescente, qui exprime la réponse SOS à un niveau élevé, serait à la fois tolérante aux antibiotiques et prête à acquérir une résistance aux antibiotiques *via* les ADN polymérases translésionnelles, et/ou l'activité de l'intégrase d'intégron. Lors d'un traitement antibiotique, toutes ces caractéristiques permettraient de sélectionner facilement des bactéries résistantes. Le stress endogène des microniches induirait un état de persistance permettant la tolérance dans un premier temps et l'acquisition de résistance *via* les mécanismes induits par l'activation de la réponse SOS dans un deuxième temps. En effet, il a été récemment démontré que des bactéries persistantes aux fluoroquinolones avaient plus de chance de

devenir résistantes à différentes classes d'antibiotiques *via* l'induction de la réponse SOS et l'activation de la polymérase translésionnelle V (Barrett et al., 2019).

Il a longtemps été considéré que la diffusion réduite des antibiotiques au sein du biofilm était responsable de la sélection de mutants résistants. Aujourd'hui, il est reconnu que la récalcitrance des biofilms vis-à-vis des antibiotiques est multifactorielle. Notre étude démontre que la seule présence de stress endogènes serait suffisante pour induire l'acquisition de résistances aux antibiotiques par un petit nombre de bactéries dans certaines microniches du biofilm. Ces bactéries pourraient ainsi former un réservoir de bactéries responsables de la persistance des infections en clinique.

D'autres études ont montré l'importance des stress endogènes liés au mode de vie biofilm dans l'acquisition de résistance. Boles et *al.* ont par exemple montré dans un biofilm de *P. aeruginosa* (en absence de stress exogène) que les bactéries subissaient un stress oxydatif endogène entraînant des cassures d'ADN double brin. La croissance du biofilm en présence de faibles concentrations de gentamicine générait la sélection d'un grand nombre de bactéries résistantes, phénotype absent si en plus de la gentamicine un agent anti-oxydant était ajouté au milieu ou s'ils utilisaient un mutant incapable de réparer les cassures d'ADN. Les auteurs ont donc conclu que les mécanismes de réparation de cassures de l'ADN induites par les stress oxydatif généraient des variations génétiques au sein de la population conférant divers avantages sélectifs notamment des mutations pouvant conférer des résistances aux antibiotiques qui peuvent être sélectionnées lors d'un traitement antibiotique (Boles and Singh, 2008).

2. Etude de la régulation biofilm-spécifique de l'expression de l'intégrase *intI1*

Le deuxième objectif de ma thèse était de continuer la caractérisation de la régulation biofilm-spécifique de l'expression de l'intégrase d'intégron *intI1*, en explorant le rôle des régulateurs globaux CRP (cAMP Receptor Protein, impliqué dans la régulation de la

répression catabolique) et IHF (Integration Host Factor, impliqué dans le maintien global de l'architecture de l'ADN bactérien).

2.1. La régulation de *intI1* par IHFA n'est pas biofilm-spécifique

La délétion du gène codant IHFA induit une diminution de l'activité de PintI1 que ce soit en culture planctonique ou en biofilm. L'effet observé est plus fort en biofilm, mais l'activité basale de PintI1 reste toujours 2 fois plus élevée en biofilm qu'en culture planctonique (Figure 44). Ce régulateur n'est donc pas responsable de l'induction biofilm-spécifique de l'intégrase d'intégrons de classe 1. Cherchant uniquement des régulateurs spécifiques, nous n'avons donc pas continué à explorer cette voie de régulation par IHFA.

IHFA est impliquée dans le maintien global de l'architecture de l'ADN bactérien. Une étude plus ancienne avait suggéré l'implication des protéines FIS et HNS dans la régulation de l'expression de *intI1* (Cagle et al., 2011). Ces deux protéines sont des protéines associées au nucléoïde, elles affectent la conformation de l'ADN. Ces observations et les nôtres, suggèrent que la conformation de l'ADN de la région promotrice de *intI1* pourrait jouer un rôle dans la régulation de son expression, indépendamment des conditions de culture (planctonique ou biofilm, du moins pour IHFA).

2.2. CRP est impliquée dans la régulation biofilm-spécifique de *intI1*

Contrairement à *ihfA*, la délétion du gène *crp*, abolit la différence de niveau basal d'expression de *intI1* entre culture planctonique et biofilm que ce soit à partir du promoteur sauvage ou muté dans sa boîte LexA (Figure 40). Cet effet peut être totalement complétement lorsque la synthèse de CRP est induite dans les bactéries (Figure 41). La protéine CRP, comme cela avait été montré pour RelA (Strugeon et al., 2016), est donc impliquée dans la régulation biofilm-spécifique de *intI1*. Une régulation directe par CRP, comme celle décrite pour l'intégrase *intIA* de l'intégron chromosomique de *V. cholerae* (Baharoglu et al., 2012) est peu probable, car l'étude *in silico* de recherche de site de fixation de CRP n'a pas identifié de site putatif pour la fixation de CRP au niveau de la région promotrice de *intI1*. Cependant, il

est toujours possible que CRP puisse se fixer sur un site non canonique au niveau de la région promotrice de *int11*. Afin d'écartier totalement cette hypothèse, une expérience de retard sur gel de la région promotrice de *int11* par la protéine CRP purifiée pourrait être envisagée.

Les précédents travaux de Strugeon *et al.* ont démontré que la régulation biofilm-spécifique de l'intégrase *int11* via la réponse stringente est essentiellement médiée par l'induction de la réponse SOS mais aussi par un autre mécanisme ne faisant pas intervenir la réponse SOS. Nous avons montré que CRP induit l'expression de *int11* en biofilm par une voie SOS-dépendante et -indépendante (Figure 40), comme ce qui a été observé pour RelA/SpoT. Le fait que les délétions de *crp* et celle de *relAspoT* aient les mêmes effets sur le niveau d'expression de *int11* en biofilm en absence de stress exogène, *i.e.* niveau basal en biofilm similaire au niveau basal en culture planctonique, suggère que les deux régulations, réponse stringente et AMPc-CRP agissent (i) soit l'une sur l'autre, (ii) soit sur un intermédiaire commun lié à l'induction de la réponse SOS pour la régulation SOS-dépendante, et sur un autre intermédiaire commun pour la régulation SOS-indépendante. L'hypothèse d'une régulation indirecte est donc privilégiée.

2.2.1. Hypothèse 1 : CRP induirait l'expression de *int11* par l'intermédiaire de RelA

La protéine CRP est connue pour son rôle dans la régulation de la répression catabolique, mais chez *E. coli*, elle est aussi impliquée dans la régulation de nombreux autres processus (Gosset *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2004). Nakawaga *et al.* ont montré que CRP régulait positivement le promoteur P2 du gène *relA* lors de la transition entre la phase exponentielle et la phase stationnaire (Nakagawa *et al.*, 2006). En absence de CRP, il pourrait donc être imaginé que *relA* soit moins exprimé lors de carences en nutriments, avec pour conséquence une quantité de (p)ppGpp plus faible et une diminution des diverses régulations dépendant de la réponse stringente. Si l'induction de l'expression de *int11* par CRP passait par la voie RelA, la complémentation du mutant Δcrp par RelA aurait dû permettre de restaurer le niveau d'activité de Pint11 en biofilm, ce qui n'a pas été le cas (Figure 43). Il semblerait même

que le niveau d'expression de *Pintl1* ait tendance à diminuer, mais nous n'avons pas assez de points expérimentaux pour estimer la significativité de ces résultats préliminaires (Figure 43). Ces derniers suggèrent toutefois que RelA n'est pas le chaînon manquant dans la régulation de *intl1* par CRP.

2.2.2. Hypothèse 2 : Intermédiaire commun lié à l'induction de la réponse SOS (DksA ?)

L'inhibition de l'initiation et de l'élongation de la transcription observée lors de l'induction de la réponse stringente nécessite que le (p)ppGpp et DksA se lient à l'ARN polymérase (Gourse et al., 2018; Perederina et al., 2004). Les pauses de l'élongation de la transcription induites par le (p)ppGpp/DksA conduisent à la formation de R-loop (structure d'acide nucléique composée d'un hybride ADN/ARN et du brin d'ADN non codant simple brin). Ces R-loop peuvent induire la réponse SOS (Gan et al., 2011) et *in fine* l'expression de *intl1* (Strugeon et al., 2016). Or, l'expression de DksA semble être régulée, entre autres, par CRP (Keseler et al., 2013). Il est donc envisageable qu'en absence de CRP, il y ait moins de facteur DksA ce qui diminuerait l'arrêt de la transcription, il n'y aurait donc plus d'induction de la réponse SOS et donc moins d'expression de *intl1* dans un biofilm Δcrp . Pour vérifier cette hypothèse, nous pourrions compléter le mutant Δcrp par DksA. Cette hypothèse conforte aussi l'idée que CRP jouerait un rôle dans l'induction des gènes du régulon SOS. Il a été montré chez une souche de *E. coli* privée de nutriments (modèle de colonies « âgées » sur milieu gélosé), que l'AMP cyclique (AMPc) intracellulaire induisait la réponse SOS (Taddei et al., 1995). L'AMPc se lie à CRP, et c'est le complexe CRP-AMPc qui reconnaît et se fixe sur les séquences d'ADN cibles au niveau des séquences promotrices des gènes régulés par CRP (Galinier, 2018). Afin de tester si le niveau d'AMPc est important pour l'induction de l'expression de *intl1*, nous pourrions construire un mutant Δcya incapable de synthétiser l'AMPc et estimer le niveau d'activité de *Pintl1* dans ce mutant.

2.2.3. Lien entre CRP et induction de la réponse SOS

Pour confirmer cette induction CRP SOS-dépendante, il faudrait évaluer l'influence de CRP sur l'expression du gène *sfiA* en biofilm ; si notre hypothèse d'un intermédiaire commun régulé à la fois par la réponse stringente et CRP passant par l'induction de la réponse SOS en biofilm est exacte, alors le niveau basal d'activité de P*sfiA* dans un mutant Δcrp devrait retomber au niveau basal d'expression en culture planctonique. Nos résultats de localisation de l'expression de l'intégrase d'intégron et de *sfiA* montrent que l'induction de la réponse SOS est limitée à une fraction infime de bactéries dans le biofilm. Si nous confirmons que le niveau basal d'expression du gène *sfiA* en biofilm est aussi régulé par CRP, il serait ensuite intéressant de quantifier la population super-fluorescente dans un biofilm du mutant Δcrp , et aussi de doser l'AMPc dans les sous-populations des biofilms de la souche MF1656 F' sauvage et de son mutant Δcrp . Les résultats anticipés seraient une diminution de la population de bactéries super-fluorescentes dans le biofilm du mutant Δcrp comme observé pour le mutant $\Delta relA\Delta spoT$.

Des précédents travaux ont déjà suggéré que CRP et la réponse stringente pouvait être liés. L'étude d'Amato *et al.* a montré que la transition d'utilisation de sources de carbone (utilisation du fumarate après exhaustion du glucose) stimulait la formation de bactéries persistantes à l'ofloxacin (fluoroquinolone agissant sur l'ADN gyrase) chez *E. coli* en culture planctonique (Amato et al., 2013). Cette induction de formation de bactéries persistantes pouvait être induite par ajout d'AMPc dans le milieu et cet effet AMPc dépendait de la présence de CRP, mais aussi de RelA, SpoT et de DksA (pas d'induction de la formation de bactéries persistantes dans les mutants Δcrp , $\Delta relA\Delta spoT$ et $\Delta dksA$ après ajout d'AMPc). Ces résultats suggéraient donc un rôle du (p)ppGpp et de DksA sur la formation de bactéries persistantes en aval de CRP-AMPc.. Par contre dans leurs conditions expérimentales, ni l'ajout d'AMPc, ni

l'exhaustion en glucose n'induisait la réponse SOS que ce soit chez les bactéries « normales » ou persistantes. Ces mêmes auteurs ont ensuite étudié l'effet de la même transition de sources de carbone sur la formation de bactéries persistantes en biofilm (modèles de colonies sur filtre) ; ils ont confirmé le rôle important du (p)ppGpp dans la formation de bactéries persistantes en biofilm (Amato and Brynildsen, 2014). Malheureusement dans cette étude ils n'ont pas regardé l'effet de l'AMPc et de CRP sur l'induction de la formation de bactéries persistantes. D'autres études semblent suggérer un lien potentiel entre régulation CRP (répression catabolite), réponse stringente et SOS. McPhee *et al.* suggèrent que des bactéries d'*E. coli* en phase stationnaire (carences nutritionnelles) exposées à de fortes pressions de sélection, peuvent accumuler des mutations spontanées *via* des voies SOS-dépendantes et SOS-indépendantes, dont les niveaux d'expression sont régulés par la répression catabolique (MacPhee and Ambrose, 2010). Janion *et al.* montrent que des bactéries ayant poussé dans un milieu privé d'arginine accumulent des lésions de l'ADN, puis remises en croissance dans un milieu dont la source de carbone est du glycérol mais pas du glucose (le glucose réprime la synthèse d'AMPc et le glycérol l'induit), peuvent déclencher l'induction de la réponse SOS, suggérant que cette induction est dépendante de l'AMPc (Janion et al., 2002).

3. Régulation de l'expression *intI1* SOS-indépendante

En plus de la régulation biofilm-spécifique de l'expression de *intI1* SOS-dépendante, Strugeon *et al.* ont aussi mis en évidence une régulation biofilm-spécifique de *intI1* qui est SOS indépendante. De façon étonnante, les délétions *crp*, *relA/spoT* ou *lon* ont le même effet sur le promoteur déréprimé de l'intégrase *PintI1**, *i.e.* un niveau basal d'activité de *PintI1** en biofilm similaire à celui de la culture planctonique. Ceci suggère que ces trois régulateurs seraient impliqués dans une voie de régulation commune du promoteur une fois déréprimé, *i.e.* quand LexA n'est plus fixé sur son site.

Notre étude sur la localisation de l'expression de *sfiA* et *intI1* dans le biofilm a mis en évidence une observation surprenante. Nos résultats de RT-qPCR sur les différentes sous-populations du biofilm montraient que le niveau d'activité du promoteur *PintI1* était

significativement plus faible dans la population non fluorescente du biofilm du mutant $\Delta relA\Delta spoT$ que dans celle du biofilm sauvage (cf Fig6 de l'article). Cette observation suggère que dans la population non fluorescente (majorité du biofilm), en l'absence de (p)ppGpp (mutant $\Delta relA\Delta spoT$), l'activité basale de Pintl1 est réduite. Cet effet n'a cependant pas été observé pour le promoteur P_{sfIA}, ce qui indique qu'il serait spécifique du promoteur Pintl1 et indépendant de la réponse SOS.

Strugeon *et al.* ont montré qu'il y avait une régulation biofilm-spécifique de l'intégrase d'intégron de classe 1 passant par la protéase Lon ; toutefois cette régulation n'est active que sur le promoteur Pintl1* (*i.e.* déréprimé) (Strugeon et al., 2016). Dans le modèle de Strugeon et al. (Figure 10), la protéase Lon activée par le polyphosphate (polyP, induit par la réponse stringente) contrôlerait la stabilité d'un régulateur non identifié de Pintl1 (inhibiteur) qui ne peut agir que quand LexA n'est pas fixée sur le promoteur de Pintl1. Dans la population non fluorescente du biofilm du mutant $\Delta relA\Delta spoT$, il n'y a plus de (p)ppGpp donc le niveau de polyP des bactéries doit être plus faible que dans la même population du biofilm sauvage (pas de répression de l'activité de l'exopolyphosphatase (PPX) qui dégrade le polyP ; Figure 10). Ainsi, le niveau de Lon-polyP n'est plus suffisant pour assurer la dégradation de l'inhibiteur du promoteur Pintl1 actif (pas de LexA fixé au promoteur). Ces promoteurs, présents en faible quantité pour permettre l'expression d'un niveau basal de *Int11*, sont donc réprimés ce qui induit une diminution du nombre de transcrits *int11*, ce qu'une technique sensible comme la RT-qPCR pourrait mettre en évidence.

Une autre hypothèse pourrait expliquer la diminution de l'activité basale de Pintl1 en l'absence de (p)ppGpp (mutant $\Delta relA\Delta spoT$) dans la population non fluorescente. En effet, le (p)ppGpp régule positivement ou négativement l'initiation de la transcription des différents gènes en se liant directement à l'ARN polymérase (ARNP) (Ross et al., 2016, 2013). Une étude récente a établi le profil des éléments -35, -10 du promoteur et de la région qui se trouve entre l'élément -10 et le site d'initiation de la transcription +1 (le discriminateur) de gènes régulés positivement et négativement par le (p)ppGpp/DksA. Les gènes inhibés par le

(p)ppGpp/DksA semblent posséder un discriminateur riche en G/C alors que les gènes activés ont un discriminateur riche en A/T (Sanchez-Vazquez et al., 2019). Le promoteur *Pint11* partage certaines caractéristiques des promoteurs activés par le (p)ppGpp/DksA (bases conservées dans la région -10, présence de bases T et A dans le discriminateur). Il pourrait donc être supposé que l'activité basale du promoteur *Pint11* dans le biofilm serait induite directement par le (p)ppGpp/DksA. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant d'évaluer l'expression de *int11* dans une souche où l'un ou l'autre ou les deux sites de fixation du (p)ppGpp au niveau l'ARN polymérase sont mutés (Sanchez-Vazquez et al., 2019). Comme CRP semble être impliquée dans la régulation de DksA, l'activation de *Pint11** par « le complexe » l'ARNP-(p)ppGpp-DksA pourrait être le lien entre la réponse stringente et CRP sur la régulation SOS-indépendante de l'expression de l'intégrase.

Les 2 hypothèses présentées ci-dessus font soit le lien entre réponse stringente et Lon, ou entre réponse stringente et CRP (si lien DksA possible pour régulation), mais nous n'avons pas encore identifié de lien direct entre les 3 régulations.

Conclusion et perspectives

La régulation de l'expression de l'intégrase d'intégron de classe 1 en biofilm est plus complexe que ce qui avait été anticipé. La réponse SOS est son activateur majeur, et nous avons montré par ce travail que cette réponse SOS peut être induite à haut niveau par des stress endogènes inhérents au mode de vie biofilm dans une minorité des bactéries localisées dans la profondeur du biofilm. Dans cette population l'induction du SOS dépend de la réponse stringente *via* la carence en aa, d'autres stress (carences phosphate, ROS ?) et probablement aussi de CRP. Nos résultats et ceux des travaux précédents montrent aussi que l'expression de l'intégrase subit aussi une régulation biofilm-spécifique SOS-indépendante qui implique la protéase Lon, la réponse stringente et CRP ; cette régulation intervient sur le promoteur libre de LexA. Enfin l'expression de l'intégrase semble aussi être influencée par les courbures de l'ADN comme le suggère nos résultats avec le mutant $\Delta ihfA$, mais cette dernière régulation ne dépend pas du mode de vie bactérien.

Ce travail comme tout travail de recherche, apporte de nouvelles questions. L'une d'entre elle : est quel est le lien entre les différentes régulations de l'expression de *int1* qu'elles soient SOS-dépendantes ou SOS-indépendantes ? En effet, les effets observés sur l'expression de *int1* en biofilm lors de la délétion des différents régulateurs (niveau basal en biofilm similaire au niveau basal en culture planctonique) suggèrent qu'il y a un lien entre les différentes voies de régulation. La première hypothèse à vérifier serait de montrer qu'en biofilm, CRP est bien impliquée dans la régulation de gènes du régulon SOS (*sfiA* par exemple), dans la population totale et dans la population super-fluorescente du biofilm. Ensuite, il sera intéressant de vérifier l'implication de la protéine DksA dans les régulations dépendant ou non du SOS, et aussi la régulation de l'expression de l'intégrase par l'interaction du(p)ppGpp et/ou DksA avec l'ARN polymérase.

Notre étude a aussi confirmé l'importance d'étudier la régulation des gènes dans le biofilm en prenant en compte chaque bactérie du biofilm de façon individuelle. En travaillant avec la population totale, seule une moyenne des effets des événements qui sont mis en jeu est visible, les effets observés sont minimisés, voire invisibles pour certains d'entre eux lorsqu'ils se produisent chez un petit nombre de bactéries. Par exemple l'approche globale de

l'étude précédente ne permettait pas de montrer que seule une sous-population du biofilm exprime la réponse SOS à haut niveau (en absence de stress exogène) ou encore la diminution d'expression de *int11* dans le mutant $\Delta relA\Delta spoT$ dans la population non fluorescente. Malheureusement le suivi de l'expression de gènes dans des bactéries individuelles nécessite d'avoir un niveau d'expression suffisant pour être visualisé par des approches comme la microscopie confocale et la cytométrie en flux ce qui explique que n'avons pas pu suivre directement l'expression de l'intégrase par ces techniques.

Une autre perspective particulièrement intéressante à ce travail serait de vérifier si la population super-fluorescente du biofilm est une population de bactéries persistantes. De même, nous pourrions tester si ces bactéries qui exprime *int11* à haut niveau ont un avantage, par rapport au reste de la population, leur permettant de survivre à un stress antibiotique en réarrangeant leurs réseaux de cassettes. Si tel était le cas, nous aurions montré que le stress endogène inhérent au mode de vie biofilm serait suffisant pour induire la persistance et favoriser l'acquisition de résistances aux antibiotiques dans une sous-population du biofilm. Cette dernière formerait ainsi un réservoir de bactéries prêtes à résister rapidement aux traitements antibiotiques et pourrait être la cause d'infections récurrentes.

Références bibliographiques

- Abdel-Rhman, S.H., 2020. Characterization of β -lactam resistance in *K. pneumoniae* associated with ready-to-eat processed meat in Egypt. *PLoS One* 15, e0238747. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238747>
- Ackerley, D.F., Barak, Y., Lynch, S.V., Curtin, J., Matin, A., 2006. Effect of chromate stress on *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 188, 3371–3381. <https://doi.org/10.1128/JB.188.9.3371-3381.2006>
- Aertsen, A., Michiels, C.W., 2005. Mrr instigates the SOS response after high pressure stress in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 58, 1381–1391. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04903.x>
- Aertsen, A., Van Houdt, R., Vanoirbeek, K., Michiels, C.W., 2004. An SOS response induced by high pressure in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 6133–6141. <https://doi.org/10.1128/JB.186.18.6133-6141.2004>
- Agersø, Y., Sandvang, D., 2005. Class 1 integrons and tetracycline resistance genes in *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, and *Pseudomonas* spp. isolated from pigsties and manured soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7941–7947. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.7941-7947.2005>
- Alam, M.K., Alhazmi, A., DeCoteau, J.F., Luo, Y., Geyer, C.R., 2016. RecA Inhibitors Potentiate Antibiotic Activity and Block Evolution of Antibiotic Resistance. *Cell Chem. Biol.* 23, 381–391. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2016.02.010>
- Alfoldi, L., Stent, G.S., Clowes, R.C., 1962. The chromosomal site of the RNA control (RC) locus in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 5, 348–355. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(62\)80077-1](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(62)80077-1)
- Alhede, M., Bjarnsholt, T., Jensen, P.Ø., Phipps, R.K., Moser, C., Christophersen, L., Christensen, L.D., van Gennip, M., Parsek, M., Høiby, N., Rasmussen, T.B., Givskov, M., 2009. *Pseudomonas aeruginosa* recognizes and responds aggressively to the presence of polymorphonuclear leukocytes. *Microbiol. Read. Engl.* 155, 3500–3508. <https://doi.org/10.1099/mic.0.031443-0>
- Amato, S.M., Brynildsen, M.P., 2014. Nutrient Transitions Are a Source of Persisters in *Escherichia coli* Biofilms. *PLoS ONE* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093110>
- Amato, S.M., Orman, M.A., Brynildsen, M.P., 2013. Metabolic Control of Persister Formation in *Escherichia coli*. *Mol. Cell* 50, 475–487. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.04.002>
- Ambriz-Aviña, V., Contreras-Garduño, J.A., Pedraza-Reyes, M., 2014. Applications of Flow Cytometry to Characterize Bacterial Physiological Responses. *BioMed Res. Int.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/461941>
- An, D., Parsek, M.R., 2007. The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities. *Curr. Opin. Microbiol., Ecology and Industrial Microbiology / RNA Techniques* 10, 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.05.011>
- Anderl, J.N., Franklin, M.J., Stewart, P.S., 2000. Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1818–1824. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.7.1818-1824.2000>
- Andersen, J.B., Sternberg, C., Poulsen, L.K., Bjorn, S.P., Givskov, M., Molin, S., 1998. New unstable variants of green fluorescent protein for studies of transient gene expression in bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2240–2246. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.6.2240-2246.1998>

- Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N., Ohta, M., 1995. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla*IMP. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 1612–1615. <https://doi.org/10.1128/aac.39.7.1612>
- Aravind, L., Koonin, E.V., 1998. The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem. Sci.* 23, 469–472. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01293-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01293-6)
- Arenz, S., Abdelshahid, M., Sohmen, D., Payoe, R., Starosta, A.L., Berninghausen, O., Hauryliuk, V., Beckmann, R., Wilson, D.N., 2016. The stringent factor RelA adopts an open conformation on the ribosome to stimulate ppGpp synthesis. *Nucleic Acids Res.* 44, 6471–6481. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw470>
- Atkinson, G.C., Tenson, T., Hauryliuk, V., 2011. The RelA/SpoT Homolog (RSH) Superfamily: Distribution and Functional Evolution of ppGpp Synthetases and Hydrolases across the Tree of Life. *PLoS ONE* 6, e23479. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023479>
- Au, N., Kuester-Schoeck, E., Mandava, V., Bothwell, L.E., Canny, S.P., Chachu, K., Colavito, S.A., Fuller, S.N., Groban, E.S., Hensley, L.A., O'Brien, T.C., Shah, A., Tierney, J.T., Tomm, L.L., O'Gara, T.M., Goranov, A.I., Grossman, A.D., Lovett, C.M., 2005. Genetic composition of the *Bacillus subtilis* SOS system. *J. Bacteriol.* 187, 7655–7666. <https://doi.org/10.1128/JB.187.22.7655-7666.2005>
- Bae, J., Oh, E., Jeon, B., 2014. Enhanced Transmission of Antibiotic Resistance in *Campylobacter jejuni* Biofilms by Natural Transformation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7573–7575. <https://doi.org/10.1128/AAC.04066-14>
- Bagge, N., Hentzer, M., Andersen, J.B., Ciofu, O., Givskov, M., Høiby, N., 2004. Dynamics and spatial distribution of beta-lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 1168–1174. <https://doi.org/10.1128/aac.48.4.1168-1174.2004>
- Baharoglu, Z., Bikard, D., Mazel, D., 2010. Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation. *PLoS Genet.* 6, e1001165. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001165>
- Baharoglu, Z., Krin, E., Mazel, D., 2013. RpoS plays a central role in the SOS induction by sub-lethal aminoglycoside concentrations in *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet.* 9, e1003421. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003421>
- Baharoglu, Z., Krin, E., Mazel, D., 2012. Connecting Environment and Genome Plasticity in the Characterization of Transformation-Induced SOS Regulation and Carbon Catabolite Control of the *Vibrio cholerae* Integron Integrase. *J. Bacteriol.* 194, 1659–1667. <https://doi.org/10.1128/JB.05982-11>
- Baharoglu, Z., Mazel, D., 2014. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 1126. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12077>
- Baharoglu, Z., Mazel, D., 2011. *Vibrio cholerae* triggers SOS and mutagenesis in response to a wide range of antibiotics: a route towards multiresistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 2438–2441. <https://doi.org/10.1128/AAC.01549-10>
- Bailey, J.K., Pinyon, J.L., Anantham, S., Hall, R.M., 2010. Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: a reservoir for antibiotic-resistance determinants. *J. Med. Microbiol.* 59, 1331–1339. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.022475-0>
- Baker, S.J., Payne, D.J., Rappuoli, R., De Gregorio, E., 2018. Technologies to address antimicrobial resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 12887–12895. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717160115>

- Balaban, N.Q., Helaine, S., Lewis, K., Ackermann, M., Aldridge, B., Andersson, D.I., Brynildsen, M.P., Bumann, D., Camilli, A., Collins, J.J., Dehio, C., Fortune, S., Ghigo, J.-M., Hardt, W.-D., Harms, A., Heinemann, M., Hung, D.T., Jenal, U., Levin, B.R., Michiels, J., Storz, G., Tan, M.-W., Tenson, T., Van Melderen, L., Zinkernagel, A., 2019. Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 441–448. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0196-3>
- Balsalobre, C., Johansson, J., Uhlin, B.E., 2006. Cyclic AMP-dependent osmoregulation of *crp* gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188, 5935–5944. <https://doi.org/10.1128/JB.00235-06>
- Barbolla, R., Catalano, M., Orman, B.E., Famiglietti, A., Vay, C., Smayevsky, J., Centrón, D., Piñeiro, S.A., 2004. Class 1 integrons increase trimethoprim-sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 666–669. <https://doi.org/10.1128/aac.48.2.666-669.2004>
- Barker, A., Clark, C.A., Manning, P.A., 1994. Identification of VCR, a repeated sequence associated with a locus encoding a hemagglutinin in *Vibrio cholerae* O1. *J. Bacteriol.* 176, 5450–5458. <https://doi.org/10.1128/jb.176.17.5450-5458.1994>
- Barker, M.M., Gaal, T., Gourse, R.L., 2001a. Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. II. Models for positive control based on properties of RNAP mutants and competition for RNAP. *J. Mol. Biol.* 305, 689–702. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4328>
- Barker, M.M., Gaal, T., Josaitis, C.A., Gourse, R.L., 2001b. Mechanism of regulation of transcription initiation by ppGpp. I. Effects of ppGpp on transcription initiation in vivo and in vitro. *J. Mol. Biol.* 305, 673–688. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4327>
- Barlow, R.S., Gobius, K.S., 2006. Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 1133–1138. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl423>
- Barraud, O., Badell, E., Denis, F., Guiso, N., Ploy, M.-C., 2011. Antimicrobial Drug Resistance in *Corynebacterium diphtheriae mitis*. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 2078–2080. <https://doi.org/10.3201/eid1711.110282>
- Barraud, O., François, B., Chainier, D., Vignaud, J., Ploy, M.-C., 2014. Value of integron detection for predicting antibiotic resistance in patients with Gram-negative septicaemia. *Int. J. Antimicrob. Agents* 44, 351–353. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.06.008>
- Barraud, O., Isnard, C., Lienhard, R., Guérin, F., Couvé-Deacon, E., Martin, C., Cattoir, V., Ploy, M.C., 2016. Sulphonamide resistance associated with integron derivative Tn6326 in *Actinotignum schaalii*. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2670–2671. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw197>
- Barraud, O., Peyre, M., Couvé-Deacon, E., Chainier, D., Bahans, C., Guignonis, V., Ploy, M.-C., Bedu, A., Garnier, F., 2018. Antibiotic Resistance Acquisition in the First Week of Life. *Front. Microbiol.* 9, 1467. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01467>
- Barraud, O., Robert, A., Laval, L., Ruimy, R., Morquin, D., Boyer, L., Lamy, B., 2020. It takes two to tango: two *Aeromonas* isolates combine virulence and multidrug resistance in flap infection following leech therapy. *Clin. Microbiol. Infect.* 26, 793–794. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.12.021>
- Barrett, T.C., Mok, W.W.K., Murawski, A.M., Brynildsen, M.P., 2019. Enhanced antibiotic resistance development from fluoroquinolone persists after a single exposure to antibiotic. *Nat. Commun.* 10, 1177. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09058-4>

- Battesti, A., Bouveret, E., 2006. Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Mol. Microbiol.* 62, 1048–1063. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05442.x>
- Beaber, J.W., Hochhut, B., Waldor, M.K., 2004. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 427, 72–74. <https://doi.org/10.1038/nature02241>
- Bearson, B.L., Brunelle, B.W., 2015. Fluoroquinolone induction of phage-mediated gene transfer in multidrug-resistant *Salmonella*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 46, 201–204. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.04.008>
- Bellio, P., Di Pietro, L., Mancini, A., Piovano, M., Nicoletti, M., Brisdelli, F., Tondi, D., Cendron, L., Franceschini, N., Amicosante, G., Perilli, M., Celenza, G., 2017. SOS response in bacteria: Inhibitory activity of lichen secondary metabolites against *Escherichia coli* RecA protein. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* 29, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.04.001>
- Beloin, C., Roux, A., Ghigo, J.M., 2008. *Escherichia coli* biofilms. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 322, 249–289. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_12
- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagensen, J.A.J., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B., Ghigo, J.-M., 2004. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol. Microbiol.* 51, 659–674. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03865.x>
- Bernier, S.P., Lebeaux, D., DeFrancesco, A.S., Valomon, A., Soubigou, G., Coppée, J.-Y., Ghigo, J.-M., Beloin, C., 2013. Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin. *PLoS Genet.* 9, e1003144. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003144>
- Betteridge, T., Partridge, S.R., Iredell, J.R., Stokes, H.W., 2011. Genetic context and structural diversity of class 1 integrons from human commensal bacteria in a hospital intensive care unit. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3939–3943. <https://doi.org/10.1128/AAC.01831-10>
- Bisht, K., Wakeman, C.A., 2019. Discovery and Therapeutic Targeting of Differentiated Biofilm Subpopulations. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01908>
- Biskri, L., Mazel, D., 2003. Erythromycin esterase gene *ere(A)* is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3326–3331. <https://doi.org/10.1128/aac.47.10.3326-3331.2003>
- Bissonnette, L., Champetier, S., Buisson, J.P., Roy, P.H., 1991. Characterization of the nonenzymatic chloramphenicol resistance (*cmlA*) gene of the *In4* integron of Tn1696: similarity of the product to transmembrane transport proteins. *J. Bacteriol.* 173, 4493–4502. <https://doi.org/10.1128/jb.173.14.4493-4502.1991>
- Bissonnette, L., Roy, P.H., 1992. Characterization of *In0* of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 174, 1248–1257. <https://doi.org/10.1128/jb.174.4.1248-1257.1992>
- Bjarnsholt, T., 2013. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS. Suppl.* 1–51. <https://doi.org/10.1111/apm.12099>
- Bjarnsholt, T., Jensen, P.Ø., Burmølle, M., Hentzer, M., Haagensen, J.A.J., Hougen, H.P., Calum, H., Madsen, K.G., Moser, C., Molin, S., Høiby, N., Givskov, M., 2005. *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiol. Read. Engl.* 151, 373–383. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27463-0>

- Blázquez, J., Rodríguez-Beltrán, J., Matic, I., 2018. Antibiotic-Induced Genetic Variation: How It Arises and How It Can Be Prevented. *Annu. Rev. Microbiol.* 72, 209–230. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062139>
- Boles, B.R., Singh, P.K., 2008. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 12503–12508. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801499105>
- Bonner, R.F., Emmert-Buck, M., Cole, K., Pohida, T., Chuaqui, R., Goldstein, S., Liotta, L.A., 1997. Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science* 278, 1481,1483. <https://doi.org/10.1126/science.278.5342.1481>
- Borriello, G., Richards, L., Ehrlich, G.D., Stewart, P.S., 2006. Arginine or nitrate enhances antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 382–384. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.382-384.2006>
- Borriello, G., Werner, E., Roe, F., Kim, A.M., Ehrlich, G.D., Stewart, P.S., 2004. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 2659–2664. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.7.2659-2664.2004>
- Botelho, J., Grosso, F., Peixe, L., 2019. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* – Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist. Updat.* 44, 100640. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2019.07.002>
- Bougdour, A., Gottesman, S., 2007. ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 12896–12901. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705561104>
- Bouvier, M., Demarre, G., Mazel, D., 2005. Integron cassette insertion: a recombination process involving a folded single strand substrate. *EMBO J.* 24, 4356–4367. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600898>
- Bouvier, M., Ducos-Galand, M., Loot, C., Bikard, D., Mazel, D., 2009. Structural features of single-stranded integron cassette attC sites and their role in strand selection. *PLoS Genet.* 5, e1000632. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000632>
- Brauner, A., Fridman, O., Gefen, O., Balaban, N.Q., 2016. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 320–330. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.34>
- Bridges, B.A., 2005. Error-prone DNA repair and translesion DNA synthesis. II: The inducible SOS hypothesis. *DNA Repair* 4, 725–726, 739. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.12.009>
- Brown, A., Fernández, I.S., Gordiyenko, Y., Ramakrishnan, V., 2016. Ribosome-dependent activation of stringent control. *Nature* 534, 277–280. <https://doi.org/10.1038/nature17675>
- Brown, D.R., Barton, G., Pan, Z., Buck, M., Wigneshweraraj, S., 2014. Nitrogen stress response and stringent response are coupled in *Escherichia coli*. *Nat. Commun.* 5, 4115. <https://doi.org/10.1038/ncomms5115>
- Buelow, E., Rico, A., Gaschet, M., Lourenço, J., Kennedy, S.P., Wiest, L., Ploy, M.-C., Dagot, C., 2020. Hospital discharges in urban sanitation systems: Long-term monitoring of wastewater resistome and microbiota in relationship to their eco-exposome. *Water Res.* X 7. <https://doi.org/10.1016/j.wroa.2020.100045>
- Burr, T., Mitchell, J., Kolb, A., Minchin, S., Busby, S., 2000. DNA sequence elements located immediately upstream of the -10 hexamer in *Escherichia coli* promoters: a systematic study. *Nucleic Acids Res.* 28, 1864–1870. <https://doi.org/10.1093/nar/28.9.1864>

- Butala, M., Klose, D., Hodnik, V., Rems, A., Podlesek, Z., Klare, J.P., Anderluh, G., Busby, S.J.W., Steinhoff, H.-J., Zgur-Bertok, D., 2011. Interconversion between bound and free conformations of LexA orchestrates the bacterial SOS response. *Nucleic Acids Res.* 39, 6546–6557. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr265>
- Butala, M., Žgur-Bertok, D., Busby, S.J.W., 2008. The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 82. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8378-6>
- Bykowski, T., Sirko, A., 1998. Selected phenotypes of ihf mutants of *Escherichia coli*. *Biochimie* 80, 987–1001.
- Cagle, C.A., Shearer, J.E.S., Summers, A.O., 2011. Regulation of the integrase and cassette promoters of the class 1 integron by nucleoid-associated proteins. *Microbiol. Read. Engl.* 157, 2841–2853. <https://doi.org/10.1099/mic.0.046987-0>
- Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Guerin, É., Da Re, S., González-Zorn, B., Ploy, M.-C., Barbé, J., Mazel, D., Erill, I., 2011. Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons. *Mob. DNA* 2, 6. <https://doi.org/10.1186/1759-8753-2-6>
- Cashel, M., Gallant, J., 1969. Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature* 221, 838–841. <https://doi.org/10.1038/221838a0>
- Cashel, M., Kalbacher, B., 1970. The Control of Ribonucleic Acid Synthesis in *Escherichia coli*: V. CHARACTERIZATION OF A NUCLEOTIDE ASSOCIATED WITH THE STRINGENT RESPONSE. *J. Biol. Chem.* 245, 2309–2318. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63153-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63153-9)
- Ceri, H., Olson, M.E., Stremick, C., Read, R.R., Morck, D., Buret, A., 1999. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1771–1776.
- Cesareni, G., Helmer-Citterich, M., Castagnoli, L., 1991. Control of ColE1 plasmid replication by antisense RNA. *Trends Genet. TIG* 7, 230–235. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(91\)90370-6](https://doi.org/10.1016/0168-9525(91)90370-6)
- Chainier, D., Barraud, O., Masson, G., Couve-Deacon, E., François, B., Couquet, C.-Y., Ploy, M.-C., 2017. Integron Digestive Carriage in Human and Cattle: A “One Health” Cultivation-Independent Approach. *Front. Microbiol.* 8, 1891. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01891>
- Charpentier, X., Kay, E., Schneider, D., Shuman, H.A., 2011. Antibiotics and UV radiation induce competence for natural transformation in *Legionella pneumophila*. *J. Bacteriol.* 193, 1114–1121. <https://doi.org/10.1128/JB.01146-10>
- Chau, N.Y.E., Ahmad, S., Whitney, J.C., Coombes, B.K., 2021. Emerging and divergent roles of pyrophosphorylated nucleotides in bacterial physiology and pathogenesis. *PLoS Pathog.* 17, e1009532. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009532>
- Chiang, W.-C., Nilsson, M., Jensen, P.Ø., Høiby, N., Nielsen, T.E., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T., 2013. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 2352–2361. <https://doi.org/10.1128/AAC.00001-13>
- Chiaramello, A.E., Zyskind, J.W., 1990. Coupling of DNA replication to growth rate in *Escherichia coli*: a possible role for guanosine tetraphosphate. *J. Bacteriol.* 172, 2013–2019. <https://doi.org/10.1128/jb.172.4.2013-2019.1990>
- Ciofu, O., 2003. *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal beta-lactamase in patients with cystic fibrosis and chronic lung infection. Mechanism of antibiotic resistance and target of the humoral immune response. *APMIS. Suppl.* 1–47.

- Cirz, R.T., Chin, J.K., Andes, D.R., de Crécy-Lagard, V., Craig, W.A., Romesberg, F.E., 2005. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS Biol.* 3, e176. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030176>
- Cirz, R.T., O'Neill, B.M., Hammond, J.A., Head, S.R., Romesberg, F.E., 2006. Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin. *J. Bacteriol.* 188, 7101–7110. <https://doi.org/10.1128/JB.00807-06>
- Cocchi, S., Grasselli, E., Gutacker, M., Benagli, C., Convert, M., Piffaretti, J.-C., 2007. Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50, 126–132. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00242.x>
- Collis, C.M., Hall, R.M., 2004. Comparison of the structure-activity relationships of the integron-associated recombination sites attI3 and attI1 reveals common features. *Microbiol. Read. Engl.* 150, 1591–1601. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26596-0>
- Collis, C.M., Hall, R.M., 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39, 155–162. <https://doi.org/10.1128/aac.39.1.155>
- Collis, C.M., Hall, R.M., 1992. Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol. Microbiol.* 6, 2875–2885. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01467.x>
- Collis, C.M., Kim, M.-J., Partridge, S.R., Stokes, H.W., Hall, R.M., 2002a. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J. Bacteriol.* 184, 3017–3026. <https://doi.org/10.1128/jb.184.11.3017-3026.2002>
- Collis, C.M., Kim, M.-J., Stokes, H.W., Hall, R.M., 2002b. Integron-encoded IntI integrases preferentially recognize the adjacent cognate attI site in recombination with a 59-be site. *Mol. Microbiol.* 46, 1415–1427. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03260.x>
- Collis, C.M., Recchia, G.D., Kim, M.J., Stokes, H.W., Hall, R.M., 2001. Efficiency of recombination reactions catalyzed by class 1 integron integrase IntI1. *J. Bacteriol.* 183, 2535–2542. <https://doi.org/10.1128/JB.183.8.2535-2542.2001>
- Cook, L.C., Dunny, G.M., 2013. Effects of biofilm growth on plasmid copy number and expression of antibiotic resistance genes in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 1850–1856. <https://doi.org/10.1128/AAC.02010-12>
- Copur-Cicek, A., Ozgumus, O.B., Saral, A., Sandalli, C., 2014. Antimicrobial resistance patterns and integron carriage of *Escherichia coli* isolates causing community-acquired infections in Turkey. *Ann. Lab. Med.* 34, 139–144. <https://doi.org/10.3343/alm.2014.34.2.139>
- Correia, M., Boavida, F., Grosso, F., Salgado, M.J., Lito, L.M., Cristino, J.M., Mendo, S., Duarte, A., 2003. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2838–2843. <https://doi.org/10.1128/aac.47.9.2838-2843.2003>
- Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, K.J., 1978. How bacteria stick. *Sci. Am.* 238, 86–95. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0178-86>
- Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P.O., Hanawalt, P.C., 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* 158, 41–64.
- Couvé-Deacon, E., Jové, T., Afouda, P., Barraud, O., Tilloy, V., Scaon, E., Hervé, B., Burucoa, C., Kempf, M., Marcos, J.Y., Ploy, M.-C., Garnier, F., 2019. Class 1 integrons in *Acinetobacter baumannii*: a weak expression of gene cassettes to counterbalance the

- lack of LexA-driven integrase repression. *Int. J. Antimicrob. Agents* 53, 491–499. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.012>
- Cox, M.M., 2007. Motoring along with the bacterial RecA protein. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 127–138. <https://doi.org/10.1038/nrm2099>
- Craggs, T.D., 2009. Green fluorescent protein: structure, folding and chromophore maturation. *Chem. Soc. Rev.* 38, 2865–2875. <https://doi.org/10.1039/b903641p>
- Craig, N.L., Roberts, J.W., 1981. Function of nucleoside triphosphate and polynucleotide in *Escherichia coli* recA protein-directed cleavage of phage lambda repressor. *J. Biol. Chem.* 256, 8039–8044.
- Crane John K., Alvarado Cassandra L., Sutton Mark D., 2021. Role of the SOS Response in the Generation of Antibiotic Resistance In Vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 65, e00013-21. <https://doi.org/10.1128/AAC.00013-21>
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.-M., Brenner, S.E., 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14, 1188–1190. <https://doi.org/10.1101/gr.849004>
- da Fonseca, É.L., Vicente, A.C.P., 2012. Functional characterization of a Cassette-specific promoter in the class 1 integron-associated qnrVC1 gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 3392–3394. <https://doi.org/10.1128/AAC.00113-12>
- Da Re, S., Garnier, F., Guérin, E., Campoy, S., Denis, F., Ploy, M.-C., 2009. The SOS response promotes qnrB quinolone-resistance determinant expression. *EMBO Rep.* 10, 929–933. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.99>
- Da Re, S., Le Quéré, B., Ghigo, J.-M., Beloin, C., 2007. Tight Modulation of *Escherichia coli* Bacterial Biofilm Formation through Controlled Expression of Adhesion Factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3391–3403. <https://doi.org/10.1128/AEM.02625-06>
- Dar, D., Dar, N., Cai, L., Newman, D.K., 2021. Spatial transcriptomics of planktonic and sessile bacterial populations at single-cell resolution. *Science* 373. <https://doi.org/10.1126/science.abi4882>
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>
- Davies, D., 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 114–122. <https://doi.org/10.1038/nrd1008>
- Davis, K.M., Isberg, R.R., 2016. Defining heterogeneity within bacterial populations via single cell approaches. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 38, 782–790. <https://doi.org/10.1002/bies.201500121>
- de Beer, D., Stoodley, P., Roe, F., Lewandowski, Z., 1994. Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol. Bioeng.* 43, 1131–1138. <https://doi.org/10.1002/bit.260431118>
- de la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Haney, E.F., Straus, S.K., Hancock, R.E.W., 2014. Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *PLoS Pathog.* 10, e1004152. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004152>
- de la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Mansour, S.C., Reckseidler-Zenteno, S.L., Hernández, D., Brackman, G., Coenye, T., Hancock, R.E.W., 2015. D-enantiomeric peptides that eradicate wild-type and multidrug-resistant biofilms and protect against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Chem. Biol.* 22, 196–205. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.01.002>

- Del Val, E., Nasser, W., Abaibou, H., Reverchon, S., 2019. RecA and DNA recombination: a review of molecular mechanisms. *Biochem. Soc. Trans.* 47, 1511–1531. <https://doi.org/10.1042/BST20190558>
- Demarre, G., Prudent, V., Schenk, H., Rousseau, E., Bringer, M.-A., Barnich, N., Tran Van Nhieu, G., Rimsky, S., De Monte, S., Espéli, O., 2019. The Crohn's disease-associated *Escherichia coli* strain LF82 relies on SOS and stringent responses to survive, multiply and tolerate antibiotics within macrophages. *PLoS Pathog.* 15, e1008123. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008123>
- Denapoli, J., Tehranchi, A.K., Wang, J.D., 2013. Dose-dependent reduction of replication elongation rate by (p)ppGpp in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 88, 93–104. <https://doi.org/10.1111/mmi.12172>
- Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Bian, H., Li, Y., Yu, G., 2015. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 14, 45. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0100-6>
- Deter, H.S., Hossain, T., Butzin, N.C., 2021. Antibiotic tolerance is associated with a broad and complex transcriptional response in *E. coli*. *Sci. Rep.* 11, 6112. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85509-7>
- Dhavan, G.M., Crothers, D.M., Chance, M.R., Brenowitz, M., 2002. Concerted binding and bending of DNA by *Escherichia coli* integration host factor. *J. Mol. Biol.* 315, 1027–1037. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5303>
- DiRusso, C.C., Nyström, T., 1998. The fats of *Escherichia coli* during infancy and old age: regulation by global regulators, alarmones and lipid intermediates. *Mol. Microbiol.* 27, 1–8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00645.x>
- Dolejšká, M., Bierošová, B., Kohoutová, L., Literák, I., Čížek, A., 2009. Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. *J. Appl. Microbiol.* 106, 1941–1950. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04155.x>
- Donlan, R.M., 2001. Biofilms and device-associated infections. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 277–281.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- Dordel, J., Kim, C., Chung, M., Pardos de la Gándara, M., Holden, M.T.J., Parkhill, J., de Lencastre, H., Bentley, S.D., Tomasz, A., 2014. Novel Determinants of Antibiotic Resistance: Identification of Mutated Loci in Highly Methicillin-Resistant Subpopulations of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *mBio* 5, e01000-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.01000-13>
- Doroshenko, N., Tseng, B.S., Howlin, R.P., Deacon, J., Wharton, J.A., Thurner, P.J., Gilmore, B.F., Parsek, M.R., Stoodley, P., 2014. Extracellular DNA impedes the transport of vancomycin in *Staphylococcus epidermidis* biofilms preexposed to subinhibitory concentrations of vancomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7273–7282. <https://doi.org/10.1128/AAC.03132-14>
- Dörr, T., Lewis, K., Vulić, M., 2009. SOS Response Induces Persistence to Fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genet.* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000760>
- Dörr, T., Vulić, M., Lewis, K., 2010. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol.* 8, e1000317. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000317>

- Drepper, T., Eggert, T., Circolone, F., Heck, A., Krauß, U., Guterl, J.-K., Wendorff, M., Losi, A., Gärtner, W., Jaeger, K.-E., 2007. Reporter proteins for in vivo fluorescence without oxygen. *Nat. Biotechnol.* 25, 443–445. <https://doi.org/10.1038/nbt1293>
- Dri, A.M., Moreau, P.L., 1993. Phosphate starvation and low temperature as well as ultraviolet irradiation transcriptionally induce the *Escherichia coli* LexA-controlled gene *sfiA*. *Mol. Microbiol.* 8, 697–706. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01613.x>
- Durfee, T., Hansen, A.-M., Zhi, H., Blattner, F.R., Jin, D.J., 2008. Transcription Profiling of the Stringent Response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190, 1084–1096. <https://doi.org/10.1128/JB.01092-07>
- Dutta, N.K., Klinkenberg, L.G., Vazquez, M.-J., Segura-Carro, D., Colmenarejo, G., Ramon, F., Rodriguez-Miquel, B., Mata-Cantero, L., Porras-De Francisco, E., Chuang, Y.-M., Rubin, H., Lee, J.J., Eoh, H., Bader, J.S., Perez-Herran, E., Mendoza-Losana, A., Karakousis, P.C., 2019. Inhibiting the stringent response blocks *Mycobacterium tuberculosis* entry into quiescence and reduces persistence. *Sci. Adv.* 5, eaav2104. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav2104>
- Dwyer, D.J., Collins, J.J., Walker, G.C., 2015. Unraveling the physiological complexities of antibiotic lethality. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 55, 313–332. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124712>
- Emmert-Buck, M.R., Bonner, R.F., Smith, P.D., Chuaqui, R.F., Zhuang, Z., Goldstein, S.R., Weiss, R.A., Liotta, L.A., 1996. Laser capture microdissection. *Science* 274, 998–1001. <https://doi.org/10.1126/science.274.5289.998>
- Erill, I., Campoy, S., Barbé, J., 2007. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 637–656. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00082.x>
- Escudero, J.A., Loot, C., Mazel, D., 2018. Integrons as Adaptive Devices, in: Rampelotto, P.H. (Ed.), *Molecular Mechanisms of Microbial Evolution, Grand Challenges in Biology and Biotechnology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 199–239. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69078-0_9
- Escudero*, J.A., Loot*, C., Nivina, A., Mazel, D., 2015. The Integron: Adaptation On Demand. *Microbiol. Spectr.* 3. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MDNA3-0019-2014>
- Escudero, J.A., Loot, C., Parissi, V., Nivina, A., Bouchier, C., Mazel, D., 2016. Unmasking the ancestral activity of integron integrases reveals a smooth evolutionary transition during functional innovation. *Nat. Commun.* 7, 10937. <https://doi.org/10.1038/ncomms10937>
- Fernández-Coll, L., Maciag-Dorszynska, M., Tailor, K., Vadia, S., Levin, P.A., Szalewska-Palasz, A., Cashel, M., 2020. The Absence of (p)ppGpp Renders Initiation of *Escherichia coli* Chromosomal DNA Synthesis Independent of Growth Rates. *mBio* 11, e03223-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.03223-19>
- Ferullo, D.J., Lovett, S.T., 2008. The stringent response and cell cycle arrest in *Escherichia coli*. *PLoS Genet.* 4, e1000300. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000300>
- Fischbach, M.A., Walsh, C.T., 2009. Antibiotics For Emerging Pathogens. *Science* 325, 1089–1093. <https://doi.org/10.1126/science.1176667>
- Fornelos, N., Browning, D.F., Butala, M., 2016. The Use and Abuse of LexA by Mobile Genetic Elements. *Trends Microbiol., Special Issue: Microbial Endurance* 24, 391–401. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.009>
- Francia, M.V., Zabala, J.C., Cruz, F. de la, Lobo, J.M.G., 1999. The *Int11* Integron Integrase Preferentially Binds Single-Stranded DNA of the *attC* Site. *J. Bacteriol.* 181, 6844–6849.

- FRANKLIN, M.J., CHANG, C., AKIYAMA, T., BOTHNER, B., 2015. New Technologies for Studying Biofilms. *Microbiol. Spectr.* 3. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0016-2014>
- Gaca, A.O., Kajfasz, J.K., Miller, J.H., Liu, K., Wang, J.D., Abranches, J., Lemos, J.A., 2013. Basal Levels of (p)ppGpp in *Enterococcus faecalis*: the Magic beyond the Stringent Response. *mBio* 4. <https://doi.org/10.1128/mBio.00646-13>
- Galinier, A., 2018. [Carbon catabolite repression or how bacteria choose their favorite sugars]. *Med. Sci.* MS 34, 531–539. <https://doi.org/10.1051/medsci/20183406012>
- Gan, W., Guan, Z., Liu, J., Gui, T., Shen, K., Manley, J.L., Li, X., 2011. R-loop-mediated genomic instability is caused by impairment of replication fork progression. *Genes Dev.* 25, 2041–2056. <https://doi.org/10.1101/gad.17010011>
- Gao, W., Chua, K., Davies, J.K., Newton, H.J., Seemann, T., Harrison, P.F., Holmes, N.E., Rhee, H.-W., Hong, J.-I., Hartland, E.L., Stinear, T.P., Howden, B.P., 2010. Two Novel Point Mutations in Clinical *Staphylococcus aureus* Reduce Linezolid Susceptibility and Switch on the Stringent Response to Promote Persistent Infection. *PLoS Pathog.* 6, e1000944. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000944>
- Gasc, A.M., Sicard, N., Claverys, J.P., Sicard, A.M., 1980. Lack of SOS repair in *Streptococcus pneumoniae*. *Mutat. Res.* 70, 157–165. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(80\)90155-4](https://doi.org/10.1016/0027-5107(80)90155-4)
- Gassama Sow, A., Aïdara-Kane, A., Barraud, O., Gatet, M., Denis, F., Ploy, M.C., 2010. High prevalence of trimethoprim-resistance cassettes in class 1 and 2 integrons in Senegalese *Shigella* spp isolates. *J. Infect. Dev. Ctries.* 4, 207–212. <https://doi.org/10.3855/jidc.583>
- Gaze, W.H., Abdouislam, N., Hawkey, P.M., Wellington, E.M.H., 2005. Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 1802–1807. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1802-1807.2005>
- Gaze, W.H., Zhang, L., Abdouislam, N.A., Hawkey, P.M., Calvo-Bado, L., Royle, J., Brown, H., Davis, S., Kay, P., Boxall, A.B.A., Wellington, E.M.H., 2011. Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *ISME J.* 5, 1253–1261. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.15>
- Germain, E., Castro-Roa, D., Zenkin, N., Gerdes, K., 2013. Molecular mechanism of bacterial persistence by HipA. *Mol. Cell* 52, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.045>
- Ghaly, T.M., Chow, L., Asher, A.J., Waldron, L.S., Gillings, M.R., 2017. Evolution of class 1 integrons: Mobilization and dispersal via food-borne bacteria. *PloS One* 12, e0179169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179169>
- Ghaly, T.M., Geoghegan, J.L., Alroy, J., Gillings, M.R., 2019. High diversity and rapid spatial turnover of integron gene cassettes in soil. *Environ. Microbiol.* 21, 1567–1574. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14551>
- Ghigo, J.-M., 2001. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* 412, 442–445. <https://doi.org/10.1038/35086581>
- Giese, K.C., Michalowski, C.B., Little, J.W., 2008. RecA-Dependent Cleavage of LexA Dimers. *J. Mol. Biol.* 377, 148–161. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.12.025>
- Gillings, M., Boucher, Y., Labbate, M., Holmes, A., Krishnan, S., Holley, M., Stokes, H.W., 2008. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* 190, 5095–5100. <https://doi.org/10.1128/JB.00152-08>
- Gillings, M.R., 2014. Integrons: past, present, and future. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 78, 257–277. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00056-13>

- Gillings, M.R., Gaze, W.H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J.M., Zhu, Y.-G., 2015. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *ISME J.* 9, 1269–1279. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.226>
- Goldstein, C., Lee, M.D., Sanchez, S., Hudson, C., Phillips, B., Register, B., Grady, M., Liebert, C., Summers, A.O., White, D.G., Maurer, J.J., 2001. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 723–726. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.723-726.2001>
- Gordon, C.A., Hodges, N.A., Marriott, C., 1988. Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* 22, 667–674. <https://doi.org/10.1093/jac/22.5.667>
- Gosset, G., Zhang, Z., Nayyar, S., Cuevas, W.A., Saier, M.H., 2004. Transcriptome analysis of Crp-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 186, 3516–3524. <https://doi.org/10.1128/JB.186.11.3516-3524.2004>
- Gourse, R.L., Chen, A.Y., Gopalkrishnan, S., Sanchez-Vazquez, P., Myers, A., Ross, W., 2018. Transcriptional Responses to ppGpp and DksA. *Annu. Rev. Microbiol.* 72, 163–184. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062444>
- Gravel, A., Fournier, B., Roy, P.H., 1998. DNA complexes obtained with the integron integrase IntI1 at the attI1 site. *Nucleic Acids Res.* 26, 4347–4355. <https://doi.org/10.1093/nar/26.19.4347>
- Green, M.H., Donch, J., Greenberg, J., 1969. An immediate effect of inhibition of DNA synthesis on cell division in a Lon strain of *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 8, 409–411. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(69\)90018-9](https://doi.org/10.1016/0027-5107(69)90018-9)
- Grindley, N.D.F., Whiteson, K.L., Rice, P.A., 2006. Mechanisms of site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 567–605. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073908>
- Gropp, M., Strausz, Y., Gross, M., Glaser, G., 2001. Regulation of *Escherichia coli* RelA requires oligomerization of the C-terminal domain. *J. Bacteriol.* 183, 570–579. <https://doi.org/10.1128/JB.183.2.570-579.2001>
- Gruenig, M.C., Renzette, N., Long, E., Chitteni-Pattu, S., Inman, R.B., Cox, M.M., Sandler, S.J., 2008. RecA-mediated SOS induction requires an extended filament conformation but no ATP hydrolysis. *Mol. Microbiol.* 69, 1165–1179. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06341.x>
- Guerin, É., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Re, S.D., Gonzalez-Zorn, B., Barbé, J., Ploy, M.-C., Mazel, D., 2009. The SOS Response Controls Integron Recombination. *Science* 324, 1034–1034. <https://doi.org/10.1126/science.1172914>
- Guérin, E., Jové, T., Tabesse, A., Mazel, D., Ploy, M.-C., 2011. High-level gene cassette transcription prevents integrase expression in class 1 integrons. *J. Bacteriol.* 193, 5675–5682. <https://doi.org/10.1128/JB.05246-11>
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., Andersson, D.I., 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog.* 7, e1002158. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002158>
- Gutierrez, A., Laureti, L., Crussard, S., Abida, H., Rodríguez-Rojas, A., Blázquez, J., Baharoglu, Z., Mazel, D., Darfeuille, F., Vogel, J., Matic, I., 2013. β -lactam antibiotics promote bacterial mutagenesis via an RpoS-mediated reduction in replication fidelity. *Nat. Commun.* 4, 1610. <https://doi.org/10.1038/ncomms2607>

- Hall, C.W., Mah, T.-F., 2017. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 276–301. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>
- Hall, R.M., Brookes, D.E., Stokes, H.W., 1991. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol. Microbiol.* 5, 1941–1959. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb00817.x>
- Hall, R.M., Collis, C.M., 1998. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist. Updat.* 1, 109–119. [https://doi.org/10.1016/S1368-7646\(98\)80026-5](https://doi.org/10.1016/S1368-7646(98)80026-5)
- Hall, R.M., Collis, C.M., Kim, M.-J., Partridge, S.R., Recchia, G.D., Stokes, H.W., 1999. Mobile Gene Cassettes and Integrons in Evolution. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 870, 68–80. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb08866.x>
- Haluzi, H., Goitein, D., Koby, S., Mendelson, I., Teff, D., Mengeritsky, G., Giladi, H., Oppenheim, A.B., 1991. Genes coding for integration host factor are conserved in gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* 173, 6297–6299. <https://doi.org/10.1128/jb.173.19.6297-6299.1991>
- Hanau-Berçot, B., Podglajen, I., Casin, I., Collatz, E., 2002. An intrinsic control element for translational initiation in class 1 integrons. *Mol. Microbiol.* 44, 119–130. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02843.x>
- Hansson, K., Sköld, O., Sundström, L., 1997. Non-palindromic attL sites of integrons are capable of site-specific recombination with one another and with secondary targets. *Mol. Microbiol.* 26, 441–453. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.5401964.x>
- Hansson, K., Sundström, L., Pelletier, A., Roy, P.H., 2002. IntI2 integron integrase in Tn7. *J. Bacteriol.* 184, 1712–1721. <https://doi.org/10.1128/jb.184.6.1712-1721.2002>
- Hare, J.M., Adhikari, S., Lambert, K.V., Hare, A.E., Grice, A.N., 2012. The *Acinetobacter* regulatory UmuDAb protein cleaves in response to DNA damage with chimeric LexA/UmuD characteristics. *FEMS Microbiol. Lett.* 334, 57–65. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02618.x>
- Harms, K., Starikova, I., Johnsen, P.J., 2013. Costly Class-1 integrons and the domestication of the the functional integrase. *Mob. Genet. Elem.* 3, e24774. <https://doi.org/10.4161/mge.24774>
- Harrison, J.J., Wade, W.D., Akierman, S., Vacchi-Suzzi, C., Stremick, C.A., Turner, R.J., Ceri, H., 2009. The chromosomal toxin gene *yafQ* is a determinant of multidrug tolerance for *Escherichia coli* growing in a biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 2253–2258. <https://doi.org/10.1128/AAC.00043-09>
- Hartman, B.J., Tomasz, A., 1986. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 29, 85–92. <https://doi.org/10.1128/AAC.29.1.85>
- Haseltine, W.A., Block, R., 1973. Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 1564–1568. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.5.1564>
- Heacock-Kang, Y., Sun, Z., Zarzycki-Siek, J., McMillan, I.A., Norris, M.H., Bluhm, A.P., Cabanas, D., Fogen, D., Vo, H., Donachie, S.P., Borlee, B.R., Sibley, C.D., Lewenza, S., Schurr, M.J., Schweizer, H.P., Hoang, T.T., 2017. Spatial transcriptomes within the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture. *Mol. Microbiol.* 106, 976–985. <https://doi.org/10.1111/mmi.13863>

- Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Umayam, L., Gill, S.R., Nelson, K.E., Read, T.D., Tettelin, H., Richardson, D., Ermolaeva, M.D., Vamathevan, J., Bass, S., Qin, H., Dragoi, I., Sellers, P., McDonald, L., Utterback, T., Fleishmann, R.D., Nierman, W.C., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Colwell, R.R., Mekalanos, J.J., Venter, J.C., Fraser, C.M., 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406, 477–483. <https://doi.org/10.1038/35020000>
- Helaine, S., Cheverton, A.M., Watson, K.G., Faure, L.M., Matthews, S.A., Holden, D.W., 2014. Internalization of *Salmonella* by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. *Science* 343, 204–208. <https://doi.org/10.1126/science.1244705>
- Henestrosa, A.R.F. de, Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J.J., Ohmori, H., Woodgate, R., 2000. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 35, 1560–1572. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01826.x>
- Hennequin, C., Aumeran, C., Robin, F., Traore, O., Forestier, C., 2012. Antibiotic resistance and plasmid transfer capacity in biofilm formed with a CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 2123–2130. <https://doi.org/10.1093/jac/dks169>
- Henrikus, S.S., van Oijen, A.M., Robinson, A., 2018. Specialised DNA polymerases in *Escherichia coli*: roles within multiple pathways. *Curr. Genet.* 64, 1189–1196. <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0840-x>
- Herman, A., Węgrzyn, A., Węgrzyn, G., 1994. Differential Replication of Plasmids during Stringent and Relaxed Response of *Escherichia coli*. *Plasmid* 32, 89–94. <https://doi.org/10.1006/plas.1994.1049>
- Hertman, I., Luria, S.E., 1967. Transduction studies on the role of a *rec+* gene in the ultraviolet induction of prophage lambda. *J. Mol. Biol.* 23, 117–133. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(67\)80021-4](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(67)80021-4)
- Hirakawa, H., Inazumi, Y., Senda, Y., Kobayashi, A., Hirata, T., Nishino, K., Yamaguchi, A., 2006. N-acetyl-d-glucosamine induces the expression of multidrug exporter genes, *mdtEF*, via catabolite activation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188, 5851–5858. <https://doi.org/10.1128/JB.00301-06>
- Hobbs, J.K., Boraston, A.B., 2019. (p)ppGpp and the Stringent Response: An Emerging Threat to Antibiotic Therapy. *ACS Infect. Dis.* 5, 1505–1517. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00204>
- Hochhut, B., Lotfi, Y., Mazel, D., Faruque, S.M., Woodgate, R., Waldor, M.K., 2001. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 2991–3000. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.11.2991-3000.2001>
- Hocquet, D., Llanes, C., Thouverez, M., Kulasekara, H.D., Bertrand, X., Plésiat, P., Mazel, D., Miller, S.I., 2012. Evidence for induction of integron-based antibiotic resistance by the SOS response in a clinical setting. *PLoS Pathog.* 8, e1002778. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002778>
- Hong, J., Ahn, J.-M., Kim, B.C., Gu, M.B., 2009. Construction of a functional network for common DNA damage responses in *Escherichia coli*. *Genomics* 93, 514–524. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2009.01.010>
- Honsa, E.S., Cooper, V.S., Mhaisien, M.N., Frank, M., Shaker, J., Iverson, A., Rubnitz, J., Hayden, R.T., Lee, R.E., Rock, C.O., Tuomanen, E.I., Wolf, J., Rosch, J.W., 2017. RelA Mutant *Enterococcus faecium* with Multiantibiotic Tolerance Arising in an Immunocompromised Host. *mBio* 8, e02124-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.02124-16>

- Hostetler, Z.M., Cory, M.B., Jones, C.M., Petersson, E.J., Kohli, R.M., 2020. The Kinetic and Molecular Basis for the Interaction of LexA and Activated RecA Revealed by a Fluorescent Amino Acid Probe. *ACS Chem. Biol.* 15, 1127–1133. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00886>
- Huang, C.-T., Xu, K.D., McFeters, G.A., Stewart, P.S., 1998. Spatial Patterns of Alkaline Phosphatase Expression within Bacterial Colonies and Biofilms in Response to Phosphate Starvation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1526–1531.
- Imlay, J.A., Linn, S., 1987. Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* 169, 2967–2976. <https://doi.org/10.1128/jb.169.7.2967-2976.1987>
- Irving, S.E., Choudhury, N.R., Corrigan, R.M., 2021. The stringent response and physiological roles of (pp)pGpp in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 256–271. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00470-y>
- Ito, A., May, T., Taniuchi, A., Kawata, K., Okabe, S., 2009a. Localized expression profiles of rpoS in *Escherichia coli* biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 103, 975–983. <https://doi.org/10.1002/bit.22305>
- Ito, A., May, T., Taniuchi, A., Kawata, K., Okabe, S., 2009b. Localized expression profiles of rpoS in *Escherichia coli* biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 103, 975–983. <https://doi.org/10.1002/bit.22305>
- Izutsu, K., Wada, A., Wada, C., 2001. Expression of ribosome modulation factor (RMF) in *Escherichia coli* requires ppGpp. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 6, 665–676. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00457.x>
- Jacoby, G., Cattoir, V., Hooper, D., Martínez-Martínez, L., Nordmann, P., Pascual, A., Poirel, L., Wang, M., 2008. qnr Gene nomenclature. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2297–2299. <https://doi.org/10.1128/AAC.00147-08>
- Jacquier, H., Zaoui, C., Pors, M.-J.S., Mazel, D., Berçot, B., 2009. Translation regulation of integrons gene cassette expression by the attC sites. *Mol. Microbiol.* 72, 1475–1486. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06736.x>
- Jain, V., Saleem-Batcha, R., China, A., Chatterji, D., 2006. Molecular dissection of the mycobacterial stringent response protein Rel. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* 15, 1449–1464. <https://doi.org/10.1110/ps.062117006>
- Janion, C., 2008. Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *Int. J. Biol. Sci.* 4, 338–344. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4.338>
- Janion, C., Sikora, A., Nowosielska, A., Grzesiuk, E., 2002. Induction of the SOS response in starved *Escherichia coli*. *Environ. Mol. Mutagen.* 40, 129–133. <https://doi.org/10.1002/em.10094>
- Jefferson, K.K., Goldmann, D.A., Pier, G.B., 2005. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2467–2473. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.6.2467-2473.2005>
- Jena, N.R., 2012. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J. Biosci.* 37, 503–517. <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9218-2>
- Jensen, P.Ø., Bjarnsholt, T., Phipps, R., Rasmussen, T.B., Calum, H., Christoffersen, L., Moser, C., Williams, P., Pressler, T., Givskov, M., Høiby, N., 2007. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Read. Engl.* 153, 1329–1338. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003863-0>

- Jiang, Q., Karata, K., Woodgate, R., Cox, M.M., Goodman, M.F., 2009. The active form of DNA polymerase V is UmuD'2C–RecA–ATP. *Nature* 460, 359–363. <https://doi.org/10.1038/nature08178>
- Jishage, M., Kvint, K., Shingler, V., Nyström, T., 2002. Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev.* 16, 1260–1270. <https://doi.org/10.1101/gad.227902>
- Johansson, C., Kamali-Moghaddam, M., Sundström, L., 2004. Integron integrase binds to bulged hairpin DNA. *Nucleic Acids Res.* 32, 4033–4043. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh730>
- Jones, E.C., Uphoff, S., 2021. Single-molecule imaging of LexA degradation in *Escherichia coli* elucidates regulatory mechanisms and heterogeneity of the SOS response. *Nat. Microbiol.* 6, 981–990. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00930-y>
- Jones-Dias, D., Manageiro, V., Ferreira, E., Barreiro, P., Vieira, L., Moura, I.B., Caniça, M., 2016. Architecture of Class 1, 2, and 3 Integrons from Gram Negative Bacteria Recovered among Fruits and Vegetables. *Front. Microbiol.* 7, 1400. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01400>
- Jove, T., 2021. Functional Characterization of a Novel Class of Mobile Integrons.
- Jové, T., Da Re, S., Denis, F., Mazel, D., Ploy, M.-C., 2010. Inverse Correlation between Promoter Strength and Excision Activity in Class 1 Integrons. *PLoS Genet.* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000793>
- Jové, T., Da Re, S., Tabesse, A., Gassama-Sow, A., Ploy, M.-C., 2017. Gene Expression in Class 2 Integrons Is SOS-Independent and Involves Two P_c Promoters. *Front. Microbiol.* 8, 1499. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01499>
- Kamenšek, S., Podlesek, Z., Gillor, O., Žgur-Bertok, D., 2010. Genes regulated by the *Escherichia coli* SOS repressor LexA exhibit heterogenous expression. *BMC Microbiol.* 10, 283. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-283>
- Kang, Y., McMillan, I., Norris, M.H., Hoang, T.T., 2015. Single prokaryotic cell isolation and total transcript amplification protocol for transcriptomic analysis. *Nat. Protoc.* 10, 974–984. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.058>
- Kanjee, U., Gutsche, I., Alexopoulos, E., Zhao, B., El Bakkouri, M., Thibault, G., Liu, K., Ramachandran, S., Snider, J., Pai, E.F., Houry, W.A., 2011. Linkage between the bacterial acid stress and stringent responses: the structure of the inducible lysine decarboxylase. *EMBO J.* 30, 931–944. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.5>
- Kaspy, I., Rotem, E., Weiss, N., Ronin, I., Balaban, N.Q., Glaser, G., 2013. HipA-mediated antibiotic persistence via phosphorylation of the glutamyl-tRNA-synthetase. *Nat. Commun.* 4, 3001. <https://doi.org/10.1038/ncomms4001>
- Kaushik, M., Kumar, S., Kapoor, R.K., Viridi, J.S., Gulati, P., 2018. Integrons in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. *Int. J. Antimicrob. Agents* 51, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.10.004>
- Kawabata, M., Kawabata, T., Nishibori, M., 2005. Role of recA/RAD51 family proteins in mammals. *Acta Med. Okayama* 59, 1–9. <https://doi.org/10.18926/AMO/31987>
- Keseler, I.M., Mackie, A., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Gama-Castro, S., Bonavides-Martínez, C., Fulcher, C., Huerta, A.M., Kothari, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Muñoz-Rascado, L., Ong, Q., Paley, S., Schröder, I., Shearer, A.G., Subhraveti, P., Travers, M., Weerasinghe, D., Weiss, V., Collado-Vides, J., Gunsalus, R.P., Paulsen, I., Karp, P.D., 2013. EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology. *Nucleic Acids Res.* 41, D605-612. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1027>

- Kheiri, R., Akhtari, L., 2016. Antimicrobial resistance and integron gene cassette arrays in commensal *Escherichia coli* from human and animal sources in IRI. *Gut Pathog.* 8, 40. <https://doi.org/10.1186/s13099-016-0123-3>
- Khil, P.P., Camerini-Otero, R.D., 2002. Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 44, 89–105. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02878.x>
- Kihira, K., Shimizu, Y., Shomura, Y., Shibata, N., Kitamura, M., Nakagawa, A., Ueda, T., Ochi, K., Higuchi, Y., 2012. Crystal structure analysis of the translation factor RF3 (release factor 3). *FEBS Lett.* 586, 3705–3709. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.08.029>
- Kim, C., Mwangi, M., Chung, M., Milheirço, C., de Lencastre, H., Tomasz, A., 2013. The Mechanism of Heterogeneous Beta-Lactam Resistance in MRSA: Key Role of the Stringent Stress Response. *PLoS ONE* 8, e82814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082814>
- Kingston, R.E., Nierman, W.C., Chamberlin, M.J., 1981. A direct effect of guanosine tetraphosphate on pausing of *Escherichia coli* RNA polymerase during RNA chain elongation. *J. Biol. Chem.* 256, 2787–2797.
- Kohanski, M.A., DePristo, M.A., Collins, J.J., 2010. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol. Cell* 37, 311–320. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.01.003>
- Kolpen, M., Lerche, C.J., Kragh, K.N., Sams, T., Koren, K., Jensen, A.S., Line, L., Bjarnsholt, T., Ciofu, O., Moser, C., Kühn, M., Høiby, N., Jensen, P.Ø., 2017. Hyperbaric Oxygen Sensitizes Anoxic *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm to Ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e01024-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01024-17>
- Kovačič, L., Paulič, N., Leonardi, A., Hodnik, V., Anderluh, G., Podlesek, Z., Žgur-Bertok, D., Križaj, I., Butala, M., 2013. Structural insight into LexA–RecA* interaction. *Nucleic Acids Res.* 41, 9901–9910. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt744>
- Kraemer, J.A., Sanderlin, A.G., Laub, M.T., 2019. The Stringent Response Inhibits DNA Replication Initiation in *E. coli* by Modulating Supercoiling of *oriC*. *mBio* 10, e01330-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01330-19>
- Kreuzer, K.N., 2013. DNA Damage Responses in Prokaryotes: Regulating Gene Expression, Modulating Growth Patterns, and Manipulating Replication Forks. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012674>
- Kriel, A., Bittner, A.N., Kim, S.H., Liu, K., Tehranchi, A.K., Zou, W.Y., Rendon, S., Chen, R., Tu, B.P., Wang, J.D., 2012. Direct regulation of GTP homeostasis by (p)ppGpp: a critical component of viability and stress resistance. *Mol. Cell* 48, 231–241. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.08.009>
- Krohn, M., Wagner, R., 1996. Transcriptional pausing of RNA polymerase in the presence of guanosine tetraphosphate depends on the promoter and gene sequence. *J. Biol. Chem.* 271, 23884–23894. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.39.23884>
- Król, J.E., Nguyen, H.D., Rogers, L.M., Beyenal, H., Krone, S.M., Top, E.M., 2011. Increased transfer of a multidrug resistance plasmid in *Escherichia coli* biofilms at the air-liquid interface. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5079–5088. <https://doi.org/10.1128/AEM.00090-11>
- Król, J.E., Wojtowicz, A.J., Rogers, L.M., Heuer, H., Smalla, K., Krone, S.M., Top, E.M., 2013. Invasion of *E. coli* biofilms by antibiotic resistance plasmids. *Plasmid* 70, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2013.03.003>
- Kudrin, P., Dzhygyr, I., Ishiguro, K., Beljantseva, J., Maksimova, E., Oliveira, S.R.A., Varik, V., Payoe, R., Konevega, A.L., Tenson, T., Suzuki, T., Haurlyuk, V., 2018. The ribosomal

- A-site finger is crucial for binding and activation of the stringent factor RelA. *Nucleic Acids Res.* 46, 1973–1983. <https://doi.org/10.1093/nar/gky023>
- Kudrin, P., Varik, V., Oliveira, S.R.A., Beljantseva, J., Del Peso Santos, T., Dzhygyr, I., Rejman, D., Cava, F., Tenson, T., Haurlyuk, V., 2017. Subinhibitory Concentrations of Bacteriostatic Antibiotics Induce relA-Dependent and relA-Independent Tolerance to β -Lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e02173-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02173-16>
- Kuroda, A., Murphy, H., Cashel, M., Kornberg, A., 1997. Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272, 21240–21243. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.34.21240>
- Kuzminov, A., 1999. Recombinational Repair of DNA Damage in *Escherichia coli* and Bacteriophage λ . *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 751–813.
- Lacotte, Y., Ploy, M.-C., Raheison, S., 2017. Class 1 integrons are low-cost structures in *Escherichia coli*. *ISME J.* 11, 1535–1544. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.38>
- Lange, R., Fischer, D., Hengge-Aronis, R., 1995. Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of rpoS, the structural gene for the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 177, 4676–4680. <https://doi.org/10.1128/jb.177.16.4676-4680.1995>
- Lappin-Scott, H., Burton, S., Stoodley, P., 2014. Revealing a world of biofilms — the pioneering research of Bill Costerton. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 781–787. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3343>
- Laroche, E., Pawlak, B., Berthe, T., Skurnik, D., Petit, F., 2009. Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 118–130. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00655.x>
- Lawrence, J.R., Korber, D.R., Hoyle, B.D., Costerton, J.W., Caldwell, D.E., 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.* 173, 6558–6567. <https://doi.org/10.1128/jb.173.20.6558-6567.1991>
- Lazzarini, R.A., Cashel, M., Gallant, J., 1971. On the regulation of guanosine tetraphosphate levels in stringent and relaxed strains of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 246, 4381–4385.
- Lebeaux, D., Chauhan, A., Rendueles, O., Beloin, C., 2013. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathog. Basel Switz.* 2, 288–356. <https://doi.org/10.3390/pathogens2020288>
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., 2012. [Management of biofilm-associated infections: what can we expect from recent research on biofilm lifestyles?]. *Med. Sci.* MS 28, 727–739. <https://doi.org/10.1051/medsci/2012288015>
- Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., Beloin, C., 2014. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 78, 510–543. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00013-14>
- Lee, J., Jayaram, M., Grainge, I., 1999. Wild-type Flp recombinase cleaves DNA in trans. *EMBO J.* 18, 784–791. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.3.784>
- Lee, M.D., Sanchez, S., Zimmer, M., Idris, U., Berrang, M.E., McDermott, P.F., 2002. Class 1 integron-associated tobramycin-gentamicin resistance in *Campylobacter jejuni* isolated from the broiler chicken house environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 3660–3664. <https://doi.org/10.1128/aac.46.11.3660-3664.2002>

- Lenz, A.P., Williamson, K.S., Pitts, B., Stewart, P.S., Franklin, M.J., 2008. Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4463–4471. <https://doi.org/10.1128/AEM.00710-08>
- Léon, G., Roy, P.H., 2009. Potential role of group IIC-attC introns in integron cassette formation. *J. Bacteriol.* 191, 6040–6051. <https://doi.org/10.1128/JB.00674-09>
- Lerche, C.J., Christophersen, L.J., Kolpen, M., Nielsen, P.R., Trøstrup, H., Thomsen, K., Hyldegaard, O., Bundgaard, H., Jensen, P.Ø., Høiby, N., Moser, C., 2017. Hyperbaric oxygen therapy augments tobramycin efficacy in experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 50, 406–412. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.04.025>
- Leverstein-van Hall, M.A., M. Blok, H.E., T. Donders, A.R., Paauw, A., Fluit, A.C., Verhoef, J., 2003. Multidrug Resistance among Enterobacteriaceae Is Strongly Associated with the Presence of Integrons and Is Independent of Species or Isolate Origin. *J. Infect. Dis.* 187, 251–259. <https://doi.org/10.1086/345880>
- Lewin, C.S., Amyes, S.G., 1991. The role of the SOS response in bacteria exposed to zidovudine or trimethoprim. *J. Med. Microbiol.* 34, 329–332. <https://doi.org/10.1099/00222615-34-6-329>
- Lewis, K., 2001. Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 999–1007. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001>
- Line, L., Alhede, M., Kolpen, M., Kühn, M., Ciofu, O., Bjarnsholt, T., Moser, C., Toyofuku, M., Nomura, N., Høiby, N., Jensen, P.Ø., 2014. Physiological levels of nitrate support anoxic growth by denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* at growth rates reported in cystic fibrosis lungs and sputum. *Front. Microbiol.* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00554>
- Lipmann, F., Sy, J., 1976. The enzymic mechanism of guanosine 5',3'-polyphosphate synthesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 17, 1–14. [https://doi.org/10.1016/s0079-6603\(08\)60063-x](https://doi.org/10.1016/s0079-6603(08)60063-x)
- Little, J.W., 1991. Mechanism of specific LexA cleavage: Autodigestion and the role of RecA coprotease. *Biochimie* 73, 411–421. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(91\)90108-D](https://doi.org/10.1016/0300-9084(91)90108-D)
- Little, J.W., Gellert, M., 1983. The SOS regulatory system: Control of its state by the level of RecA protease. *J. Mol. Biol.* 167, 791–808. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80111-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80111-9)
- Liu, C., Sun, D., Zhu, J., Liu, J., Liu, W., 2020. The Regulation of Bacterial Biofilm Formation by cAMP-CRP: A Mini-Review. *Front. Microbiol.* 11, 802. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00802>
- Liu, M.-C., Wu, C.-M., Liu, Y.-C., Zhao, J.-C., Yang, Y.-L., Shen, J.-Z., 2009. Identification, susceptibility, and detection of integron-gene cassettes of *Arcanobacterium pyogenes* in bovine endometritis. *J. Dairy Sci.* 92, 3659–3666. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1756>
- Loot, C., Bikard, D., Rachlin, A., Mazel, D., 2010. Cellular pathways controlling integron cassette site folding. *EMBO J.* 29, 2623–2634. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.151>
- Loot, C., Ducos-Galand, M., Escudero, J.A., Bouvier, M., Mazel, D., 2012. Replicative resolution of integron cassette insertion. *Nucleic Acids Res.* 40, 8361–8370. <https://doi.org/10.1093/nar/gks620>
- Loveland, A.B., Bah, E., Madireddy, R., Zhang, Y., Brilot, A.F., Grigorieff, N., Korostelev, A.A., 2016. Ribosome•RelA structures reveal the mechanism of stringent response activation. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.17029>

- Lu, J., Wang, Y., Li, J., Mao, L., Nguyen, S.H., Duarte, T., Coin, L., Bond, P., Yuan, Z., Guo, J., 2018. Triclosan at environmentally relevant concentrations promotes horizontal transfer of multidrug resistance genes within and across bacterial genera. *Environ. Int.* 121, 1217–1226. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.10.040>
- Lu, T.K., Collins, J.J., 2009. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 4629–4634. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800442106>
- Lundbäck, I.C., McDougall, F.K., Dann, P., Slip, D.J., Gray, R., Power, M.L., 2021. Into the sea: Antimicrobial resistance determinants in the microbiota of little penguins (*Eudyptula minor*). *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 88, 104697. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104697>
- Luo, Y., Pfuetzner, R.A., Mosimann, S., Paetzel, M., Frey, E.A., Cherney, M., Kim, B., Little, J.W., Strynadka, N.C.J., 2001. Crystal Structure of LexA: A Conformational Switch for Regulation of Self-Cleavage. *Cell* 106, 585–594. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00479-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00479-2)
- Lutz, R., Bujard, H., 1997. Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2 regulatory elements. *Nucleic Acids Res.* 25, 1203–1210.
- MacDonald, D., Demarre, G., Bouvier, M., Mazel, D., Gopaul, D.N., 2006. Structural basis for broad DNA-specificity in integron recombination. *Nature* 440, 1157–1162. <https://doi.org/10.1038/nature04643>
- Macia, M.D., Rojo-Molinero, E., Oliver, A., 2014. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 981–990. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12651>
- Maciag, M., Kochanowska, M., Lyzeń, R., Wegrzyn, G., Szalewska-Palasz, A., 2010. ppGpp inhibits the activity of *Escherichia coli* DnaG primase. *Plasmid* 63, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2009.11.002>
- MacPhee, D.G., Ambrose, M., 2010. Catabolite repression of SOS-dependent and SOS-independent spontaneous mutagenesis in stationary-phase *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 686, 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2010.01.022>
- Madsen, J.S., Burmølle, M., Hansen, L.H., Sørensen, S.J., 2012. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 65, 183–195. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x>
- Magana, M., Sereti, C., Ioannidis, A., Mitchell, C.A., Ball, A.R., Magiorkinis, E., Chatzipanagiotou, S., Hamblin, M.R., Hadjifrangiskou, M., Tegos, G.P., 2018. Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms. *Clin. Microbiol. Rev.* 31, e00084-16. <https://doi.org/10.1128/CMR.00084-16>
- Mah, T.-F., Pitts, B., Pellock, B., Walker, G.C., Stewart, P.S., O'Toole, G.A., 2003. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 426, 306–310. <https://doi.org/10.1038/nature02122>
- Maisonneuve, E., Castro-Camargo, M., Gerdes, K., 2013. RETRACTED: (p)ppGpp Controls Bacterial Persistence by Stochastic Induction of Toxin-Antitoxin Activity. *Cell* 154, 1140–1150. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.048>
- Maisonneuve, E., Shakespeare, L.J., Jørgensen, M.G., Gerdes, K., 2011. Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13206–13211. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100186108>

- Marks, L.R., Reddinger, R.M., Hakansson, A.P., 2012. High Levels of Genetic Recombination during Nasopharyngeal Carriage and Biofilm Formation in *Streptococcus pneumoniae*. *mBio* 3, e00200-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00200-12>
- Márquez, C., Labbate, M., Ingold, A.J., Roy Chowdhury, P., Ramírez, M.S., Centrón, D., Borthagaray, G., Stokes, H.W., 2008. Recovery of a functional class 2 integron from an *Escherichia coli* strain mediating a urinary tract infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 4153–4154. <https://doi.org/10.1128/AAC.00710-08>
- Marrie, T.J., Nelligan, J., Costerton, J.W., 1982. A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation* 66, 1339–1341. <https://doi.org/10.1161/01.cir.66.6.1339>
- Martin, C., Timm, J., Rauzier, J., Gomez-Lus, R., Davies, J., Gicquel, B., 1990. Transposition of an antibiotic resistance element in mycobacteria. *Nature* 345, 739–743. <https://doi.org/10.1038/345739a0>
- Martinez, E., de la Cruz, F., 1990. Genetic elements involved in Tn21 site-specific integration, a novel mechanism for the dissemination of antibiotic resistance genes. *EMBO J.* 9, 1275–1281.
- Martinez-Freijo, P., Fluit, A.C., Schmitz, F.J., Grek, V.S., Verhoef, J., Jones, M.E., 1998. Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J. Antimicrob. Chemother.* 42, 689–696. <https://doi.org/10.1093/jac/42.6.689>
- Maslowska, K.H., Makiela-Dzbenka, K., Fijalkowska, I.J., 2019. The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environ. Mol. Mutagen.* 60, 368–384. <https://doi.org/10.1002/em.22267>
- Mazel, D., 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 608–620. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1462>
- Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V.A., Davies, J., 1998. A Distinctive Class of Integron in the *Vibrio cholerae* Genome. *Science* 280, 605–608. <https://doi.org/10.1126/science.280.5363.605>
- McCool, J.D., Long, E., Petrosino, J.F., Sandler, H.A., Rosenberg, S.M., Sandler, S.J., 2004. Measurement of SOS expression in individual *Escherichia coli* K-12 cells using fluorescence microscopy. *Mol. Microbiol.* 53, 1343–1357. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04225.x>
- McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D., Kjelleberg, S., 2012. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 39–50. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2695>
- McDougall, F., Boardman, W., Gillings, M., Power, M., 2019. Bats as reservoirs of antibiotic resistance determinants: A survey of class 1 integrons in Grey-headed Flying Foxes (*Pteropus poliocephalus*). *Infect. Genet. Evol.* 70, 107–113. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.02.022>
- McGlynn, P., Savery, N.J., Dillingham, M.S., 2012. The conflict between DNA replication and transcription. *Mol. Microbiol.* 85, 12–20. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08102.x>
- Mechold, U., Murphy, H., Brown, L., Cashel, M., 2002. Intramolecular regulation of the opposing (p)ppGpp catalytic activities of Rel(Seq), the Rel/Spo enzyme from *Streptococcus equisimilis*. *J. Bacteriol.* 184, 2878–2888. <https://doi.org/10.1128/JB.184.11.2878-2888.2002>

- Mendes Moreira, A., Couvé-Deacon, E., Bousquet, P., Chainier, D., Jové, T., Ploy, M.-C., Barraud, O., 2019. Proteae: a reservoir of class 2 integrons? *J. Antimicrob. Chemother.* 74, 1560–1562. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz079>
- Meng, H., Zhang, Z., Chen, M., Su, Y., Li, L., Miyoshi, S.-I., Yan, H., Shi, L., 2011. Characterization and horizontal transfer of class 1 integrons in *Salmonella* strains isolated from food products of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.* 149, 274–277. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.006>
- Merrikh, H., Kohli, R.M., 2020. Targeting evolution to inhibit antibiotic resistance. *FEBS J.* <https://doi.org/10.1111/febs.15370>
- Messier, N., Roy, P.H., 2001. Integron integrases possess a unique additional domain necessary for activity. *J. Bacteriol.* 183, 6699–6706. <https://doi.org/10.1128/JB.183.22.6699-6706.2001>
- Metzger, S., Schreiber, G., Aizenman, E., Cashel, M., Glaser, G., 1989. Characterization of the relA1 mutation and a comparison of relA1 with new relA null alleles in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 264, 21146–21152.
- Meunier, A., Nerich, V., Fagnoni-Legat, C., Richard, M., Mazel, D., Adotevi, O., Bertrand, X., Hocquet, D., 2019. Enhanced emergence of antibiotic-resistant pathogenic bacteria after in vitro induction with cancer chemotherapy drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* 74, 1572–1577. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz070>
- Miko, A., Pries, K., Schroeter, A., Helmuth, R., 2005. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 1025–1033. <https://doi.org/10.1093/jac/dki365>
- Miller, C., Ingmer, H., Thomsen, L.E., Skarstad, K., Cohen, S.N., 2003. DpiA binding to the replication origin of *Escherichia coli* plasmids and chromosomes destabilizes plasmid inheritance and induces the bacterial SOS response. *J. Bacteriol.* 185, 6025–6031. <https://doi.org/10.1128/JB.185.20.6025-6031.2003>
- Miller, C., Thomsen, L.E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., Cohen, S.N., 2004. SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science* 305, 1629–1631. <https://doi.org/10.1126/science.1101630>
- Milon, P., Tischenko, E., Tomsic, J., Caserta, E., Folkers, G., La Teana, A., Rodnina, M.V., Pon, C.L., Boelens, R., Gualerzi, C.O., 2006. The nucleotide-binding site of bacterial translation initiation factor 2 (IF2) as a metabolic sensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 13962–13967. <https://doi.org/10.1073/pnas.0606384103>
- Mo, C.Y., Culyba, M.J., Selwood, T., Kubiak, J.M., Hostetler, Z.M., Jurewicz, A.J., Keller, P.M., Pope, A.J., Quinn, A., Schneck, J., Widdowson, K.L., Kohli, R.M., 2018. Inhibitors of LexA Autoproteolysis and the Bacterial SOS Response Discovered by an Academic-Industry Partnership. *ACS Infect. Dis.* 4, 349–359. <https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.7b00122>
- Mohana-Borges, R., Pacheco, A.B., Sousa, F.J., Foguel, D., Almeida, D.F., Silva, J.L., 2000. LexA repressor forms stable dimers in solution. The role of specific dna in tightening protein-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 275, 4708–4712. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.7.4708>
- Möker, N., Dean, C.R., Tao, J., 2010. *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *J. Bacteriol.* 192, 1946–1955. <https://doi.org/10.1128/JB.01231-09>
- Molin, S., Tolker-Nielsen, T., 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr. Opin. Biotechnol.* 14, 255–261. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00036-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00036-3)

- Monmeyran, A., Thomen, P., Jonquière, H., Sureau, F., Li, C., Plamont, M.-A., Douarche, C., Casella, J.-F., Gautier, A., Henry, N., 2018. The inducible chemical-genetic fluorescent marker FAST outperforms classical fluorescent proteins in the quantitative reporting of bacterial biofilm dynamics. *Sci. Rep.* 8, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28643-z>
- Mount, D.W., Low, K.B., Edmiston, S.J., 1972. Dominant mutations (*lex*) in *Escherichia coli* K-12 which affect radiation sensitivity and frequency of ultraviolet light-induced mutations. *J. Bacteriol.* 112, 886–893. <https://doi.org/10.1128/jb.112.2.886-893.1972>
- Moura, A., Henriques, I., Smalla, K., Correia, A., 2010. Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Res. Microbiol.* 161, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.11.004>
- Moura, A., Jové, T., Ploy, M.-C., Henriques, I., Correia, A., 2012. Diversity of gene cassette promoters in class 1 integrons from wastewater environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5413–5416. <https://doi.org/10.1128/AEM.00042-12>
- Moura, A., Soares, M., Pereira, C., Leitão, N., Henriques, I., Correia, A., 2009. INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 25, 1096–1098. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp105>
- Mukherjee, A., Walker, J., Weyant, K.B., Schroeder, C.M., 2013. Characterization of Flavin-Based Fluorescent Proteins: An Emerging Class of Fluorescent Reporters. *PLoS ONE* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064753>
- Mukherjee, A., Weyant, K.B., Agrawal, U., Walker, J., Cann, I.K.O., Schroeder, C.M., 2015. Engineering and characterization of new LOV-based fluorescent proteins from *Chlamydomonas reinhardtii* and *Vaucheria frigida*. *ACS Synth. Biol.* 4, 371–377. <https://doi.org/10.1021/sb500237x>
- Mwangi, M.M., Kim, C., Chung, M., Tsai, J., Vijayadamodar, G., Benitez, M., Jarvie, T.P., Du, L., Tomasz, A., 2013. Whole-genome sequencing reveals a link between β -lactam resistance and synthetases of the alarmone (p)ppGpp in *Staphylococcus aureus*. *Microb. Drug Resist. Larchmt.* N 19, 153–159. <https://doi.org/10.1089/mdr.2013.0053>
- Naas, T., Mikami, Y., Imai, T., Poirel, L., Nordmann, P., 2001. Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *J. Bacteriol.* 183, 235–249. <https://doi.org/10.1128/JB.183.1.235-249.2001>
- Nakagawa, A., Oshima, T., Mori, H., 2006. Identification and characterization of a second, inducible promoter of *relA* in *Escherichia coli*. *Genes Genet. Syst.* 81, 299–310.
- Nandi, S., Maurer, J.J., Hofacre, C., Summers, A.O., 2004. Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 7118–7122. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306466101>
- Neher, S.B., Flynn, J.M., Sauer, R.T., Baker, T.A., 2003. Latent ClpX-recognition signals ensure LexA destruction after DNA damage. *Genes Dev.* 17, 1084–1089. <https://doi.org/10.1101/gad.1078003>
- Nesvera, J., Hochmannová, J., Pátek, M., 1998. An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 169, 391–395. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13345.x>
- Neu, T.R., Lawrence, J.R., 2014. Investigation of Microbial Biofilm Structure by Laser Scanning Microscopy, in: Muffler, K., Ulber, R. (Eds.), *Productive Biofilms, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. Springer International Publishing, Cham, pp. 1–51. https://doi.org/10.1007/10_2014_272

- Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., McKay, G., Siehnel, R., Schafhauser, J., Wang, Y., Britigan, B.E., Singh, P.K., 2011. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science* 334, 982–986. <https://doi.org/10.1126/science.1211037>
- Ni, M., Yang, L., Liu, X.-L., Qi, O., 2008. Fluence-response dynamics of the UV-induced SOS response in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 57, 521–526. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9235-4>
- Nivina, A., Escudero, J.A., Vit, C., Mazel, D., Loot, C., 2016. Efficiency of integron cassette insertion in correct orientation is ensured by the interplay of the three unpaired features of attC recombination sites. *Nucleic Acids Res.* 44, 7792–7803. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw646>
- Nunes-Düby, S.E., Kwon, H.J., Tirumalai, R.S., Ellenberger, T., Landy, A., 1998. Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res.* 26, 391–406. <https://doi.org/10.1093/nar/26.2.391>
- Nwaneshiudu, A., Kuschal, C., Sakamoto, F.H., Rox Anderson, R., Schwarzenberger, K., Young, R.C., 2012. Introduction to Confocal Microscopy. *J. Invest. Dermatol.* 132, 1–5. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.429>
- Ogawa, A., Takeda, T., 1993. The gene encoding the heat-stable enterotoxin of *Vibrio cholerae* is flanked by 123-base pair direct repeats. *Microbiol. Immunol.* 37, 607–616. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1993.tb01683.x>
- Okabe, S., Satoh, H., Watanabe, Y., 1999. In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3182–3191. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.7.3182-3191.1999>
- Oreopoulos, J., Berman, R., Browne, M., 2014. Spinning-disk confocal microscopy: present technology and future trends. *Methods Cell Biol.* 123, 153–175. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420138-5.00009-4>
- Pabst, B., Pitts, B., Lauchnor, E., Stewart, P.S., 2016. Gel-Entrapped *Staphylococcus aureus* Bacteria as Models of Biofilm Infection Exhibit Growth in Dense Aggregates, Oxygen Limitation, Antibiotic Tolerance, and Heterogeneous Gene Expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 6294–6301. <https://doi.org/10.1128/AAC.01336-16>
- Pacios, O., Blasco, L., Bleriot, I., Fernandez-Garcia, L., Ambroa, A., López, M., Bou, G., Cantón, R., Garcia-Contreras, R., Wood, T.K., Tomás, M., 2020. (p)ppGpp and Its Role in Bacterial Persistence: New Challenges. *Antimicrob. Agents Chemother.* 64. <https://doi.org/10.1128/AAC.01283-20>
- Pagano, M., Martins, A.F., Barth, A.L., 2016. Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Braz. J. Microbiol.* 47, 785–792. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.005>
- Papagiannitsis, C.C., Dolejska, M., Izdebski, R., Dobiasova, H., Studentova, V., Esteves, F.J., Derde, L.P.G., Bonten, M.J.M., Hrabák, J., Gniadkowski, M., 2015. Characterization of pKP-M1144, a Novel ColE1-Like Plasmid Encoding IMP-8, GES-5, and BEL-1 β -Lactamases, from a *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 252 Isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 5065–5068. <https://doi.org/10.1128/AAC.00937-15>
- Partridge, S.R., Recchia, G.D., Scaramuzzi, C., Collis, C.M., Stokes, H.W., Hall, R.M., 2000. Definition of the attI1 site of class 1 integrons. *Microbiology* 146, 2855–2864. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-11-2855>
- Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E., Iredell, J.R., 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 757–784. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00175.x>

- Pavelkovich, A., Balode, A., Edquist, P., Egorova, S., Ivanova, M., Kaftyreva, L., Konovalenko, I., Kõljalg, S., Lillo, J., Lipskaya, L., Miciuleviciene, J., Pai, K., Parv, K., Pärna, K., Rööp, T., Sepp, E., Stšepetova, J., Naaber, P., 2014. Detection of carbapenemase-producing enterobacteriaceae in the baltic countries and st. Petersburg area. *BioMed Res. Int.* 2014, 548960. <https://doi.org/10.1155/2014/548960>
- Perederina, A., Svetlov, V., Vassilyeva, M.N., Tahirov, T.H., Yokoyama, S., Artsimovitch, I., Vassilyev, D.G., 2004. Regulation through the Secondary Channel—Structural Framework for ppGpp-DksA Synergism during Transcription. *Cell* 118, 297–309. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.06.030>
- Pérez-Osorio, A.C., Williamson, K.S., Franklin, M.J., 2010. Heterogeneous rpoS and rhIR mRNA levels and 16S rRNA/rDNA (rRNA gene) ratios within *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, sampled by laser capture microdissection. *J. Bacteriol.* 192, 2991–3000. <https://doi.org/10.1128/JB.01598-09>
- Peterson, E.J.R., Janzen, W.P., Kireev, D., Singleton, S.F., 2012. High-throughput screening for RecA inhibitors using a transcriber adenosine 5'-O-diphosphate assay. *Assay Drug Dev. Technol.* 10, 260–268. <https://doi.org/10.1089/adt.2011.0409>
- Petroff, A.P., Wu, T.-D., Liang, B., Mui, J., Guerquin-Kern, J.-L., Vali, H., Rothman, D.H., Bosak, T., 2011. Reaction-diffusion model of nutrient uptake in a biofilm: theory and experiment. *J. Theor. Biol.* 289, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2011.08.004>
- Petrova, M., Gorlenko, Z., Mindlin, S., 2011. Tn5045, a novel integron-containing antibiotic and chromate resistance transposon isolated from a permafrost bacterium. *Res. Microbiol.* 162, 337–345. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.01.003>
- Pinilla-Redondo, R., Riber, L., Sørensen, S.J., 2018. Fluorescence Recovery Allows the Implementation of a Fluorescence Reporter Gene Platform Applicable for the Detection and Quantification of Horizontal Gene Transfer in Anoxic Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 84. <https://doi.org/10.1128/AEM.02507-17>
- Plamont, M.-A., Billon-Denis, E., Maurin, S., Gauron, C., Pimenta, F.M., Specht, C.G., Shi, J., Quérard, J., Pan, B., Rossignol, J., Moncoq, K., Morellet, N., Volovitch, M., Lescop, E., Chen, Y., Triller, A., Vríz, S., Le Saux, T., Jullien, L., Gautier, A., 2016. Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag for tunable protein imaging in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 497–502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513094113>
- Pletzer, D., Mansour, S.C., Hancock, R.E.W., 2018. Synergy between conventional antibiotics and anti-biofilm peptides in a murine, sub-cutaneous abscess model caused by recalcitrant ESKAPE pathogens. *PLoS Pathog.* 14, e1007084. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007084>
- Pohlhaus, J.R., Kreuzer, K.N., 2005. Norfloxacin-induced DNA gyrase cleavage complexes block *Escherichia coli* replication forks, causing double-stranded breaks in vivo. *Mol. Microbiol.* 56, 1416–1429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04638.x>
- Poirel, L., Carattoli, A., Bernabeu, S., Bruderer, T., Frei, R., Nordmann, P., 2010. A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1594–1598. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq166>
- Prossliner, T., Skovbo Winther, K., Sørensen, M.A., Gerdes, K., 2018. Ribosome Hibernation. *Annu. Rev. Genet.* 52, 321–348. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035130>
- Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B., Claverys, J.-P., 2006. Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 313, 89–92. <https://doi.org/10.1126/science.1127912>

- Quillardet, P., Rouffaud, M.-A., Bouige, P., 2003. DNA array analysis of gene expression in response to UV irradiation in *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* 154, 559–572. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00149-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00149-9)
- Radman, M., 1974. Phenomenology of an inducible mutagenic DNA repair pathway in *Escherichia coli*: SOS repair hypothesis. *Mol. Environ. Asp. Mutagen.*
- Rajpara, N., Patel, A., Tiwari, N., Bahuguna, J., Antony, A., Choudhury, I., Ghosh, Anuradha, Jain, R., Ghosh, Amit, Bhardwaj, A.K., 2009. Mechanism of drug resistance in a clinical isolate of *Vibrio fluvialis*: involvement of multiple plasmids and integrons. *Int. J. Antimicrob. Agents* 34, 220–225. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.03.020>
- Ramsing, N.B., Kühl, M., Jørgensen, B.B., 1993. Distribution of sulfate-reducing bacteria, O₂, and H₂S in photosynthetic biofilms determined by oligonucleotide probes and microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3840–3849. <https://doi.org/10.1128/aem.59.11.3840-3849.1993>
- Rani, S.A., Pitts, B., Beyenal, H., Veluchamy, R.A., Lewandowski, Z., Davison, W.M., Buckingham-Meyer, K., Stewart, P.S., 2007. Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. *J. Bacteriol.* 189, 4223–4233. <https://doi.org/10.1128/JB.00107-07>
- Ransom, E.M., Ellermeier, C.D., Weiss, D.S., 2015. Use of mCherry Red Fluorescent Protein for Studies of Protein Localization and Gene Expression in *Clostridium difficile*. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 1652–1660. <https://doi.org/10.1128/AEM.03446-14>
- Ravi, A., Avershina, E., Foley, S.L., Ludvigsen, J., Storrø, O., Øien, T., Johnsen, R., McCartney, A.L., L'Abée-Lund, T.M., Rudi, K., 2015. The commensal infant gut metagenome as a potential reservoir for persistent multidrug resistance integrons. *Sci. Rep.* 5, 15317. <https://doi.org/10.1038/srep15317>
- Recacha, E., Machuca, J., Díaz de Alba, P., Ramos-Güelfo, M., Docobo-Pérez, F., Rodríguez-Beltrán, J., Blázquez, J., Pascual, A., Rodríguez-Martínez, J.M., 2017. Quinolone Resistance Reversion by Targeting the SOS Response. *mBio* 8. <https://doi.org/10.1128/mBio.00971-17>
- Recchia, G.D., Hall, R.M., 1997. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol.* 5, 389–394. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(97\)01123-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(97)01123-2)
- Recchia, G.D., Hall, R.M., 1995. Plasmid evolution by acquisition of mobile gene cassettes: plasmid pIE723 contains the aadB gene cassette precisely inserted at a secondary site in the IncQ plasmid RSF1010. *Mol. Microbiol.* 15, 179–187. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02232.x>
- Riber, L., Løbner-Olesen, A., 2020. Inhibition of *Escherichia coli* chromosome replication by rifampicin treatment or during the stringent response is overcome by de novo DnaA protein synthesis. *Mol. Microbiol.* 114, 906–919. <https://doi.org/10.1111/mmi.14531>
- Richards, J.J., Melander, C., 2009. Controlling Bacterial Biofilms. *ChemBioChem* 10, 2287–2294. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900317>
- Richter, D., 1980. Uncharged tRNA inhibits guanosine 3',5'-bis (diphosphate) 3'-pyrophosphohydrolase [ppGppase], the spoT gene product, from *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet. MGG* 178, 325–327. <https://doi.org/10.1007/BF00270479>
- Riggs, D.L., Mueller, R.D., Kwan, H.S., Artz, S.W., 1986. Promoter domain mediates guanosine tetraphosphate activation of the histidine operon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 9333–9337. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.24.9333>

- Roberts, M.E., Stewart, P.S., 2004. Modeling antibiotic tolerance in biofilms by accounting for nutrient limitation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 48–52. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.48-52.2004>
- Rodionov, D.G., Pisabarro, A.G., de Pedro, M.A., Kusser, W., Ishiguro, E.E., 1995. Beta-lactam-induced bacteriolysis of amino acid-deprived *Escherichia coli* is dependent on phospholipid synthesis. *J. Bacteriol.* 177, 992–997. <https://doi.org/10.1128/jb.177.4.992-997.1995>
- Rodríguez-Martínez, J.M., Ballesta, S., Pascual, A., 2007. Activity and penetration of fosfomycin, ciprofloxacin, amoxicillin/clavulanic acid and co-trimoxazole in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 30, 366–368. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.05.005>
- Rojas, A.M., Ehrenberg, M., Andersson, S.G., Kurland, C.G., 1984. ppGpp inhibition of elongation factors Tu, G and Ts during polypeptide synthesis. *Mol. Gen. Genet.* MGG 197, 36–45. <https://doi.org/10.1007/BF00327920>
- Ronen, M., Rosenberg, R., Shraiman, B.I., Alon, U., 2002. Assigning numbers to the arrows: parameterizing a gene regulation network by using accurate expression kinetics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 10555–10560. <https://doi.org/10.1073/pnas.152046799>
- Ronneau, S., Hallez, R., 2019. Make and break the alarmone: regulation of (p)ppGpp synthetase/hydrolase enzymes in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 43, 389–400. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz009>
- Ross, W., Sanchez-Vazquez, P., Chen, A.Y., Lee, J.-H., Burgos, H.L., Gourse, R.L., 2016. ppGpp Binding to a Site at the RNAP-DksA Interface Accounts for Its Dramatic Effects on Transcription Initiation during the Stringent Response. *Mol. Cell* 62, 811–823. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.029>
- Ross, W., Vrentas, C.E., Sanchez-Vazquez, P., Gaal, T., Gourse, R.L., 2013. The magic spot: a ppGpp binding site on *E. coli* RNA polymerase responsible for regulation of transcription initiation. *Mol. Cell* 50, 420–429. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.03.021>
- Rowe-Magnus, D.A., Guerout, A.-M., Mazel, D., 2002. Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. *Mol. Microbiol.* 43, 1657–1669. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02861.x>
- Rowe-Magnus, D.A., Guerout, A.M., Ploncard, P., Dychinco, B., Davies, J., Mazel, D., 2001. The evolutionary history of chromosomal super-integrations provides an ancestry for multiresistant integrons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 652–657. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.2.652>
- Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Li, J., Hachani, A., Kowalska, K., Filloux, A., 2010. High-level antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm: the ndvB gene is involved in the production of highly glycerol-phosphorylated beta-(1->3)-glucans, which bind aminoglycosides. *Glycobiology* 20, 895–904. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq047>
- Sanchez-Vazquez, P., Dewey, C.N., Kitten, N., Ross, W., Gourse, R.L., 2019. Genome-wide effects on *Escherichia coli* transcription from ppGpp binding to its two sites on RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 8310–8319. <https://doi.org/10.1073/pnas.1819682116>
- Sassanfar, M., Roberts, J.W., 1990. Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*: The involvement of DNA replication. *J. Mol. Biol.* 212, 79–96. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90306-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90306-7)
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G., 2002. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184, 1140–1154. <https://doi.org/10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002>

- Savage, V.J., Chopra, I., O'Neill, A.J., 2013. Staphylococcus aureus biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57, 1968–1970. <https://doi.org/10.1128/AAC.02008-12>
- Schaible, B., Taylor, C.T., Schaffer, K., 2012. Hypoxia increases antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* through altering the composition of multidrug efflux pumps. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 2114–2118. <https://doi.org/10.1128/AAC.05574-11>
- Schlacher, K., Pham, P., Cox, M.M., Goodman, M.F., 2006. Roles of DNA Polymerase V and RecA Protein in SOS Damage-Induced Mutation. *Chem. Rev.* 106, 406–419. <https://doi.org/10.1021/cr0404951>
- Scholz, O., Thiel, A., Hillen, W., Niederweis, M., 2000. Quantitative analysis of gene expression with an improved green fluorescent protein. *Eur. J. Biochem.* 267, 1565–1570. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01170.x>
- Schramm, A., Larsen, L.H., Revsbech, N.P., Ramsing, N.B., Amann, R., Schleifer, K.H., 1996. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4641–4647. <https://doi.org/10.1128/aem.62.12.4641-4647.1996>
- Schreiber, G., Metzger, S., Aizenman, E., Roza, S., Cashel, M., Glaser, G., 1991. Overexpression of the *relA* gene in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266, 3760–3767.
- Schreiber, G., Ron, E.Z., Glaser, G., 1995. ppGpp-mediated regulation of DNA replication and cell division in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 30, 27–32. <https://doi.org/10.1007/BF00294520>
- Scott, K.P., Mercer, D.K., Glover, L.A., Flint, H.J., 1998. The green fluorescent protein as a visible marker for lactic acid bacteria in complex ecosystems. *FEMS Microbiol. Ecol.* 26, 219–230. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.1998.tb00507.x>
- Selwood, T., Larsen, B.J., Mo, C.Y., Culyba, M.J., Hostetler, Z.M., Kohli, R.M., Reitz, A.B., Baugh, S.D.P., 2018. Advancement of the 5-Amino-1-(Carbamoylmethyl)-1H-1,2,3-Triazole-4-Carboxamide Scaffold to Disarm the Bacterial SOS Response. *Front. Microbiol.* 9, 2961. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02961>
- Seyfzadeh, M., Keener, J., Nomura, M., 1993. *spoT*-dependent accumulation of guanosine tetraphosphate in response to fatty acid starvation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 11004–11008. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.11004>
- Shibata, T., Cunningham, R.P., Radding, C.M., 1981. Homologous pairing in genetic recombination. Purification and characterization of *Escherichia coli* *recA* protein. *J. Biol. Chem.* 256, 7557–7564.
- Shyp, V., Tankov, S., Ermakov, A., Kudrin, P., English, B.P., Ehrenberg, M., Tenson, T., Elf, J., Haurlyuk, V., 2012. Positive allosteric feedback regulation of the stringent response enzyme *RelA* by its product. *EMBO Rep.* 13, 835–839. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.106>
- Simo Tchuinte, P.L., Stalder, T., Venditti, S., Ngandjio, A., Dagot, C., Ploy, M.-C., Barraud, O., 2016. Characterisation of class 3 integrons with oxacillinase gene cassettes in hospital sewage and sludge samples from France and Luxembourg. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48, 431–434. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.06.018>
- Sinha, A.K., Løbner-Olesen, A., Riber, L., 2020. Bacterial Chromosome Replication and DNA Repair During the Stringent Response. *Front. Microbiol.* 11, 582113. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582113>
- Skurnik, D., Ruimy, R., Andremont, A., Amorin, C., Rouquet, P., Picard, B., Denamur, E., 2006. Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal

- Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 57, 1215–1219. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl122>
- Sommer, S., Boudsocq, F., Devoret, R., Bailone, A., 1998. Specific RecA amino acid changes affect RecA–UmuD’C interaction. *Mol. Microbiol.* 28, 281–291. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00803.x>
- Song, S., Wood, T.K., 2020. ppGpp ribosome dimerization model for bacterial persister formation and resuscitation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 523, 281–286. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.01.102>
- Soufi, L., Abbassi, M.S., Sáenz, Y., Vinué, L., Somalo, S., Zarazaga, M., Abbas, A., Dbaya, R., Khanfir, L., Ben Hassen, A., Hammami, S., Torres, C., 2009. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in *Escherichia coli* isolates from poultry meat in Tunisia. *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 1067–1073. <https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0284>
- Spira, B., Silberstein, N., Yagil, E., 1995. Guanosine 3’,5’-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi. *J. Bacteriol.* 177, 4053–4058. <https://doi.org/10.1128/jb.177.14.4053-4058.1995>
- Spoering, A.L., Lewis, K., 2001. Biofilms and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa* Have Similar Resistance to Killing by Antimicrobials. *J. Bacteriol.* 183, 6746–6751. <https://doi.org/10.1128/JB.183.23.6746-6751.2001>
- Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., Ploy, M.-C., 2012. Integron Involvement in Environmental Spread of Antibiotic Resistance. *Front. Microbiol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00119>
- Stalder, T., Barraud, O., Jové, T., Casellas, M., Gaschet, M., Dagot, C., Ploy, M.-C., 2014. Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. *ISME J.* 8, 768–777. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.189>
- Starikova, I., Harms, K., Haugen, P., Lunde, T.T.M., Primicerio, R., Samuelsen, Ø., Nielsen, K.M., Johnsen, P.J., 2012. A trade-off between the fitness cost of functional integrases and long-term stability of integrons. *PLoS Pathog.* 8, e1003043. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003043>
- Stewart, P.S., 2003. Diffusion in biofilms. *J. Bacteriol.* 185, 1485–1491. <https://doi.org/10.1128/JB.185.5.1485-1491.2003>
- Stewart, P.S., Franklin, M.J., 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 199–210. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1838>
- Stokes, H.W., Hall, R.M., 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* 3, 1669–1683. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00153.x>
- Stokes, H.W., Nesbø, C.L., Holley, M., Bahl, M.I., Gillings, M.R., Boucher, Y., 2006. Class 1 integrons potentially predating the association with tn402-like transposition genes are present in a sediment microbial community. *J. Bacteriol.* 188, 5722–5730. <https://doi.org/10.1128/JB.01950-05>
- Stokes, H.W., O’Gorman, D.B., Recchia, G.D., Parsekhian, M., Hall, R.M., 1997. Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol. Microbiol.* 26, 731–745. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.6091980.x>
- Stone, G., Wood, P., Dixon, L., Keyhan, M., Matin, A., 2002. Tetracycline rapidly reaches all the constituent cells of uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2458–2461. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.8.2458-2461.2002>

- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002. Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>
- Story, R.M., Steitz, T.A., 1992. Structure of the recA protein-ADP complex. *Nature* 355, 374–376. <https://doi.org/10.1038/355374a0>
- Storz, G., Hengge, R., 2011. Bacterial Stress Responses, Second Edition, Bacterial Stress Responses, Second Edition. American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/9781555816841>
- Strack, R.L., Strongin, D.E., Mets, L., Glick, B.S., Keenan, R.J., 2010. Chromophore formation in DsRed occurs by a branched pathway. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 8496–8505. <https://doi.org/10.1021/ja1030084>
- Strugeon, E., Tilloy, V., Ploy, M.-C., Re, S.D., 2016. The Stringent Response Promotes Antibiotic Resistance Dissemination by Regulating Integron Integrase Expression in Biofilms. *mBio* 7, e00868-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00868-16>
- Swinger, K.K., Rice, P.A., 2004. IHF and HU: flexible architects of bent DNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2003.12.003>
- Sy, J., 1977. In vitro degradation of guanosine 5'-diphosphate, 3'-diphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5529–5533. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5529>
- Syal, K., Flentie, K., Bhardwaj, N., Maiti, K., Jayaraman, N., Stallings, C.L., Chatterji, D., 2017. Synthetic (p)ppGpp Analogue Is an Inhibitor of Stringent Response in Mycobacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61, e00443-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00443-17>
- Taddei, F., Matic, I., Radman, M., 1995. cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.25.11736>
- Tamariz, J., Llanos, C., Seas, C., Montenegro, P., Lagos, J., Fernandes, M.R., Cerdeira, L., Lincopan, N., 2018. Draft Genome Sequence of the First New Delhi Metallo- β -Lactamase (NDM-1)-Producing *Escherichia coli* Strain Isolated in Peru. *Genome Announc.* 6, e00199-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00199-18>
- Tata, M., Wolfinger, M.T., Amman, F., Roschanski, N., Dötsch, A., Sonnleitner, E., Häussler, S., Bläsi, U., 2016. RNASeq Based Transcriptional Profiling of *Pseudomonas aeruginosa* PA14 after Short- and Long-Term Anoxic Cultivation in Synthetic Cystic Fibrosis Sputum Medium. *PloS One* 11, e0147811. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147811>
- Thi, T.D., López, E., Rodríguez-Rojas, A., Rodríguez-Beltrán, J., Couce, A., Guelfo, J.R., Castañeda-García, A., Blázquez, J., 2011. Effect of recA inactivation on mutagenesis of *Escherichia coli* exposed to sublethal concentrations of antimicrobials. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 531–538. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq496>
- Thliveris, A.T., Little, J.W., Mount, D.W., 1991. Repression of the *E. coli* recA gene requires at least two LexA protein monomers. *Biochimie* 73, 449–456. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(91\)90112-E](https://doi.org/10.1016/0300-9084(91)90112-E)
- Tolker-Nielsen, T., 2015. Biofilm Development. *Microbiol. Spectr.* 3. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014>
- Traxler, M.F., Summers, S.M., Nguyen, H.-T., Zacharia, V.M., Hightower, G.A., Smith, J.T., Conway, T., 2008. The global, ppGpp-mediated stringent response to amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 68, 1128–1148. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06229.x>
- Traxler, M.F., Zacharia, V.M., Marquardt, S., Summers, S.M., Nguyen, H.-T., Stark, S.E., Conway, T., 2011. Discretely calibrated regulatory loops controlled by ppGpp partition

- gene induction across the “feast to famine” gradient in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 79, 830–845. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07498.x>
- Trip, H., van der Veek, P.J., Renniers, T.C., Meima, R., Sagt, C.M., Mohrmann, L., Kuipers, O.P., 2011. A novel screening system for secretion of heterologous proteins in *Bacillus subtilis*. *Microb. Biotechnol.* 4, 673–682. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00270.x>
- Tseng, B.S., Zhang, W., Harrison, J.J., Quach, T.P., Song, J.L., Penterman, J., Singh, P.K., Chopp, D.L., Packman, A.I., Parsek, M.R., 2013. The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. *Environ. Microbiol.* 15, 2865–2878. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12155>
- Tuomanen, E., Tomasz, A., 1986. Induction of autolysis in nongrowing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 167, 1077–1080. <https://doi.org/10.1128/jb.167.3.1077-1080.1986>
- Uruén, C., Chopo-Escuin, G., Tommassen, J., Mainar-Jaime, R.C., Arenas, J., 2020. Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. *Antibiot. Basel Switz.* 10, 3. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010003>
- Valdezate, S., Garrido, N., Carrasco, G., Villalón, P., Medina-Pascual, M.J., Saéz-Nieto, J.A., 2015. Resistance gene pool to co-trimoxazole in non-susceptible *Nocardia* strains. *Front. Microbiol.* 6, 376. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00376>
- Valle, J., Da Re, S., Henry, N., Fontaine, T., Balestrino, D., Latour-Lambert, P., Ghigo, J.-M., 2006. Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12558–12563. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605399103>
- Van Houdt, R., Michiels, C.W., 2005. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res. Microbiol.* 156, 626–633. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.02.005>
- Vega, N.M., Allison, K.R., Khalil, A.S., Collins, J.J., 2012. Signaling-Mediated Bacterial Persister Formation. *Nat. Chem. Biol.* 8, 431–433. <https://doi.org/10.1038/nchembio.915>
- Viducic, D., Ono, T., Murakami, K., Susilowati, H., Kayama, S., Hirota, K., Miyake, Y., 2006. Functional Analysis of *spoT*, *relA* and *dksA* Genes on Quinolone Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* under Nongrowing Condition. *Microbiol. Immunol.* 50, 349–357. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2006.tb03793.x>
- Villadsen, I.S., Michelsen, O., 1977. Regulation of PRPP and nucleoside tri and tetraphosphate pools in *Escherichia coli* under conditions of nitrogen starvation. *J. Bacteriol.* 130, 136–143. <https://doi.org/10.1128/jb.130.1.136-143.1977>
- Vinella, D., Albrecht, C., Cashel, M., D’Ari, R., 2005. Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 56, 958–970. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04601.x>
- Vinogradova, D.S., Zegarra, V., Maksimova, E., Nakamoto, J.A., Kasatsky, P., Paleskava, A., Konevega, A.L., Milón, P., 2020. How the initiating ribosome copes with ppGpp to translate mRNAs. *PLoS Biol.* 18, e3000593. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000593>
- Vinué, L., Jové, T., Torres, C., Ploy, M.-C., 2011. Diversity of class 1 integron gene cassette Pc promoter variants in clinical *Escherichia coli* strains and description of a new P2 promoter variant. *Int. J. Antimicrob. Agents* 38, 526–529. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.07.007>
- Vollmer, A.C., Kwakye, S., Halpern, M., Everbach, E.C., 1998. Bacterial Stress Responses to 1-Megahertz Pulsed Ultrasound in the Presence of Microbubbles. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3927–3931.

- Wade, J.T., Reppas, N.B., Church, G.M., Struhl, K., 2005. Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the *Escherichia coli* genome and identifies unconventional target sites. *Genes Dev.* 19, 2619–2630. <https://doi.org/10.1101/gad.1355605>
- Wadhawan, S., Gautam, S., Sharma, A., 2013. A component of gamma-radiation-induced cell death in *E. coli* is programmed and interlinked with activation of caspase-3 and SOS response. *Arch. Microbiol.* 195, 545–557. <https://doi.org/10.1007/s00203-013-0906-6>
- Walters, M.C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Stewart, P.S., 2003. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 317–323. <https://doi.org/10.1128/aac.47.1.317-323.2003>
- Wang, J.D., Sanders, G.M., Grossman, A.D., 2007. Nutritional control of elongation of DNA replication by (p)ppGpp. *Cell* 128, 865–875. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.043>
- Watters, C., Fleming, D., Bishop, D., Rumbaugh, K.P., 2016. Host Responses to Biofilm, in: *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier, pp. 193–239. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.05.007>
- Wei, Q., Hu, Q., Li, S., Lu, H., Chen, G., Shen, B., Zhang, P., Zhou, Y., 2014. A novel functional class 2 integron in clinical *Proteus mirabilis* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 973–976. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt456>
- Weigle, J.J., 1953. Induction of Mutations in a Bacterial Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 39, 628–636. <https://doi.org/10.1073/pnas.39.7.628>
- Werner, E., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Heydorn, A., Molin, S., Pitts, B., Stewart, P.S., 2004. Stratified Growth in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6188–6196. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6188-6196.2004>
- Wessel, A.K., Arshad, T.A., Fitzpatrick, M., Connell, J.L., Bonnacaze, R.T., Shear, J.B., Whiteley, M., 2014. Oxygen Limitation within a Bacterial Aggregate. *mBio* 5. <https://doi.org/10.1128/mBio.00992-14>
- Wexselblatt, E., Katzhendler, J., Saleem-Batcha, R., Hansen, G., Hilgenfeld, R., Glaser, G., Vidavski, R.R., 2010. ppGpp analogues inhibit synthetase activity of Rel proteins from Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Bioorg. Med. Chem.* 18, 4485–4497. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.04.064>
- Wexselblatt, E., Oppenheimer-Shaanan, Y., Kaspary, I., London, N., Schueler-Furman, O., Yavin, E., Glaser, G., Katzhendler, J., Ben-Yehuda, S., 2012. Relacin, a novel antibacterial agent targeting the Stringent Response. *PLoS Pathog.* 8, e1002925. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002925>
- White, D.G., Zhao, S., Sudler, R., Ayers, S., Friedman, S., Chen, S., McDermott, P.F., McDermott, S., Wagner, D.D., Meng, J., 2001. The isolation of antibiotic-resistant salmonella from retail ground meats. *N. Engl. J. Med.* 345, 1147–1154. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa010315>
- Whiteley, M., Bagera, M.G., Bumgarner, R.E., Parsek, M.R., Teitzel, G.M., Lory, S., Greenberg, E.P., 2001. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413, 860–864. <https://doi.org/10.1038/35101627>
- Wigle, T.J., Sexton, J.Z., Gromova, A.V., Hadimani, M.B., Hughes, M.A., Smith, G.R., Yeh, L.-A., Singleton, S.F., 2009. Inhibitors of RecA activity discovered by high-throughput screening: cell-permeable small molecules attenuate the SOS response in *Escherichia coli*. *J. Biomol. Screen.* 14, 1092–1101. <https://doi.org/10.1177/1087057109342126>
- Wigle, T.J., Singleton, S.F., 2007. Directed molecular screening for RecA ATPase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 3249–3253. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.04.013>

- Williams, I., Venables, W.A., Lloyd, D., Paul, F., Critchley, I., 1997. The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Read. Engl.* 143 (Pt 7), 2407–2413. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-7-2407>
- Williamson, K.S., Richards, L.A., Perez-Osorio, A.C., Pitts, B., McInerney, K., Stewart, P.S., Franklin, M.J., 2012. Heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms includes expression of ribosome hibernation factors in the antibiotic-tolerant subpopulation and hypoxia-induced stress response in the metabolically active population. *J. Bacteriol.* 194, 2062–2073. <https://doi.org/10.1128/JB.00022-12>
- Wilson, C., Lukowicz, R., Merchant, S., Valquier-Flynn, H., Caballero, J., Sandoval, J., Okuom, M., Huber, C., Brooks, T.D., Wilson, E., Clement, B., Wentworth, C.D., Holmes, A.E., 2017. Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. *Res. Rev. J. Eng. Technol.* 6.
- Wingen, M., Potzkei, J., Endres, S., Casini, G., Rupprecht, C., Fahlke, C., Krauss, U., Jaeger, K.-E., Drepper, T., Gensch, T., 2014. The photophysics of LOV-based fluorescent proteins—new tools for cell biology. *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 13, 875–883. <https://doi.org/10.1039/c3pp50414j>
- Winther, K.S., Roghanian, M., Gerdes, K., 2018. Activation of the Stringent Response by Loading of RelA-tRNA Complexes at the Ribosomal A-Site. *Mol. Cell* 70, 95-105.e4. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.033>
- Witkin, E.M., 1976. Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* 40, 869–907. <https://doi.org/10.1128/br.40.4.869-907.1976>
- Wojciech, J., Kamila, M., Wojciech, B., 2018. Investigation of the population dynamics within a *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using a flow based biofilm model system and flow cytometric evaluation of cellular physiology. *Biofouling* 34, 835–850. <https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1508569>
- Wood, T.K., Knabel, S.J., Kwan, B.W., 2013. Bacterial persister cell formation and dormancy. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 7116–7121. <https://doi.org/10.1128/AEM.02636-13>
- Wright, M.S., Baker-Austin, C., Lindell, A.H., Stepanauskas, R., Stokes, H.W., McArthur, J.V., 2008. Influence of industrial contamination on mobile genetic elements: class 1 integron abundance and gene cassette structure in aquatic bacterial communities. *ISME J.* 2, 417–428. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.8>
- Wrobel, B., Wegrzyn, G., 1997. Differential amplification efficiency of pMB1 and p15A (ColE1-type) replicons in *Escherichia coli* stringent and relaxed strains starved for particular amino acids. *Microbiol. Res.* 152, 251–255. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(97\)80036-5](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(97)80036-5)
- Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G., Cashel, M., 1991. Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J. Biol. Chem.* 266, 5980–5990.
- Xu, H., Davies, J., Miao, V., 2007. Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. *J. Bacteriol.* 189, 6276–6283. <https://doi.org/10.1128/JB.00348-07>
- Xu, K.D., Stewart, P.S., Xia, F., Huang, C.T., McFeters, G.A., 1998. Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4035–4039. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.10.4035-4039.1998>
- Yakimov, A., Bakhlanova, I., Baitin, D., 2021. Targeting evolution of antibiotic resistance by SOS response inhibition. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 19, 777–783. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.003>

- Yim, G., McClure, J., Surette, M.G., Davies, J.E., 2011. Modulation of Salmonella gene expression by subinhibitory concentrations of quinolones. *J. Antibiot. (Tokyo)* 64, 73–78. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.137>
- Zaborskyte, G., Andersen, J.B., Kragh, K.N., Ciofu, O., 2017. Real-Time Monitoring of nfxB Mutant Occurrence and Dynamics in Pseudomonas aeruginosa Biofilm Exposed to Subinhibitory Concentrations of Ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61. <https://doi.org/10.1128/AAC.02292-16>
- Zhang, A.P.P., Pigli, Y.Z., Rice, P.A., 2010. Structure of the LexA-DNA complex and implications for SOS box measurement. *Nature* 466, 883–886. <https://doi.org/10.1038/nature09200>
- Zhang, C., Xing, X.-H., Lou, K., 2005. Rapid detection of a gfp-marked Enterobacter aerogenes under anaerobic conditions by aerobic fluorescence recovery. *FEMS Microbiol. Lett.* 249, 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.05.051>
- Zhang, X.Y., Ding, L.J., Yue, J., 2009. Occurrence and characteristics of class 1 and class 2 integrons in resistant Escherichia coli isolates from animals and farm workers in northeastern China. *Microb. Drug Resist. Larchmt. N* 15, 323–328. <https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0020>
- Zhang, Y., Zborníková, E., Rejman, D., Gerdes, K., 2018. Novel (p)ppGpp Binding and Metabolizing Proteins of Escherichia coli. *mBio* 9. <https://doi.org/10.1128/mBio.02188-17>
- Zheng, D., Constantinidou, C., Hobman, J.L., Minchin, S.D., 2004. Identification of the CRP regulon using in vitro and in vivo transcriptional profiling. *Nucleic Acids Res.* 32, 5874–5893. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh908>
- Zheng, Z., Stewart, P.S., 2004. Growth limitation of Staphylococcus epidermidis in biofilms contributes to rifampin tolerance. *Biofilms* 1, 31–35. <https://doi.org/10.1017/S1479050503001042>
- Zheng, Z., Stewart, P.S., 2002. Penetration of rifampin through Staphylococcus epidermidis biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 900–903. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.3.900-903.2002>
- Zyskind, J.W., Smith, D.W., 1992. DNA replication, the bacterial cell cycle, and cell growth. *Cell* 69, 5–8. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90112-p](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90112-p)

Stress endogènes et acquisition de résistance aux antibiotiques par les intégrons en biofilm

Dans les écosystèmes naturels les bactéries vivent sous forme de biofilm. Ces derniers sont très tolérants aux antibiotiques et à l'origine d'infections persistantes difficiles à traiter. Les intégrons de classe 1 sont des systèmes bactériens capables de capturer, échanger et exprimer des cassettes de gène de résistance aux antibiotiques. L'intégrase *IntI1*, dont l'expression est régulée par la réponse SOS bactérienne, catalyse l'insertion/excision des cassettes de gène. Nous avons précédemment montré que le niveau basal d'expression des gènes *intl1* et *sfiA* (gène du régulon SOS) est globalement augmenté *via* la réponse stringente (induite lors de carences nutritives) dans le biofilm par rapport à la culture planctonique. Or, les biofilms sont des environnements hétérogènes où les bactéries présentent des phénotypes variés.

Dans cette étude, nous avons localisé et quantifié l'expression des gènes *intl1* et *sfiA* dans le biofilm au niveau des bactéries individuelles, par des approches de microscopie confocale, de cytométrie en flux et de RT-qPCR. Nos résultats ont montré qu'en l'absence de stress exogène, seul un petit nombre de bactéries (~ 1%) situées dans la profondeur du biofilm induit la réponse SOS conduisant à un niveau élevé d'expression de *intl1* et de *sfiA*, à la fois d'une manière dépendante et indépendante de la réponse stringente. Nos résultats indiquent donc que quelques bactéries situées la profondeur du biofilm subissent un stress endogène suffisant pour favoriser l'acquisition de résistance aux antibiotiques, formant ainsi un réservoir de bactéries prêtes à résister rapidement aux traitements antibiotiques.

Nous avons aussi montré l'implication du régulateur global CRP dans la régulation biofilm-spécifique de l'expression de l'intégrase, régulation plus complexe qu'anticipé.

Mots-clés : Biofilm, intégrons, Réponse SOS, Réponse stringente, résistance aux antibiotiques

Endogenous stresses and antibiotic resistance acquisition *via* integron in biofilms

In natural settings, bacteria mostly live in biofilms. These are highly tolerant to antibiotics and cause persistent infections that are difficult to treat. Class 1 integrons are bacterial systems able to capture, exchange and express antibiotic resistance gene. The integrase *IntI1*, whose expression is regulated by the bacterial SOS response, catalyzes the insertion/excision of gene cassettes. We have previously shown that the basal expression level of *intl1* and *sfiA* (SOS regulon gene) is globally increased *via* the stringent response (induced during nutrient starvation) in biofilm compared to planktonic culture. However, biofilms are heterogeneous environments where bacteria exhibit various phenotypes.

In this study, we localized and quantified the expression of *intl1* and *sfiA* genes within the biofilm at the level of individual bacteria, using confocal microscopy, flow cytometry and RT-qPCR approaches. Our results showed that in absence of exogenous stress, only a small number of bacteria (~ 1%) located in the depth of the biofilm induce the SOS response leading to a high level of *intl1* and *sfiA* expression, both in a stringent response-dependent and -independent manner. Our results thus indicate that few bacteria located at the depth of the biofilm undergo sufficient endogenous stress to promote the acquisition of antibiotic resistance, forming a reservoir of bacteria ready to rapidly resist antibiotic treatments.

We also showed the involvement of the global regulator CRP in biofilm-specific regulation of integrase expression, a more complex regulation than expected.

Keywords: Biofilm, Integrons, SOS and stringent response, antibiotic resistance

